



Fitorremediación en un suelo salino afectado por contaminación con cadmio en el agua de riego

Trabajo Fin de Grado

Curso 2016-2017

Claudia Gallego Moreno

Tutores: José Navarro Pedreño y María Belén Almendro Candel

Áreas de conocimiento: Edafología y Química Agrícola e Ingeniería Química

Universidad Miguel Hernández de Elche

Facultad Ciencias Experimentales

Grado en Ciencias Ambientales

Departamento Agroquímica y Medio Ambiente



Resumen

FITORREMEDIACIÓN EN UN SUELO SALINO AFECTADO POR CONTAMINACIÓN CON CADMIO EN EL AGUA DE RIEGO

La degradación de los suelos por contaminación con metales pesados es un problema el cual degenera ecosistemas y reduce la calidad ambiental de una zona. En el presente estudio se analizan los efectos adversos que diferentes concentraciones de un metal pesado como es el cadmio pueden generar en dos especies vegetales como son la alfalfa y la cebada. Para ello se ha realizado un experimento en invernadero para ver los efectos sobre el contenido de nutrientes en suelos y planta, asociados con la contaminación por cadmio presente en el agua de riego. El estudio se realizó con suelos salinos de una zona de la Vega Baja del Segura, para así poder analizar también la influencia del suelo salino en el proceso.

Palabras clave: cadmio, suelo salino, alfalfa, cebada.

Abstract

PHYTOREMEDIATION IN A SALINE SOIL AFFECTED BY CONTAMINATION WITH CADMIUM IN THE WATER OF IRRIGATION

Soil degradation due to contamination with heavy metals is a problem, which affects ecosystems and reduces the environmental quality of an area. In the present work, adverse effects due to heavy metal pollution (cadmium) have been studied in two different vegetable species as alfalfa and barley. The experiment has been done under greenhouse conditions, in order to analyse the effects of the contamination in plant and soil nutrients. The study used a saline soils from an area in 'La Vega Baja del Segura', to be able to see also the influence of saline soil in the process.

Key words: cadmium, saline soil, alfalfa, barley.



Índice

1. Introducción	1
1.1 Metales pesados	1
1.2 Metales pesados en el medio natural	2
1.3 Comportamiento en el suelo	3
1.4 Efectos en el medio natural: contaminantes ambientales	3
1.5 Metales pesados en plantas	4
1.6 Remediación de la contaminación	6
1.7 El caso particular del cadmio	7
2. Antecedentes y objetivos	9
2.1 Antecedentes	9
2.2 Objetivos	11
3. Materiales y métodos	12
3.1 Diseño experimental	12
3.2 Materiales	14
3.3 Métodos de análisis	15
4. Resultados y discusión	19
4.1 Suelos	20
4.2 Plantas	28
5. Conclusiones	35
6. Referencias	37



1. Introducción

El presente trabajo de fin de grado tiene como finalidad el estudio de la fitorremediación en un suelo salino, afectado por contaminación con cadmio a través del agua de riego, utilizando dos especies vegetales diferentes.

1.1. Metales pesados

Dentro de la tabla periódica de los elementos (Figura 1), encontramos los metales pesados, los cuales son elementos con densidades, pesos atómicos y números atómicos superiores a 5 gr/cm³, 44,956 y 20 respectivamente, exceptuando a los de los grupos alcalino, alcalinotérreo, lantánidos y actínidos (Sandoval, 2006).

1																	18					
H																	He					
2																	13	14	15	16	17	18
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne					
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar					
3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18							
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe(III) Fe(II)	Co	Ni	Cu(I) Cu(II)	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr					
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe					
Cs	Ba	*	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb(IV) Pb(II)	Bi	Po	At	Rn					
Fr	Ra	#	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	110													
		* lanthanide	La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu					
		# actinide	Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr					

Figura 1. Tabla periódica de los elementos con clasificación de metales. Fuente: Duffus, 2002.

En el grupo de los metales pesados podemos encontrar dos subcategorías en lo que respecta a su relación con los seres vivos: esenciales y no esenciales. Los metales esenciales como cobre, zinc, manganeso, hierro y níquel, tienen importantes roles reguladores en gran número de procesos biológicos, como en la transferencia de electrones entre proteínas o como co-factores de numerosas enzimas (Chaffai y Koyama, 2011).

Por otro lado, encontramos los metales no esenciales, aquellos que no tienen funciones biológicas conocidas, como cadmio, mercurio y plomo (Choppala et al., 2014). La presencia de

estos elementos en determinadas cantidades en los seres vivos lleva aparejada disfunciones en el funcionamiento de sus organismos, resultando altamente tóxicos (García y Dorronsoro, 2005). Además, el carácter no biodegradable y la biodisponibilidad que presentan hacen que puedan resultar muy peligrosos (Méndez *et al.*, 2009).

1.2. Metales pesados en el medio natural

Los metales pesados se encuentran generalmente como componentes naturales de la corteza terrestre; en forma de minerales, sales u otros compuestos (Abollino *et al.*, 2002), haciendo que algunos suelos hereden estos metales desde el material parental del cual han sido originados (Sarwar *et al.*, 2017). Además, debido a actividades geológicas naturales, como desgastes de cerros y volcanes, se generan aportaciones importantes de metales pesados al suelo (Pineda, 2004).

Por otro lado, los metales pesados están involucrados directa o indirectamente en gran parte de las actividades humanas; especialmente en los sectores industriales, agrícolas, mineros y urbanos. Dichas actividades humanas se están acrecentando aceleradamente, aumentando al mismo tiempo sus residuos sólidos y líquidos, multiplicándose la concentración de iones metálicos en los sistemas bióticos terrestres, acuáticos y aéreos (Sandoval, 2006).

La contaminación de suelos por metales pesados ocurre cuando estos son irrigados con aguas procedentes de desechos de minas, aguas residuales contaminadas de parques industriales y municipales o filtraciones de vertederos (Wang y Chao, 1992).

Además, también pueden incorporarse a un sistema de abastecimiento de agua por medio de residuos industriales que son vertidos sin previos tratamientos, los que posteriormente se depositan en lagos, ríos y distintos sistemas acuáticos (García y Dorronsoro, 2005).

Por todo esto, la presencia de metales pesados en suelos agrícolas, los cuales reciben un aporte extra de metales pesados a través de la fertilización (Mortvedt y Beaton, 1995), es un tema de preocupación ambiental y una gran amenaza para la vida en la tierra. Hay un gran número de riesgos para la salud asociados con la entrada de metales pesados en la cadena alimenticia (Sarwar *et al.*, 2017).

Esta contaminación repercute en alteraciones en la calidad ambiental, que se ve gravemente afectada por la presencia de metales pesados en la atmósfera, el agua o el suelo. Debido a esto,

el interés por entender los efectos tóxicos de los metales pesados en el crecimiento y fisiología de los cultivos se ha visto incrementado en los últimos años (González y Lobo, 2013).

1.3. Comportamiento en el suelo

Una vez en el suelo, los metales pesados pueden seguir cuatro vías diferentes:

1. Quedar en el suelo disueltos en la fase acuosa (fase móvil) u ocupando sitios de intercambio inespecíficos.
2. Específicamente adsorbidos sobre constituyentes inorgánicos del suelo.
3. Asociados con la materia orgánica del suelo, formando parte de ella.
4. Precipitados como sólidos puros o mixtos (minerales y rocas).

Por otra parte, pueden ser absorbidos por las plantas e incorporarse a las cadenas tróficas o pueden pasar a la atmósfera por volatilización y ser movilizados a las aguas superficiales o subterráneas (García y Dorronsoro, 2005).

Este comportamiento se ve influenciado por factores determinantes en la movilización de metales pesados, como son las características del suelo, pH, potencial redox, composición iónica de la solución del suelo, capacidad de intercambio (catiónico o aniónico), presencia de carbonatos, materia orgánica y textura, entre otras. Además, la naturaleza de la contaminación y el origen de los metales, así como las formas de deposición y las condiciones medio ambientales, producen cambios en las condiciones redox, variación de temperatura, humedad en los suelos y acidificación de los mismos (Sahuquillo *et al.*, 2003), condición que resulta en una mayor disponibilidad de los metales en el suelo (Méndez *et al.*, 2009).

1.4. Efectos en el medio natural: contaminantes ambientales

Los metales pesados se conocen por tener un efecto negativo en el funcionamiento normal y los parámetros biológicos del suelo (Kandeler *et al.*, 1996). Esto es debido a las características especiales que los hacen ser potentes contaminantes ambientales: estabilidad que los hace persistentes y residuales en los ecosistemas, afinidad por grupos tiolicos (- SH -) (presentes en la mayoría de enzimas de cualquier organismo vivo), biodisponibilidad en medio acuoso, capacidad de bioconcentración en organismos acuáticos (peces, crustáceos, algas, etc...) y terrestres (plantas) (Förstner y Wittmann, 1983).

Se acumulan de igual manera en las diferentes células del cuerpo (cerebro, hígado, riñón, corazón, páncreas, tejido muscular, huesos, sangre, etc...) acomplejados con unos péptidos llamados metalotioneínas, metaloproteínas ricas en cisteína y generalmente de bajo peso molecular (entre 6000 y 10000 Da), libres en el interior celular (Jugo, 1977).

Debido a la movilidad de estos elementos en los ecosistemas acuáticos naturales (aguas superficiales y subterráneas) y a su toxicidad para el sistema biótico, los iones metálicos en general, son considerados a nivel mundial como los contaminantes inorgánicos más importantes en el ambiente, por su carácter recalcitrante y poder de biomagnificación, sus concentraciones pueden llegar a ser tóxicas, planteando graves problemas para la perennidad de los ecosistemas y la salud del hombre (Sandoval, 2006).

Este es uno de los principales problemas ambientales a nivel nacional y mundial, debido a que su acumulación y biomagnificación a través del tiempo en los sistemas bióticos y abióticos, afecta a toda la cadena trófica en un ecosistema (Sandoval, 2006).

Por otra parte, y de acuerdo con trabajos previos de Kandeler *et al.* (1996), los resultados sugieren que la presencia de metales pesados tiene un efecto negativo en todas las enzimas, siendo la β -glucosidasa una de las más sensibles (Hernández-Allica *et al.*, 2006). El grado de inhibición de la actividad enzimática es dependiente del tipo de suelo (Speir *et al.*, 1992) y la estructura de la vegetación (Speir y Ross, 2002).

1.5. Metales pesados en plantas

Al no poseer mecanismos de transporte específicos para elementos no esenciales como el cadmio (Lara-Viveros *et al.*, 2015), estos metales son tomados por las plantas a través de los tejidos corticales de las raíces, debido a la similitud de estos con algunos micronutrientes esenciales como el zinc (Navarro Pedreño *et al.*, 1997), y adoptan vías simplásticas o apoplásticas para llegar al sistema de transporte del xilema (Salt y Rauser, 1995).

Los metales pesados pueden causar estrés hídrico en las plantas, alterando los mecanismos celulares y la expresión de genes, bien por reemplazo de los metales esenciales, o al alterar la estructura de biomoléculas y proteínas reguladoras del estrés (Sarwar *et al.*, 2010). Estas alteraciones se hacen visibles causando la disminución de la conductancia estomática, la tasa de transpiración y el contenido relativo de agua en las hojas, debido a la reducción en el número y tamaño de los vasos del xilema, cloroplastos y elongación de las células (Sarwar *et al.*, 2014).

En células vegetales, además de los efectos tóxicos comentados, la exposición reiterada a diferentes concentraciones de iones metálicos conlleva una drástica reducción en el crecimiento de las raíces, tallo y hojas, además de un grave efecto en la división celular en los diferentes tejidos vegetales (Harper, 2000).

Dadas los efectos causados por la presencia de metales pesados en determinados entornos, las plantas han desarrollado dos estrategias para tolerar grandes cantidades del metal en cuestión; una de las estrategias es la exclusión, característica de especies sensibles y tolerantes a los metales (Méndez *et al.*, 2009), donde el transporte del metal es mínimo y restringido, y la concentración de este en la parte aérea permanece relativamente constante aunque haya una gran concentración del metal en el suelo. La sensibilidad de las especies vegetales a los metales pesados varía considerablemente a través de reinos y familias, siendo las plantas vasculares ligeramente más tolerantes (Rosa *et al.*, 1999).

La otra estrategia es la acumulación, más común en especies que aparecen siempre en suelos contaminados (Méndez *et al.*, 2009), donde los metales son acumulados en una forma no tóxica en la parte superior de las plantas terrestres, ya sea alta o baja la concentración de metales en el suelo (González y Lobo, 2013). En este caso hablamos de especies de plantas hiperacumuladoras, término acuñado por Brooks *et al.* (1977). Generalmente este tipo de plantas tienen poca biomasa, debido a que utilizan más energía en los mecanismos necesarios para adaptarse a las altas concentraciones de metal en sus tejidos (Kabata-Pendias, 2000).

De acuerdo con la estrategia de acumulación propuesta por Baker (1981), las plantas hiperacumuladoras pueden superar en 100 veces o más los valores normales de metales acumulados. Estas plantas son especies muy tolerantes a uno o más metales pesados, y a menudo, su distribución está restringida a suelos ricos en un amplio rango de concentraciones de metales, pues no son competitivas en zonas no contaminadas. La hiperacumulación ha evolucionado en más de 400 especies de plantas repartidas en 45 familias botánicas, siendo la familia *Brassicaceae* una de las que cuenta con más géneros de este tipo (Baker *et al.*, 2000).

Existen varias hipótesis sobre qué función, además de vivir en un suelo con menor competencia, puede asociarse a la adaptación de las especies a la hiperacumulación, pero actualmente se asocia con la protección de la planta contra el estrés biótico causado por patógenos y herbívoros (Llugany *et al.*, 2007). Este tipo de protección requiere ciertas condiciones: la primera es que el metal sea más tóxico para el patógeno o herbívoro que para la planta; la segunda, que el metal impida la virulencia del patógeno o herbívoro, y finalmente la tercera, que el metal incremente la resistencia de la planta frente al factor causante de estrés biótico (Méndez *et al.*, 2009).

1.6. Remediación de la contaminación

Los métodos utilizados en la remediación de la contaminación por metales pesados en los suelos son de dos tipos principalmente: físico-químicos y biológicos.

Dentro de los métodos físico-químicos encontramos técnicas como la precipitación química de los metales, las membranas líquidas o la remoción por carbón activado. En el apartado de métodos biológicos o de biorremediación, entendido como proceso de catálisis biológica espontáneo o controlado que busca remediar o eliminar la contaminación ambiental (Glazer y Nikaido, 1998), encontramos la fitorremediación (Sarwar et al., 2017), la biorremediación animal y la biorremediación por medio de microorganismos (Sandoval, 2006).

En el presente trabajo nos hemos centrado en el método biológico de la fitorremediación, técnica que consiste en la remoción, transferencia, estabilización o degradación y neutralización *in situ* de compuestos orgánicos, inorgánicos y radioactivos que resultan tóxicos en suelo y agua (Méndez et al., 2009). Aunque los mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos son poco conocidos e insuficientemente entendidos (Freitas et al., 2004), esta técnica puede ser usada para remediar la contaminación de un suelo debida a altas concentraciones de metales pesados o metaloides. Esta es una técnica rentable y eficiente comparada con técnicas ingenieriles como la excavación, incineración del suelo, lavado del suelo, dragado del suelo, solidificación, etc... (Sarwar et al., 2017), que permite llevar a cabo actividades de restauración con menor impacto ambiental sobre los terrenos que otras técnicas tradicionales, más invasivas y con efectos secundarios adversos (Robinson et al., 1997). Actualmente está siendo considerado como una tecnología prometedora, rentable económicamente y estéticamente agradable para la remediación de sitios contaminados (Garbisu et al., 2002).

Dentro del concepto de fitorremediación, encontramos diferentes técnicas (Figura 2), siendo la variante más importante la fitoextracción. Esta técnica utiliza las plantas para eliminar metales y otros contaminantes del suelo, sedimentos y agua. En la mayoría de los casos, la tolerancia a los metales pesados se alcanza a través del secuestro en vacuolas por la complejación del metal con fitoquelatinas. La fitoextracción es un método prometedor aplicable a suelos con contaminación media o moderada, y es una alternativa a los métodos de descontaminación *ex situ* (González y Lobo, 2013).

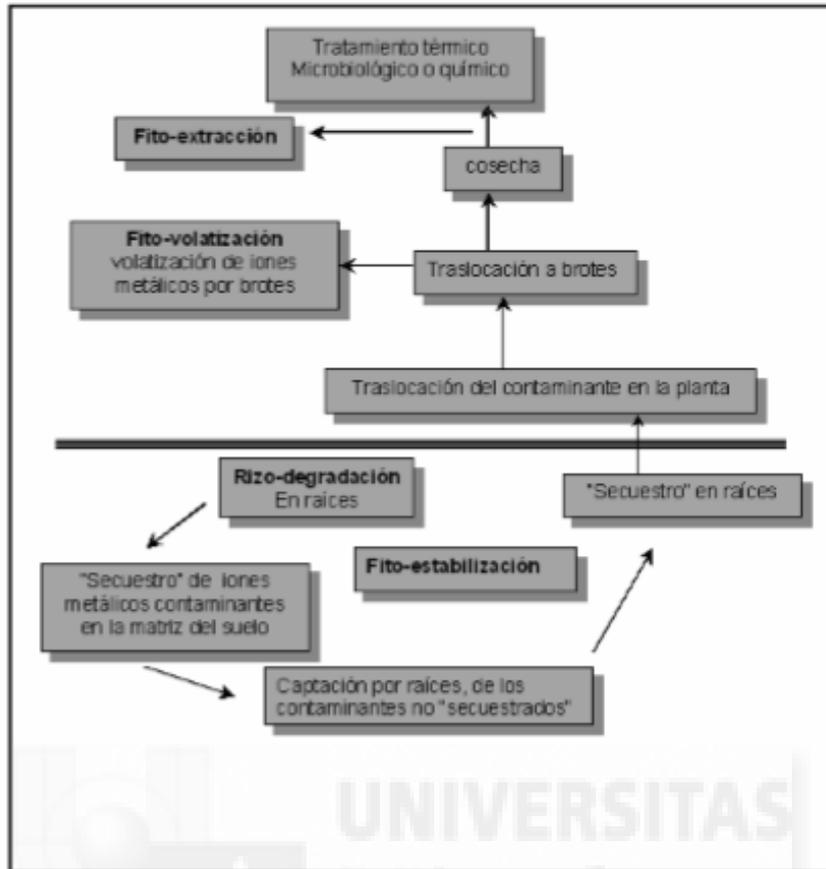


Figura 2. Esquema general de la descontaminación de iones metálicos en un proceso natural de fitorremediación. Fuente: Singh *et al.*, 2003.

Las plantas escogidas para la fitoextracción deben poseer una serie de características como son: alta tasa de crecimiento, gran producción de biomasa, ser hiperacumuladora de metales pesados, amplia distribución, translocación del metal desde las raíces hacia la parte aérea, tolerar los efectos tóxicos del metal pesado, ser resistente a patógenos y plagas, buena adaptación a las condiciones climáticas predominantes, fácil cultivo y cosecha y no ser atractivas a herbívoros, para evitar entradas en la cadena alimenticia (Tong *et al.*, 2004; Shabani y Sayadi, 2012; Ali *et al.*, 2013).

1.7. El caso particular del cadmio

El cadmio, metal pesado objeto de esta experimentación, es un metal no esencial conocido por ser un agente mutagénico y carcinogénico tipo I (grupo B) por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer y por la Organización Mundial de la Salud (Hattab *et al.*, 2014).

Este elemento llega al medio ambiente en parte de manera natural, pero esencialmente por fuentes antropogénicas como residuos industriales procedentes de minería, pigmentos de pinturas, centrales eléctricas, industria metalúrgica o incineración de residuos, además de ser utilizado en algunos tratamientos agrícolas como fungicida y estar presente en la industria de fertilizantes fosfatados (Hattab *et al.*, 2014).

El cadmio es extraído del suelo a través del sistema radicular de muchas especies de plantas y su toxicidad se considera que es de 2 a 20 veces mayor que la de otros metales pesados (Jagodín *et al.*, 1995). Éste se acumula en las plantas y pasa a la cadena alimenticia, siendo la presencia en los alimentos la principal fuente de exposición para la mayoría de personas (Méndez *et al.*, 2009). Con una vida media de 10-30 años en los humanos (Olabarrieta *et al.*, 2001), se asocia a enfermedades en los huesos y daño renal (Lara-Viveros *et al.*, 2015).

Como metal activo *non-redox* que es, es decir, su estado de oxidación no se altera en reacciones redox, el cadmio puede sustituir a metales esenciales o co-factores en las enzimas, causando desequilibrio del sitio activo, en el estado redox celular. Las plantas expuestas al cadmio muestran cambios en la tasa fotosintética debido a la distorsión de la estructura cloroplástica, daños en la síntesis de la clorofila y reducción en el consumo de minerales, además de generar especies reactivas del oxígeno como O_2^- , H_2O_2 y OH (Hattab *et al.*, 2014), las cuales pueden llegar a ser tóxicas en determinadas concentraciones.

2. Antecedentes y objetivos

2.1. Antecedentes

El conocimiento del contenido de metales pesados en suelos y el origen de estos metales, son objetivos prioritarios de la Unión Europea (UE). La Comisión Europea publicó en 2002 «Hacia una estrategia temática para la protección del suelo» (CE, 2002) que establecía las bases y directrices para el mantenimiento y la mejora de la calidad del suelo (Micó *et al.*, 2006) ya que los metales pesados han sido reportados por tener un efecto negativo en el funcionamiento normal y los parámetros biológicos del suelo (Kandeler *et al.*, 1996).

Se han llevado a cabo múltiples estudios para analizar el contenido de éstos en el suelo. En el presente estudio nos centramos en el uso de un suelo de una zona de la provincia de Alicante, que, a pesar de ser la provincia más pequeña de la Comunidad Valenciana, es la más importante en el cultivo de regadío hortícola, con 11.338 ha. (CAPA, 2002). La zona en cuestión se encuentra al sur de la provincia de Alicante, la Vega Baja del Segura, caracterizada por una intensa actividad agrícola e industrial. Una densidad de población alta sumado a una gran expansión urbana, debido al turismo, producen una gran presión hacia los suelos, un fenómeno típico dentro de las regiones semiáridas del área mediterránea. (Coccosis, 1991).

Micó *et al.* (2006) reportaron elevadas concentraciones de cadmio y plomo en suelos agrícolas dedicados a cultivos hortícolas en la Vega Baja del Segura, como consecuencia de emisiones industriales, la aplicación de agroquímicos, y el uso de aguas residuales para el riego. Muchos lugares considerados como contaminados datan de dos o tres décadas atrás, cuando la legislación ambiental sobre residuos sólidos y líquidos no era tan estricta como hoy en día (Abollino *et al.*, 2002).

En el experimento llevado a cabo, se escogieron dos especies vegetales, cebada (*Hordeum vulgare*) y alfalfa (*Medicago sativa*), para exponerlas ante diferentes concentraciones del contaminante y así poder estudiar su comportamiento.

La alfalfa, la cual tiene la capacidad reconocida de acumular metales pesados, es una importante especie forrajera con muchas ventajas como el alto contenido en proteínas, alta tasa de crecimiento, tolerancia a la sequía y adaptación a una amplia gama de climas. Además, posee un sistema radicular muy bien desarrollado y nódulos ricos en bacterias fijadoras de nitrógeno, lo que mejora la fertilización (Hattab *et al.*, 2014). La alfalfa no solamente es capaz de crecer en presencia de altas concentraciones de Cd, como mostraron Peralta-Videa *et al.* (2002), sino que

es capaz de translocar hasta un 26% de este metal a la parte aérea y acumular la mayor parte del cadmio en la raíz (Lara-Viveros *et al.*, 2015), ya que el sistema radicular es la primera barrera para los metales pesados en el suelo (Ernst *et al.*, 1992; Meharg, 1994).

En el caso de la cebada, especie identificada como eficiente en el secuestro y la acumulación de cadmio (Ebbs y Kochian, 1998), el metal se acumula preferentemente en la raíz, y una parte es trasladada a las partes aéreas de la planta, hecho confirmado por González *et al.* (2012).

Sin embargo, ninguna de las especies ha sido testada bajo condiciones de salinidad del medio edáfico, que será el objetivo de este estudio.

Siendo los suelos de la Vega Baja del Segura, suelos con moderada y elevada salinidad, se vio oportuno estudiar el comportamiento de cadmio, ya que autores como Doner (1978) reportaron el aumento de la movilidad de cadmio en suelos salinos.

El cadmio es un metal pesado, cuya toxicidad depende no solo de su concentración total, sino también de su movilidad y reactividad con otros componentes del ecosistema. La forma más utilizada a finales del siglo XX de estudiar la movilidad de un elemento en el suelo era a través de extractantes con diferentes propiedades químicas (Nowak, 1995; Szulczewski *et al.*, 1997; Rauret, 1998).

Consideramos en este trabajo los métodos englobados dentro del concepto de fitorremediación para el estudio de la extracción del metal, dados los buenos resultados en estudios anteriores (Llugany *et al.*, 2007). En 1993 se realizaron los primeros experimentos utilizando plantas hiperacumuladoras para extraer metales de lugares contaminados (McGrath *et al.*, 1993 y 2006), y desde entonces se han descubierto muchas plantas con esta capacidad, que acumulan distintos metales (Llugany *et al.*, 2007).

La reducción del contenido de metales pesados hasta niveles óptimos permitiría la reutilización del suelo tratado con un fin agrícola, forestal, hortícola o lúdico, evitando la transferencia de éstos a aguas subterráneas o zonas cercanas por acción del viento o erosión del agua. Sin embargo, hay todavía muchas cuestiones sin resolver en relación a la evolución de estas características tan inusuales que presentan estas plantas (Baker *et al.*, 2000; Schat *et al.*, 2000; Macnair, 2003).

Por otro lado, las especies vegetales que aquí se usan, se escogieron dada su viabilidad como acumuladoras, resultado de estudios anteriores. Peralta-Videa *et al.* (2002) destacan la capacidad de la alfalfa para acumular el cadmio sin sufrir ningún daño fisiológico, además de

crecer en suelos contaminados puesto que acumula metales en sus tejidos. González *et al.* (2012) confirman la acumulación de metales en raíces y partes aéreas por parte de la cebada.

2.2. Objetivos

La finalidad de este estudio es la de analizar la capacidad fitoextractora en un suelo salino, con aporte de contaminación con cadmio. Para alcanzar este fin, los objetivos específicos del presente trabajo de fin de grado son:

1. Revisar bibliográficamente y recopilar información sobre el tema.
2. Estudiar el efecto del riego con agua contaminada con cadmio sobre la concentración de macronutrientes y micronutrientes en el suelo.
3. Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de cadmio sobre las especies vegetales elegidas (alfalfa y cebada).
4. Observar la posible influencia del suelo salino en el proceso.
5. Obtener las conclusiones del estudio.

Así, con estos datos, poder proponer o no estas especies como idóneas para un proceso de fitoextracción de cadmio en suelos salinos, así como poder ser usadas para restaurar las capacidades naturales del suelo.

3. Materiales y métodos

En este apartado se indica el diseño experimental utilizado, así como los métodos empleados en la determinación de los diferentes parámetros medidos tanto en los suelos como en las plantas.

3.1. Diseño experimental

En el desarrollo del presente experimento, se dispusieron macetas con 800 g de suelo salino (Figura 3), cuyas características comentaremos en el siguiente apartado, tamizado a 5 mm, para evitar los elementos gruesos y la creación de canales preferentes de lixiviación. De las especies empleadas, se sembraron dos individuos por tiesto de cebada (*Hordeum vulgare*) en la mitad de ellos y cinco de alfalfa (*Medicago sativa*) en la otra mitad.



Figura 3. Recogida de muestras el día 04/10/2016.

Se establecieron cuatro tratamientos basados en el riego: T0, T1, T2 y T3 correspondiendo con: sin adición de cadmio en el agua (control), con concentración de 10, 30 y 50 mg/l de cadmio respectivamente.

Las disoluciones del contaminante se prepararon al inicio del experimento, a partir de cloruro de cadmio (CdCl_2), con la misma agua de riego control. Cada tratamiento aplicado a las dos especies vegetales, contó con cuatro réplicas. De esta manera, el experimento dispuso un total de 32 macetas, como se muestra en la Figura 4.



Figura 4. Distribución en el invernadero de los tratamientos.

La colocación de cada tiesto fue aleatoria en el interior del invernadero, para así evitar posibles influencias por la localización. Se desarrolló todo el experimento bajo condiciones controladas. Estas se midieron en dos puntos distintos del invernadero, a 1 metro de altura sobre las plantas. Así se determinó temperatura, humedad relativa y punto de rocío, presentados en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores medios, máximos y mínimos de las condiciones ambientales en el invernadero.

	Temperatura (°C)	Humedad (%)	Punto de rocío (°C)
<i>Media</i>	17,50	66,09	9,00
<i>Desviación estándar</i>	2,11	10,46	2,78
<i>Valor máximo</i>	24,27	81,49	15,77
<i>Valor mínimo</i>	12,77	32,28	-1,67

El riego con la contaminación comenzó diez días después de la germinación de las semillas de origen certificado en turba, una vez que estas se estabilizaron en el nuevo suelo. Los riegos se llevaron a cabo durante cinco semanas, con dos riegos por semana de 200 ml cada uno (lunes y jueves). Durante el período señalado se realizaron además labores de limpieza de especies adventicias presentes en el suelo agrícola, para evitar en lo posible la influencia en los resultados.

3.2. Materiales

3.2.1. Suelo

El suelo utilizado en el experimento es un suelo salino con textura franco limosa de la zona norte del término municipal de San Isidro, dentro de la zona rural conocida como “El Mejijo”. Las características del suelo inicial, cuyos análisis rutinarios para la caracterización fueron realizados en el Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente, se pueden observar en la Tabla 2. Estos análisis se realizaron por cuadruplicado a la misma muestra de suelo usado posteriormente.

Tabla 2. Características iniciales del suelo.

<i>Datos del suelo</i>		<i>Media</i>	<i>Desviación Estándar</i>
Arena	%	17	2
Limo	%	73	2
Arcilla	%	10	1
Textura		Franco limosa	
Capacidad retención hídrica (CRH)	%	66	1
pH (20°C)	uds pH	7,9	0,1
Conductividad eléctrica (25°C) (1:5 p/v)	mS/cm	7,8	0,5
Materia orgánica oxidable (W&B)	%	2,73	0,17
Nitrógeno Kjeldahl	%	0,21	0,01
CaCO₃ equivalente	%	57,5	0,3
Extracción acetato			
Ca	g/kg	8,2	0,9
Mg	g/kg	1,7	0,1
Na	g/kg	4,1	0,1
K	g/kg	0,6	0,1
Extracción DTPA			
Fe	g/kg	0,8	0,1
Mn	g/kg	13,8	0,2
Zn	g/kg	3,1	0,1
Cu	g/kg	3,6	0,2

El suelo utilizado, a pesar de ser franco, presenta un alto contenido en limo que dificulta el laboreo cuando está húmedo y como se aprecia, una salinidad elevada (7,8 mS/cm). También destaca el alto contenido en calcio y sodio asimilables, al igual que de manganeso, y el bajo contenido de hierro extraíble.

3.2.2. Riego

El agua de riego base utilizada, fue la misma durante todo el experimento. Esta fue caracterizada siguiendo los procedimientos habituales en el Departamento anteriormente mencionado. Las características del agua de riego, de pH ligeramente básico, las podemos observar en la Tabla 3.

Tabla 3. Características agua de riego base.

<i>Datos del agua</i>		<i>Media</i>	<i>Desviación estándar</i>
pH (20°C)	Uds pH	7,3	0,1
Conductividad eléctrica (25°C)	mS/cm	0,806	0,006
Oxígeno disuelto	mg/l	7,27	0,06
Nitrato	mg/l	1,21	0,01
Nitrito	mg/l	0,02	0,01
Amonio	mg/l	nd	-
Fosfato	mg/l	0,11	0,02
Bicarbonato	mg/l	134	21
Cloruros	mg/l	109	1
Sulfatos	mg/l	252	26
Na	mg/l	68,2	0,3
K	mg/l	3,2	0,5
Ca	mg/l	25,6	0,4
Mg	mg/l	19,7	0,1

El agua analizada se corresponde con el agua de abastecimiento de la red de distribución de agua potable de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

3.3. Métodos de análisis

Los parámetros analizados en el suelo y la planta tras los tratamientos, así como los métodos utilizados, se describen a continuación.

3.3.1. Suelo

Contenido total de elementos

Se realizó una mineralización por vía húmeda-microondas (Knudsen *et al.*, 1982), se introdujo un peso aproximado de 0,5 g de cada muestra de suelo, y se añadió una disolución de peróxido de hidrógeno y ácido nítrico concentrado de calidad análisis, a un vaso de teflón de alta presión.

Los vasos se introducen en el horno microondas, y pasan por un total de 5 etapas, con las características indicadas en la Tabla 4.

Tabla 4. *Etapas mineralización en microondas.*

<i>Etapa</i>	<i>Tiempo (s)</i>	<i>Potencia (w)</i>
1	60	250
2	60	0
3	300	250
4	300	400
5	300	600

Una vez las muestras están mineralizadas y en frío, se enrasa a 25 ml en un matraz aforado, y se filtra (Figura 5) para su análisis por espectrofotometría de absorción atómica, gracias a la cual podremos conocer la concentración en la muestra de micronutrientes (hierro, cobre, magnesio y zinc), macronutrientes (potasio, sodio, magnesio y calcio) y del metal pesado de estudio (cadmio).

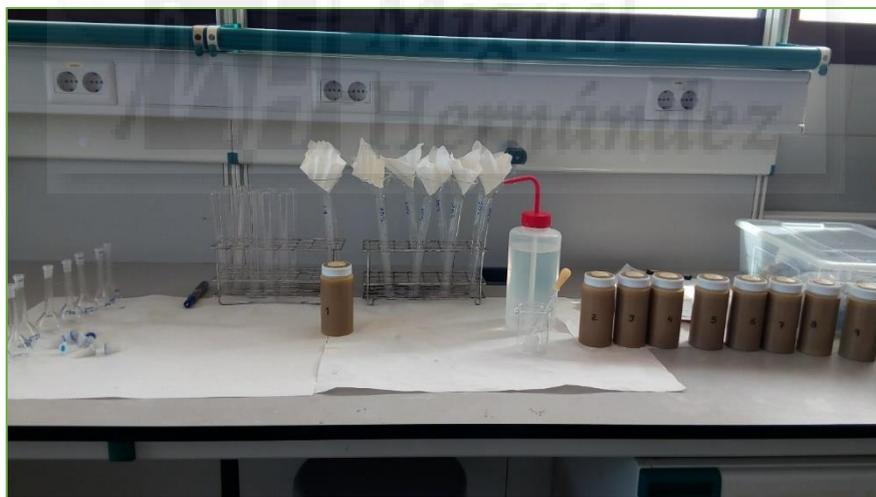


Figura 5. Preparación para el filtrado de las muestras tras el proceso de mineralización.

Micronutrientes asimilables

Se obtuvieron los micronutrientes asimilables mediante el método de extracción con ácido dietilentriaminpentacético (DTPA) de Lindsay y Norwell (1978), basado en una suspensión de suelo y disolución extractora 1:2 en relación peso:volumen, mantenida en agitación durante 2

horas, y posterior filtrado. Gracias a la extracción con DTPA, y al análisis de las muestras por espectrofotometría de absorción atómica, podemos conocer la concentración de micronutrientes (hierro, cobre, magnesio y zinc) y de cadmio que se considera que pueden estar fácilmente disponibles en el suelo para ser absorbidos por la planta.

Macronutrientes asimilables

Para llevar a cabo esta determinación, se empleó el método de extracción con acetato amónico 1N (Briz, 2008). Se preparó una suspensión 1:10 en peso/volumen con la disolución de acetato de amonio 1N a pH 7 (Figura 6). Se llevó a agitación durante media hora, para posteriormente filtrar y analizar las muestras por espectrofotometría de absorción atómica para así conocer la concentración de macronutrientes (potasio, sodio, magnesio y calcio) asimilables, fracción correspondiente también con la de estos elementos intercambiables.



Figura 6. Pesada de las muestras de suelo en la balanza de precisión.

3.3.2. Planta

Contenido total de elementos

Una vez terminadas las 5 semanas de riego con contaminación, se recogieron las partes aéreas de las plantas y se etiquetaron por tratamientos. Se secaron durante 3-4 días en la estufa de aire forzado a 60°C. Una vez finalizado el secado, se molieron. Se llevó a cabo el tratamiento de

mineralización por vía húmeda en microondas, como se ha descrito en el anterior apartado de métodos de análisis en suelos. Dado que las plantas de algunos tratamientos produjeron escaso material vegetal seco (aproximadamente entre 0,3 y 0,6 g), los análisis de la planta se realizaron en muestra compuesta, es decir, las muestras se formaron por la suma del material vegetal de las cuatro muestras de cada tratamiento, para poder realizar réplicas analíticas.

Factor de bioconcentración

Para la estimación de la concentración de metales en la planta se utiliza el factor de bioconcentración (FBC). Este es un parámetro importante que indica la ratio de concentración del metal en la planta con respecto al suelo, que depende de diferentes factores como la temperatura, la textura, el pH o la disponibilidad de nutrientes (Banerjee y Grupta, 2017). Puesto que, de manera general, las plantas adquieren trazas de metales naturalmente disponibles a través del suelo y los almacenan en sus tejidos, como hemos comentado anteriormente.

3.3.3. Tratamiento estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos se realizó la estadística descriptiva de los datos, media y desviación estándar. Además, para comprobar si los tratamientos presentaban diferencias significativas, se realizó también el análisis de varianza (ANOVA) de una vía (Andrés y del Castillo, 2004).

4. Resultados y discusión

En el presente apartado se van a exponer los resultados obtenidos a partir de los análisis realizados a las muestras de suelo y planta, tras su exposición al riego con contaminación inducida por cadmio.

Durante el período que duró el experimento, las plantas sufrieron cambios notables debidos a los distintos tratamientos de riego con contaminación. En el caso de la alfalfa, aunque con un alto potencial de producción de biomasa y es resistente a la contaminación con cadmio, experimentó un crecimiento muy lento, en comparación con la cebada, optamos por sembrar cinco individuos por tiesto considerando que después valoraríamos la concentración en función de la masa total y no del número de individuos. Durante las cinco semanas de riego con contaminación, no llegaron a alcanzar los 20 cm de altura en la parte aérea. Además, se apreció visualmente el efecto del metal contaminante, especialmente en el tratamiento de mayor concentración.



Figura 7. Cebada y alfalfa en el invernadero la cuarta semana de riego con contaminación.

En el caso de la cebada el crecimiento fue más rápido que en el caso de la alfalfa (Figura 7), siendo una planta de mayor porte y con más vigor en sus estadios iniciales, es por ello que optamos por sembrar solamente dos individuos por tiesto. Durante el período de riego con contaminación, se fueron haciendo evidentes las alteraciones que el cadmio generó en las plantas, como la pérdida de turgencia, el marchitamiento o el amarilleo de las hojas, al igual que sucedía con la alfalfa.

En ambas especies, fue muy evidente el menor crecimiento observado en los niveles más altos de cadmio, debido al efecto negativo que causa en ellas. Esta es una de las razones que limitaron la disponibilidad de material vegetal para realizar posteriormente los análisis, por lo que como se ha indicado en materiales y métodos, se optó por una muestra compuesta de material vegetal

procedente de los tiestos de cada tratamiento para poder realizar repeticiones analíticas, frente al deseo inicial de analizar por separado el material vegetal.

4.1. Suelos

4.1.1. Contenido total de elementos

El contenido total de los elementos analizados (macronutrientes como potasio, sodio, calcio y magnesio, y micronutrientes como hierro, manganeso, cobre y zinc, y el cadmio), lo obtuvimos a partir de la mineralización de las muestras en el laboratorio, y su posterior cuantificación por espectrofotometría atómica de absorción y de emisión (esta última solamente en el caso de potasio y sodio). En las anotaciones que aparecerán en los resultados del suelo y la planta, recordamos que en aquellos que aparece la letra “C”, se refieren al cultivo de cebada, mientras que en los que aparece la letra “A”, la planta fitoextractora es la alfalfa.

Macronutrientes: potasio, sodio, calcio y magnesio

En la Figura 8, observamos las concentraciones de los macronutrientes totales del suelo en el que se cultivó cebada, al final de la experimentación.

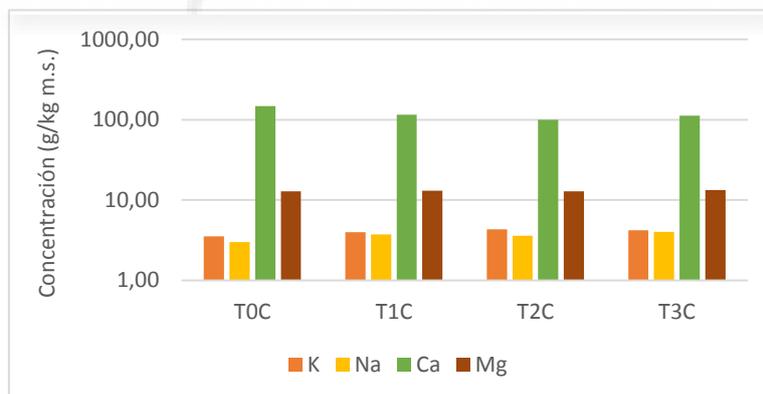


Figura 8. Concentraciones (g/kg materia seca) de macronutrientes totales en suelo sembrado con cebada tras las cinco semanas de riego con contaminante.

Se observa como el calcio es el macronutriente analizado presente en mayor concentración total en el suelo, seguido del magnesio.

Este hecho es similar en el suelo sembrado con alfalfa (Figura 9). Se puede explicar debido a la gran concentración de carbonatos en el suelo, siendo los predominantes los de calcio y magnesio

por el material parental original de los suelos. En este caso, inicialmente los suelos eran Fluvisoles formados a partir de los materiales aluviales que configuraron la Vega Baja del Segura, pero tras decenas de años bajo cultivo, la salinidad y la fertilización han transformado estos suelos antropizándolos, generando Antrosoles (IUSS Grupo de Trabajo WRB, 2007).

La figura 8 y 9 se dispusieron con una escala logarítmica de base 10, ya que los datos cubren una amplia gama de valores, y de esta manera, se permite su mejor visualización.

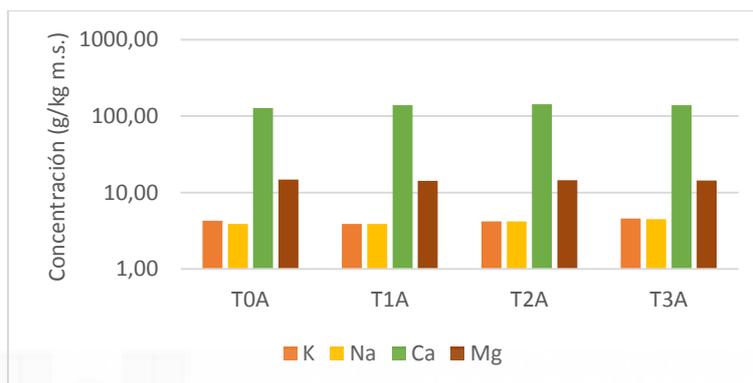


Figura 9. Concentraciones (g/kg materia seca) de macronutrientes totales en suelo sembrado con alfalfa tras las cinco semanas de riego con contaminante.

En la Tabla 5 se muestran los valores medios (med) y la desviación estándar (d.s.) de cada macronutriente por tratamiento una vez finalizado el riego con contaminante, en ella podemos observar más detalladamente el comportamiento de los elementos ante los tratamientos con cadmio.

La concentración total en suelo de potasio y magnesio en ambos casos, sufren muy poca variación a causa de la contaminación debida al agua de riego. Por otro lado, el sodio experimenta un leve aumento de concentración conforme aumenta el contenido en cadmio, comportamiento similar al del calcio en el caso de la alfalfa.

En ningún caso, estos valores muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí, lo que era esperable dada la gran concentración de estos elementos existente en el suelo y la poca influencia que se podría esperar debida a la adición de cadmio. En cualquiera de los casos, la adición de agua de riego, el lavado, podría haber afectado, aunque este hecho es más probable que suceda en el caso de los nutrientes asimilables (intercambiables).

Tabla 5. Composición elemental total en el suelo de K, Na, Ca y Mg (g/kg m.s.).

Tratamiento	K		Na		Ca		Mg	
	med	d.s.	med	d.s.	med	d.s.	med	d.s.
T0C	3,54	0,19	2,99	0,78	147,31	25,78	12,78	1,65
T1C	3,96	0,34	3,72	0,39	115,42	23,37	13,02	0,63
T2C	4,31	0,64	3,59	0,61	99,84	7,65	12,80	1,12
T3C	4,19	0,55	4,01	0,44	112,73	26,54	13,36	2,16
ANOVA	ns		ns		ns		ns	
T0A	4,28	0,88	3,87	0,83	128,07	23,01	14,74	3,27
T1A	3,90	0,26	3,88	0,28	138,89	11,43	14,23	1,28
T2A	4,20	1,06	4,19	0,59	143,27	4,43	14,45	0,23
T3A	4,58	0,59	4,49	0,28	139,26	18,66	14,34	1,40
ANOVA	ns		ns		ns		ns	

ns, *, ** y *** se corresponden respectivamente con: sin diferencia significativa, diferencia para $\alpha=0,05$, $\alpha=0,01$ y $\alpha=0,001$.

Micronutrientes (cobre, hierro manganeso y zinc) y cadmio

En el caso de los micronutrientes, observamos que la concentración más elevada de todos ellos es la de hierro tanto en cebada (Figura 10) como en alfalfa (Figura 11), seguido del manganeso.

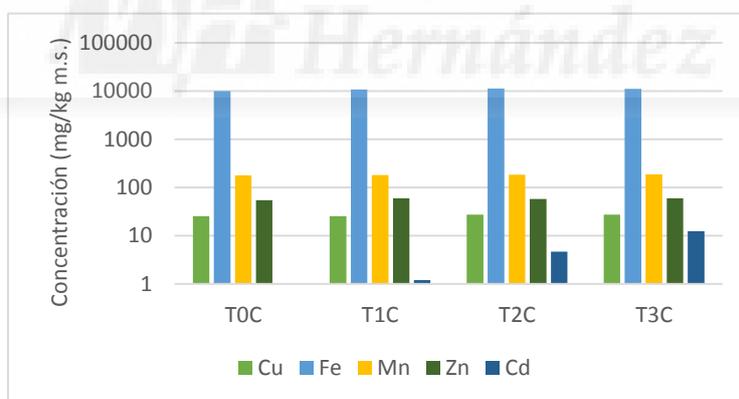


Figura 10. Concentraciones (mg/kg materia seca) de micronutrientes totales en suelo sembrado con cebada tras las cinco semanas de riego con contaminante.

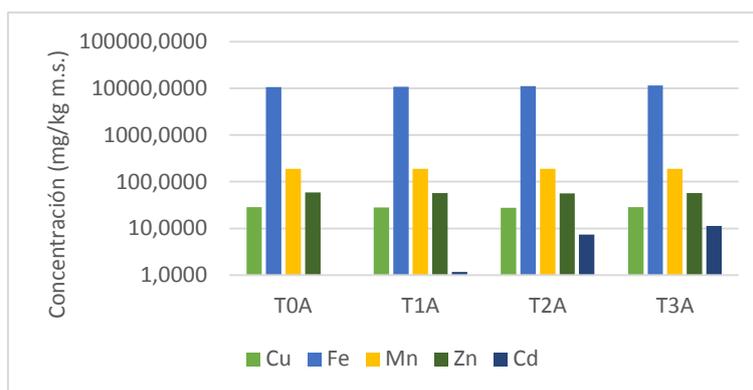


Figura 11. Concentraciones (mg/kg materia seca) de micronutrientes totales en suelo sembrado con alfalfa tras las cinco semanas de riego con cadmio, también representado.

En la Tabla 6, podemos ver cuantificado el valor y las variaciones de los micronutrientes totales en el suelo. Siendo las diferencias muy pequeñas, observamos variaciones en la concentración total de todos los elementos. Destaca por encima de todos ellos el contenido en hierro total, muy asociado probablemente a la mineralogía de estos suelos, donde también suele ser frecuente encontrar carbonatos de hierro (siderita), y óxidos e hidróxidos de este metal.

Tabla 6. Composición elemental total en el suelo de Cu, Fe, Mn, Zn y Cd (mg/kg m.s.).

Tratamiento	Cu		Fe		Mn		Zn		Cd	
	med	d.s.	med	d.s.	med	d.s.	med	d.s.	med	d.s.
T0C	25,48	1,14	9934,00	754,84	179,80	2,59	54,72	2,99	n.d.	n.d.
T1C	25,34	0,71	10742,67	271,14	180,10	4,55	59,90	7,02	1,20	0,33
T2C	27,32	1,69	11338,65	701,12	185,33	2,03	57,66	3,49	4,65	2,14
T3C	27,53	1,43	11010,17	543,28	186,74	3,03	59,43	3,13	12,36	1,94
ANOVA	ns		*		*		ns		***	
T0A	28,76	1,71	10769,15	1844,74	190,04	1,87	58,64	2,72	n.d.	
T1A	28,03	1,03	10824,25	804,91	187,92	3,69	56,86	2,81	1,17	0,14
T2A	27,69	2,49	11256,21	1605,67	188,79	1,67	56,45	6,13	7,39	1,46
T3A	28,45	1,94	11582,08	566,68	188,93	2,65	57,34	4,87	11,35	1,62
ANOVA	ns		ns		ns		ns		***	

ns, *, ** y *** se corresponden respectivamente con: sin diferencia significativa, diferencia para $\alpha=0,05$, $\alpha=0,01$ y $\alpha=0,001$.

Como hemos comentado anteriormente, la prueba del análisis de varianza nos sirve para ver las diferencias entre tratamientos para un mismo elemento. En este caso, encontramos escasas diferencias no significativas para el caso del cobre, hierro, manganeso y zinc.

Sin embargo, los tratamientos con riego contaminante han influido en el caso del cadmio en los suelos de ambos cultivos. Para ambos, encontramos diferencias significativas entre

tratamientos, y el nivel basal de cadmio (tratamiento T0) queda por debajo del límite de detección del espectrofotómetro de absorción atómica empleado ($[Cd] < 0,1 \text{ mg/l}$, patrón más bajo empleado de $0,1 \text{ mg/l}$).

4.1.2. Macronutrientes asimilables

Los macronutrientes asimilables, los obtuvimos mediante extracción con acetato amónico 1N y posterior análisis mediante espectrofotometría de absorción atómica, siendo equivalentes los valores obtenidos a la concentración de los elementos biodisponibles o asimilables por las plantas.

En el caso de los suelos de cultivo con cebada, se observa que hay mucho calcio asimilable en el suelo (Figura 12). Este hecho es esperable dada la naturaleza caliza de los suelos. Lo mismo sucede en el caso de los suelos donde se cultivó alfalfa (Figura 13). Tras el calcio, el magnesio no ocupa el segundo lugar en importancia porque en ambos casos es el sodio el elemento que se encuentra en mayores concentraciones. Esta biodisponibilidad de sodio está estrechamente asociada a la naturaleza salina de los suelos que, entre otras razones, debe haber sido influenciada por la salinidad de las aguas de riego empleadas a lo largo del tiempo, característica que han adquirido muchos suelos de esta zona. Esta es una de las razones por las que se cultiva en la parcela origen del suelo, el granado (*Punica granatum*), considerado una especie tolerante a la salinidad.

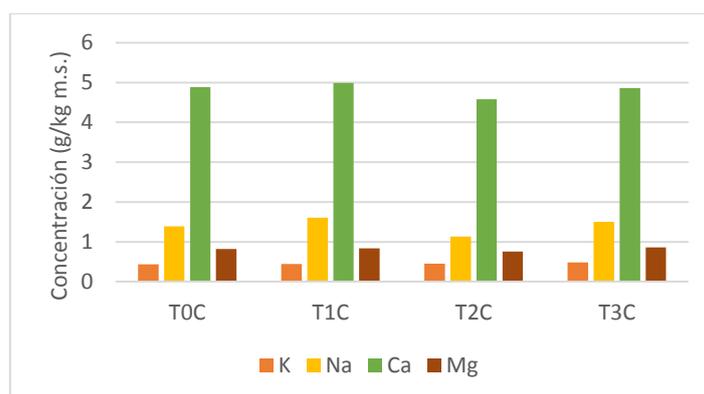


Figura 12. Concentraciones (g/kg materia seca) de macronutrientes asimilables en suelo tras las cinco semanas de riego con contaminante.

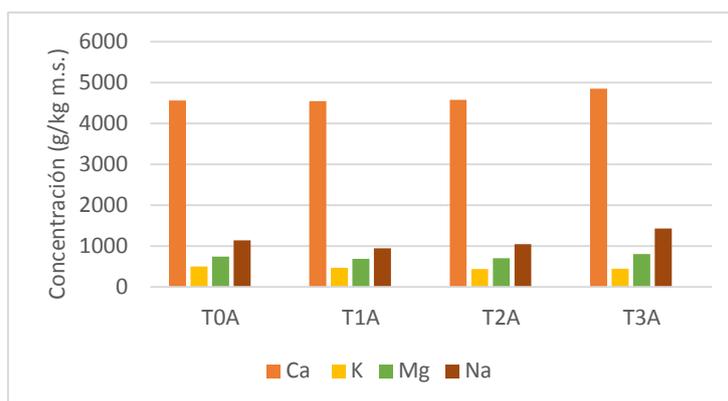


Figura 13. Concentraciones (g/kg materia seca) de macronutrientes asimilables en suelo tras las cinco semanas de riego con contaminante.

En la Tabla 7, podemos observar los datos numéricos que corroboran la alta disponibilidad de calcio, manteniéndose prácticamente estable independientemente de los tratamientos, al igual que los demás elementos. Prácticamente no existen diferencias significativas entre los tratamientos como se aprecia en la tabla, aunque en el caso del suelo cultivado con alfalfa, muestra una ligera significancia probablemente debido al tratamiento T1A, que pudo tener una mayor fitoextracción o lavado de sales.

Tabla 7. Composición elemental total en el suelo de K, Na, Ca y Mg (g/kg m.s.).

Tratamiento	K		Na		Ca		Mg	
	med	d.s.	med	d.s.	med	d.s.	med	d.s.
T0C	0,44	0,02	1,39	0,58	4,89	0,36	0,82	0,16
T1C	0,44	0,04	1,60	0,19	4,99	0,12	0,83	0,07
T2C	0,45	0,02	1,14	0,32	4,58	0,41	0,75	0,07
T3C	0,48	0,04	1,51	0,27	4,86	0,29	0,86	0,07
ANOVA	ns		ns		ns		ns	
T0A	0,50	0,07	1,14	0,33	4,57	0,36	0,74	0,09
T1A	0,47	0,00	0,94	0,18	4,55	0,08	0,69	0,05
T2A	0,44	0,04	1,05	0,08	4,58	0,42	0,71	0,03
T3A	0,45	0,02	1,43	0,19	4,85	0,26	0,80	0,04
ANOVA	ns		*		ns		ns	

ns, *, ** y *** se corresponden respectivamente con: sin diferencia significativa, diferencia para $\alpha=0,05$, $\alpha=0,01$ y $\alpha=0,001$.

Si comparamos estos datos con la caracterización inicial del suelo (Tabla 2), podemos apreciar como los elementos asimilables (extracción con acetato amónico) han disminuido su contenido en el suelo. En el caso del potasio aproximadamente 1/3, algo más de 2/3 en el caso del sodio, la mitad en el caso del calcio y del magnesio. Este hecho, como se ha reseñado con anterioridad

para comentar el sodio, puede deberse a los lavados que los intensos riegos (200 ml, dos veces por semana) han producido en el suelo ya que se permitía la lixiviación libre para evitar encharcamientos.

4.1.3. Micronutrientes asimilables

Los micronutrientes asimilables fueron extraídos mediante DTPA, como se ha indicado en la metodología, y posteriormente fueron analizados mediante espectrofotometría de absorción atómica.

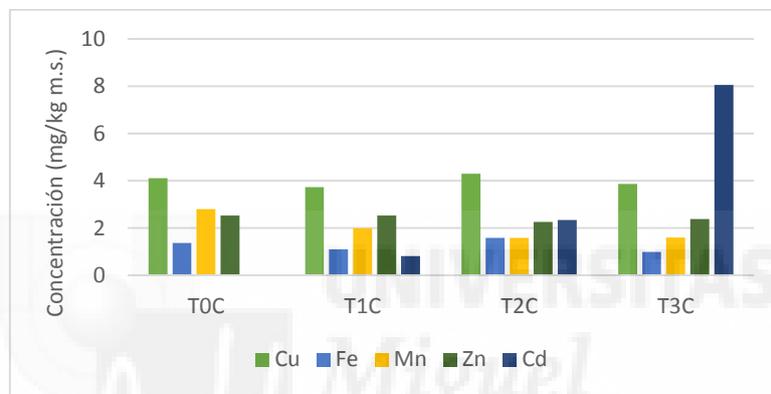


Figura 14. Concentraciones (mg/kg materia seca) de micronutrientes asimilables en suelo tras las cinco semanas de riego con contaminante.

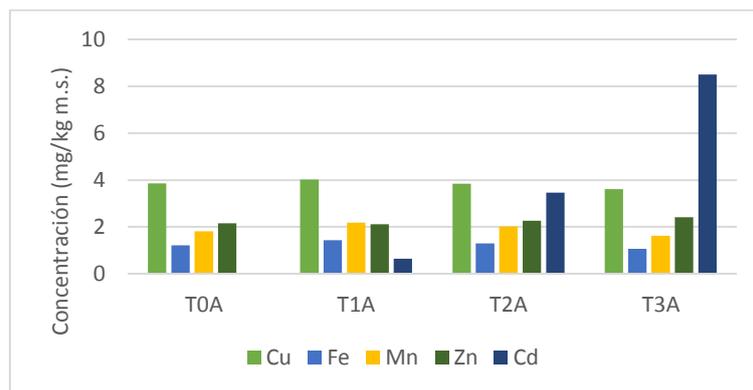


Figura 15. Concentraciones (mg/kg materia seca) de micronutrientes asimilables en suelo tras las cinco semanas de riego con contaminante.

Como era de esperar, lo más destacable en la Figura 14 es la gran concentración de cadmio biodisponible para las plantas en el tratamiento más alto (T3), tanto para la cebada como para

la alfalfa (Figura 15). También es reseñable la elevada concentración de cobre asimilable frente al resto de micronutrientes estudiados.

Como podemos observar en la Tabla 8, la concentración de cobre asimilable es relativamente alta comparado con los otros elementos, lo que puede ser debido a los tratamientos fitosanitarios, que suelen emplear como fungicidas, productos en los que en su formulación aparecen compuestos de cobre (por ejemplo, el oxiclورو de cobre). Los micronutrientes hierro y manganeso experimentan un descenso en su biodisponibilidad conforme se incrementa el tratamiento con cadmio, haciendo visibles los efectos del contaminante.

En el caso los suelos con el cultivo de alfalfa, la concentración de cobre disponible es algo menor que para la cebada, la cual experimenta un leve descenso conforme aumenta la concentración disponible de cadmio, efecto similar al sufrido por el hierro. En el caso del manganeso se hace visible un leve aumento de la concentración para posteriormente descender hasta el valor más bajo en el T3. Sin embargo, el zinc sufre un leve aumento en su concentración.

A pesar de estas observaciones, no parece haber significancia estadística en los contenidos de micronutrientes asimilables analizados. Solamente en el caso del cadmio se aprecia significancia estadística sobre la base del test ANOVA y a la vista de la desviación estándar de las medias.

Tabla 8. Composición elemental total en el suelo de Cu, Fe, Mn, Zn y Cd (mg/kg m.s.).

Tratamiento	Cu		Fe		Mn		Zn		Cd	
	med	d.s.								
T0C	4,11	0,44	1,37	0,32	2,80	1,15	2,53	0,36	n.d.	n.d.
T1C	3,73	0,27	1,11	0,15	2,00	0,40	2,53	0,16	0,82	0,07
T2C	4,30	0,58	1,58	0,38	1,58	0,21	2,26	0,25	2,35	1,00
T3C	3,86	0,30	0,99	0,06	1,60	0,25	2,38	0,12	8,05	1,21
ANOVA	ns		ns		ns		ns		***	
T0A	3,86	0,30	1,21	0,16	1,82	0,23	2,15	0,22	n.d.	n.d.
T1A	4,02	0,29	1,43	0,25	2,18	0,41	2,12	0,08	0,64	0,12
T2A	3,84	0,48	1,30	0,28	2,02	0,19	2,26	0,15	3,46	0,60
T3A	3,61	0,30	1,07	0,05	1,62	0,22	2,42	0,17	8,50	1,11
ANOVA	ns		ns		ns		ns		***	

ns, *, ** y *** se corresponden respectivamente con: sin diferencia significativa, diferencia para $\alpha=0,05$, $\alpha=0,01$ y $\alpha=0,001$.

Si comparamos estos valores, con los del suelo iniciales que aparecen en la Tabla 2 del apartado de materiales y métodos, podemos apreciar como el riego ha favorecido en alguna medida la disponibilidad de cobre y de hierro, y reducido en parte la de los otros dos micronutrientes analizados, manganeso y zinc.

4.2. Planta

4.2.1. Composición elemental

Los valores de concentración de los nutrientes analizados en la planta y el cadmio, se han obtenido a partir de la mineralización de la muestra por vía húmeda, en horno microondas. Para tener datos orientativos de cuáles son los valores normales de concentración en estas especies, recurrimos a los establecidos para la parte aérea de la cebada (Tabla 9) y la alfalfa (Tabla 10) en la conocida obra de Jones *et al.* (1991): “Plant analysis handbook”. En ellos no se incluye al sodio, ya que no está considerado como elemento esencial para estas plantas, aunque en el presente estudio sí se ha tenido en cuenta, debido a su especial relevancia al desarrollarse la experimentación sobre un suelo salino (una de las premisas diferenciales de este estudio que se suma al efecto debido al cadmio).

Tabla 9. Valores normales de nutrientes en planta de cebada. Fuente: Jones *et al.*, 1991.

	Concentración (g/kg m.s.)		Concentración (mg/kg m.s.)
K	15 a 30	Cu	5 a 25
Ca	3 a 12	Fe	50 a 150
Mg	1,5 a 5	Mn	25 a 100
		Zn	15 a 70

Tabla 10. Valores normales de nutrientes en planta de alfalfa. Fuente: Jones *et al.*, 1991.

	Concentración (g/kg m.s.)		Concentración (mg/kg m.s.)
K	20 a 35	Cu	7 a 30
Ca	18 a 30	Fe	30 a 250
Mg	3 a 10	Mn	31 a 100
		Zn	21 a 70

Macronutrientes

Como muestra la Figura 16, el macronutriente en mayor concentración en la planta es el calcio, elemento clave en la estructura vegetal. Presenta una concentración mayor que los demás elementos, destacando especialmente en el tratamiento T3, cuya concentración en la parte aérea de la alfalfa (Figura 17), es más del doble que la del resto de elementos.

El potasio se mantiene en concentraciones muy similares en todos los tratamientos en el caso de la alfalfa, para disminuir de manera pronunciada en el último de ellos tratamiento. Las

funciones que tiene este nutriente esencial, entre otras, están asociadas al transporte de fluidos y el crecimiento vegetal, por lo que una disminución en su contenido es sintomática de una menor producción de biomasa.

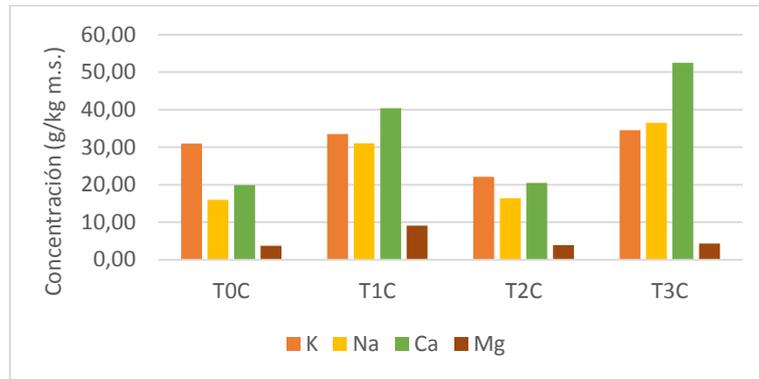


Figura 16. Concentraciones (g/kg materia seca) de macronutrientes totales en la planta de cebada tras las cinco semanas de riego con contaminante.

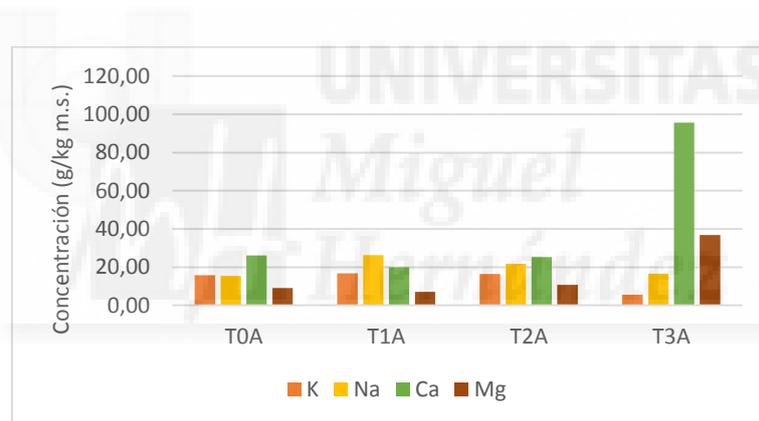


Figura 17. Concentraciones (g/kg materia seca) de macronutrientes totales en la planta de alfalfa tras las cinco semanas de riego con contaminante.

En la Tabla 11, observamos los valores medidos de medias y desviaciones estándar para los diferentes elementos. En el caso de la composición elemental de la cebada, los valores de potasio y magnesio pueden considerarse normales atendiendo a la Tabla 9, mientras que las mayores diferencias se observan en el caso del calcio. Este elemento se absorbe por la planta como catión divalente, al igual que el cadmio, cuyo radio iónico es similar (Navarro-Pedreño *et al.*, 1997). Difiere en ambos el mecanismo de absorción que en el caso del calcio puede ser activo y pasivo, mientras que en el cadmio predomina la absorción pasiva con el flujo de agua a través de las raíces (Guardiola y García, 1990; Azcón-Bieto y Talón, 1993). Puede existir una interacción entre ambos elementos, de manera que, a niveles bajos de contaminación, se estimule la

absorción de calcio, al igual que a niveles altos. En cualquier caso, no podemos afirmar este hecho de manera consistente a la luz de los datos disponibles.

En el caso de la alfalfa, especie que presenta cierta tolerancia al cadmio (Peralta-Videa *et al.*, 2002), es el potasio el que sufre un descenso muy pronunciado, y el calcio y magnesio unos niveles muy elevados en el tratamiento T3A, muy por encima de los rangos que se consideran normales. En este caso, tanto la reducción del crecimiento como los efectos entre cationes divalentes podrían ser el origen de estas disfuncionalidades. En cualquier caso, se hace necesario profundizar en la investigación para tener resultados fiables.

Tabla 11. Contenido total de K, Na, Ca y Mg en planta (g/kg m.s.).

Tratamiento	K		Na		Ca		Mg	
	med	d.s.	med	d.s.	med	d.s.	med	d.s.
T0C	30,92	0,09	15,93	0,04	19,89	0,75	3,67	0,03
T1C	33,51	0,18	31,02	0,41	40,39	1,72	9,05	0,05
T2C	22,07	0,18	16,37	0,03	20,51	4,87	3,90	0,02
T3C	34,48	0,12	36,50	0,15	52,51	4,69	4,29	0,01
T0A	15,80	0,07	15,50	0,01	26,20	0,21	9,11	0,01
T1A	16,74	0,05	26,34	0,11	19,88	0,56	7,14	0,03
T2A	16,45	0,06	21,75	0,23	25,29	1,52	10,71	0,13
T3A	5,64	0,00	16,64	0,01	95,65	3,70	36,83	0,56

Micronutrientes

En el caso de los micronutrientes, el que presenta mayores concentraciones en las plantas analizadas es el hierro, el cual produce dos comportamientos opuestos. Por un lado, experimenta un acusado descenso conforme aumenta el contenido de cadmio en la cebada (Figura 18), mientras que, en el caso de la alfalfa, presenta variaciones y un desmesurado incremento en el tratamiento más contaminante (Figura 19). En esta última figura, los datos en el eje de ordenadas se representan de forma logarítmica para facilitar la visualización de las concentraciones de todos los elementos representados.

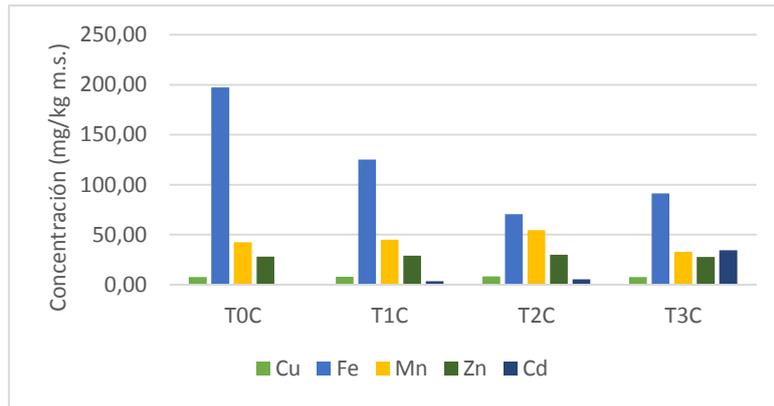


Figura 18. Concentraciones (mg/kg materia seca) de micronutrientes totales en la planta de cebada tras las cinco semanas de riego con contaminante.

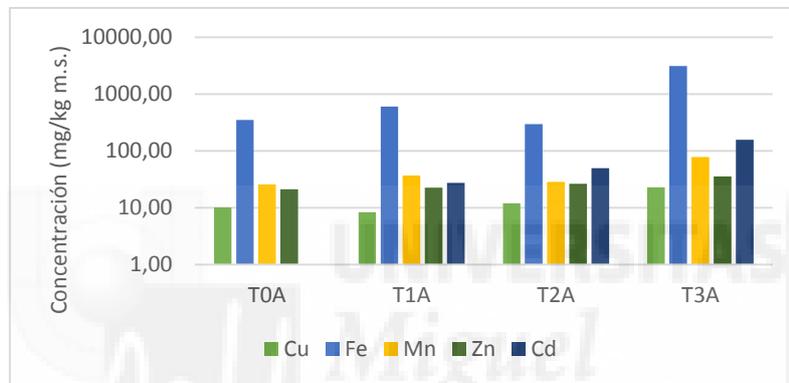


Figura 19. Concentraciones (mg/kg materia seca) de micronutrientes totales en la planta de alfalfa tras las cinco semanas de riego con contaminante.

Como hemos comentado con ayuda de las figuras anteriores, hay un aumento considerable de hierro en la parte aérea de la alfalfa, cuyos datos numéricos están representados en la Tabla 12. Esto hecho es inicialmente complejo de explicar, ya que se trata de una alteración nutricional severa en las plantas del nivel más alto de contaminación. Podría pensarse en un posible mecanismo de defensa de la planta, acumulando hierro, dada su importancia como elemento estructural de la clorofila (Barceló *et al.*, 2005).

En general, los rangos de concentración en la mayoría de los tratamientos se encuentran dentro de los intervalos de normalidad establecidos por Jones *et al.* (1991).

Tabla 12. Contenido total de Cu, Fe, Mn, Zn y Cd en planta (mg/kg m.s.).

Tratamiento	Cu		Fe		Mn		Zn		Cd	
	med	d.s.	med	d.s.	med	d.s.	med	d.s.	med	d.s.
T0C	7,67	0,02	197,26	1,36	42,46	0,07	27,94	0,11	n.d.	n.d.
T1C	8,01	0,05	125,25	1,86	45,04	0,30	29,08	0,26	3,58	0,15
T2C	8,16	0,12	70,65	0,69	54,40	0,24	29,94	0,08	5,35	0,04
T3C	7,70	0,03	91,42	1,11	32,73	0,19	27,76	0,02	34,46	0,20
T0A	10,13	0,13	347,91	3,93	25,68	0,42	20,95	0,03	n.d.	n.d.
T1A	8,32	0,00	604,25	3,46	36,82	0,07	22,58	0,01	27,18	0,19
T2A	11,90	0,12	296,26	3,23	28,53	0,32	26,12	0,07	49,23	0,58
T3A	22,79	0,23	1656,25	2,58	77,74	0,52	35,17	0,17	156,18	0,93

Conviene destacar los efectos de acumulación de cadmio por parte de la cebada y la alfalfa. Es muy relevante que la concentración de cadmio en las plantas de alfalfa alcance valores casi cinco veces superiores a los que acumula la cebada en su parte aérea. Esta situación, podría indicar que la alfalfa es más eficiente como planta fitoextractora de cadmio en la parte aérea que la cebada, al menos por lo que a concentración se refiere. En estas circunstancias, sería deseable poder realizar nuevos experimentos que pudieran poner de manifiesto la relación no solo con la concentración, sino con el contenido total extraído en función de la producción de biomasa de las plantas ensayadas. A este respecto, la alfalfa es capaz de aguantar varios ciclos de producción, siega y rebrote, por lo que podría tener ventajas sobre la cebada.

4.2.2. Factor de bioconcentración (FBC)

En consonancia con lo comentado en el apartado anterior, se calcula el factor de bioconcentración (FBC). Este nos indica la ratio del elemento en la planta con respecto al elemento en el suelo. Establecemos dos cálculos, el primero de ellos considerando la composición elemental del suelo (Tabla 13), y en segundo lugar el que tiene un sentido nutricional más directo, el que relaciona los elementos biodisponibles en el suelo con la composición de las plantas (Tabla 14).

El factor de bioconcentración nos da información muy relevante sobre la posibilidad de absorción activa por parte de la planta de determinados nutrientes. Así, por ejemplo, podemos apreciar como la concentración de potasio en la planta es ocho veces mayor en la parte aérea de la cebada que la del suelo, y aproximadamente tres o cuatro veces mayor en el caso de la alfalfa. En el caso del sodio, su presencia como elemento muy móvil favorece la entrada del

mismo en las plantas. Reseñar que en general el resto de elementos se encuentran en menor concentración en la planta que con relación al contenido total en el suelo, exceptuando el caso del cadmio y alguna disfuncionalidad que puede deberse precisamente a la influencia de este metal (reducción del FBC de potasio en alfalfa o incremento excesivo para el magnesio).

Tabla 13. Factores de bioconcentración por elementos en planta respecto al total en suelo.

	Macronutrientes				Micronutrientes				
	K	Na	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn	Cd
T0C	8,74	5,33	0,13	0,29	0,30	0,02	0,24	0,51	0,00
T1C	8,46	8,35	0,35	0,70	0,32	0,01	0,25	0,49	2,99
T2C	5,13	4,56	0,21	0,30	0,30	0,01	0,29	0,52	1,15
T3C	8,23	9,10	0,47	0,32	0,28	0,01	0,18	0,47	2,79
T0A	3,69	4,01	0,20	0,62	0,35	0,03	0,14	0,36	0,00
T1A	4,29	6,79	0,14	0,50	0,30	0,06	0,20	0,40	23,16
T2A	3,68	5,74	0,17	0,75	0,43	0,03	0,15	0,46	6,66
T3A	1,23	3,70	0,69	2,57	0,80	0,14	0,41	0,61	13,76

Tabla 14. Factores de bioconcentración por elementos en planta respecto a la concentración asimilable en suelo.

	Macronutrientes				Micronutrientes				
	K	Na	Ca	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn	Cd
T0C	70,56	11,48	4,07	4,47	1,87	143,93	15,14	11,06	0,00
T1C	75,40	26,73	8,09	10,86	2,15	113,22	22,57	11,52	4,38
T2C	49,17	14,42	4,48	5,17	1,90	44,62	34,36	13,23	2,28
T3C	71,74	24,24	10,81	4,98	1,99	92,00	20,45	11,65	4,28
T0A	31,78	13,65	5,74	12,35	2,62	286,77	14,13	9,73	0,00
T1A	35,59	27,95	4,37	10,38	2,07	421,37	16,86	10,67	42,47
T2A	37,48	20,74	5,53	15,19	3,10	228,01	14,16	11,56	14,22
T3A	12,61	11,66	19,73	45,82	6,32	1555,2	47,95	14,52	18,38

Cuando nos referimos a los elementos asimilables, por lo general, las concentraciones en la planta son muy superiores a las de la concentración de elementos extraídos con DTPA en el suelo. Los valores del FBC en el caso del calcio, por ejemplo, son menores debido a su alta presencia en el suelo, aunque aumenta su concentración en el último tratamiento.

Destacar en el caso de los micronutrientes, el hierro. Este elemento es el que cuenta con mayor FBC dadas sus elevadas concentraciones en la planta, destacando especialmente en el

tratamiento T3A. Su función esencial en la fotosíntesis y por tanto en la producción de energía y compuestos fotosintéticos para el desarrollo vegetal, queda patente en este FBC.

Nuevamente destaca que los tratamientos con cadmio incrementan el contenido en la parte aérea de la planta, es decir, la parte que permite la fitoextracción del contaminante. En este caso, sigue siendo la alfalfa la especie que cuenta con mayor bioconcentración de cadmio, destacando su facilidad para acumularlo a niveles bajos de contaminación (T1).



5. Conclusiones

De acuerdo a los objetivos expuestos inicialmente, se han obtenido las siguientes conclusiones:

Las diferentes concentraciones de cadmio en el agua de riego no afectaron de manera significativa a la composición elemental del suelo. En el caso de los macronutrientes, calcio y sodio son los más abundantes. Considerando los micronutrientes, hierro y manganeso son los más abundantes en el suelo.

Considerando la concentración de los elementos asimilables, sodio y calcio vuelven a ser los más relevantes, dada la mineralogía del suelo, y el cobre como micronutriente es el que encontramos con mayor biodisponibilidad en el suelo.

Resaltar el comportamiento del cadmio, el cual aumenta su concentración asimilable y total en suelo a medida que aumenta el contenido en el tratamiento del agua de riego, haciéndolo más biodisponible para plantas y acumulándose en el suelo.

La observación del crecimiento de las plantas bajo diferentes concentraciones de cadmio se realizó de manera cualitativa durante el período del experimento. Los tratamientos más altos con cadmio tuvieron un efecto negativo sobre las dos especies vegetales, las cuales disminuyeron su producción de biomasa y afrontaron problemas fisiológicos, prueba del carácter tóxico del contaminante elegido. Aun así, las especies parece ser que desarrollaron diferentes mecanismos para acumular cadmio en los tejidos vegetales de la parte aérea de la planta.

En el caso de los nutrientes en la planta, los efectos más significativos se apreciaron en la concentración de calcio y de hierro. Los resultados parecen indicar que el calcio tiene una relación directa con el cadmio, puesto que, en general, aumenta a medida que lo hace el contaminante. En el caso de la cebada, la concentración de hierro en la parte aérea de la planta disminuye conforme hay más concentración de cadmio, comportamiento diferente en el caso de la alfalfa, donde el hierro aumenta en el tratamiento más alto. Probablemente se vea involucrado en algún mecanismo de defensa ante las alteraciones nutricionales sufridas.

Con respecto a la influencia de la salinidad en el proceso, observamos que el alto contenido en sales del suelo no parece favorecer el crecimiento de las plantas (comparando el desarrollo con el período de germinación en turba), así como tampoco su capacidad para acumular cadmio.

Una vez concluido el estudio y analizados sus resultados, parece adecuado proponer a la alfalfa como especie con capacidad de fitoextracción, dada su eficiencia de acumulación del metal estudiado en la parte aérea de la planta.

Como proyección futura se considera oportuna la realización de más estudios exhaustivos, sobre la relación de algunos nutrientes como el calcio o el hierro con el cadmio, así como los mecanismos de defensa que llevan a cabo las diferentes especies vegetales para tolerar altas concentraciones del metal en cuestión.



6. Referencias

- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentasti, E., Sarzanini, C., Barberis, R. (2002). Distribution and mobility of metals in contaminated sites. Chemometric investigation of pollutant profiles. *Environmental pollution*, 119(2), 177-193.
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals- Concepts and applications. *Chemosphere*, 91, 869-881.
- Andrés, A. M., del Castillo, J. D. D. L. (2004). *Bioestadística para las ciencias de la salud (+)*. Granada, España: Capitel editores.
- Azcón-Bieto, J., Talón, M. (1993). *Fisiología y bioquímica vegetal*. Madrid, España: Interamericana-McGraw-Hill.
- 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. et al. (2000). *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Boca Raton, Florida, USA: Lewis Publishers.
- Banerjee, U. S., Gupta, S. (2017). Metal Contamination in Cultivated Vegetables and Agricultural Soils Irrigated with Untreated Industrial Wastewater. *Environmental Pollution and Protection*, 2(1), 15-22.
- Barceló, J., Nicolás, G., Sabater, B., Sánchez, R. (2005). *Fisiología vegetal*. Madrid, España: Pirámide.
- Brix, H. (2008) Soil Exchangeable Bases (Ammonium Acetate Method). Recuperado de http://www.protocol-_soil_exchangeable_bases_CEC_20081127.doc
- Brooks, R. R., Lee, J., Reeves, R. D., Jaffré, T. (1977). Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration*, 7, 49-57.
- CAPA, Departamento de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Comunidad Valenciana, España (2002). *Informe del sector agrario valenciano 2001*. Recuperado de <http://www.gva.es>
- Chaffai, R., Koyama, H (2011). Heavy metal tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Advances in Botanical Research*, 60, 1-49.

- Choppala, G. et al. (2014). Cellular mechanisms in higher plant governing tolerance to cadmium toxicity. *Critical reviews in plant sciences*, 33(5), 374-391.
- Coccosis H.N. (1991). Historical land use changes: Mediterranean regions in Europe. *Land use changes in Europe: processes of change, environmental transformations and future patterns*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Comisión de las Comunidades Europeas, C. C. E. (2008). Hacia una estrategia temática para la protección del suelo. Comunicación de la comisión al consejo, el Parlamento Europeo, el comité económico y social y el comité de las regiones. Bruselas.
- Doner H.E. (1978). Chloride as a factor in mobilities of Ni (II), Cu (II), and Cd (II) in soil. *Soil Science Society of America Journal* 42, 882-885.
- Duffus, J. H. (2002). "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and applied chemistry*, 74(5), 793-807.
- Förstner, U., Wittmann, G. T. W. (1983). *Metal pollution in the aquatic environment*. New York, USA: Springer-Verlag.
- Freitas, H., Prasad, M. N. V., Pratas, J. (2004). Heavy metals in the plant community of Sao Domingos, an abandoned mine in SE Portugal: possible applications in mine remediation. *Environmental International*, 30(1), 65-72.
- Garbisu, C., Hernández-Allica, J., Barrutia, O., Alkorta, I., Becerril, J. M. (2002). Phytoremediation: a technology using green plants to remove contaminants from polluted areas. *Environmental Health*, 17, 75-90.
- García, I., Dorronsoro, C. (2005). Contaminación por metales pesados. En Tecnología de suelos. Recuperado de <http://edafologia.ugr.es>.
- Glazer N, A., Nikaido, H. (1998). *Microbial biotechnology*. New York, USA: W.H. Freeman and Company.
- González, A., Chumillas, V., Lobo M. C. (2012). Effect of Zn, Cd and Cr on growth, water status and chlorophyll content of barley plants (*H. vulgare* L.). *Agricultural Sciences*, 3(4), 572-581.
- González, A., Lobo, M.C. (2013). Growth of four varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.) in soils contaminated with heavy metals and their effects on some physiological traits. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 1799-1810.

- Guardiola, J. L., & García, A. (1990). *Fisiología vegetal I: nutrición y transporte*. Madrid, España: Síntesis.
- Harper, J. F. (2000). Heavy metal pimps in plants. *Government reports announcements & index*, 22, 15-24.
- Hattab, S., Boussetta, H., Banni, M. (2014). Influence of nitrate fertilization on Cd uptake and oxidative stress parameters in alfalfa plants cultivated in presence of Cd. *Journal of soil science and plant nutrition*, 14(1), 1-11.
- Hernández-Allica, J., Becerril, J. M., Zárate, O., Garbisu, C. (2006). Assessment of the efficiency of a metal phytoextraction process with biological indicators of soil health. *Plant and Soil*, 281, 147-158.
- WRB, I. G. D. T. (2007). Base Referencial Mundial del Recurso Suelo. *Primera actualización*.
- Jagodín, B. A., Govorina, V. V., Vinogradova, S. B., Zamaraev, A. G., Chapovskaja, G. V. (1995). Cadmium and lead accumulation in some agricultural crops, grown in podzolic soils. *Izvestija TSHA*, 2, 85-99.
- Jones Jr, J. B., Wolf, B., & Mills, H. A. (1991). *Plant analysis handbook. A practical sampling, preparation, analysis, and interpretation guide*. Georgia, USA: Micro-Macro Publishing, Inc.
- Jugo, S. (1977). Metabolism of toxic heavy metal in growing organism: a review. *Environmental research*, 13(1), 36-46.
- Kabata-Pendias, A. (2000). *Trace elements in soils and plants* (315). Boca Raton, Florida, USA: CRC press.
- Kandeler, E., Kampichler, C., Horak, O. (1996). Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils*, 23(3), 299-306.
- Knudsen, D., Peterson, G. A., Pratt, P. F. (1982). Lithium, sodium, and potassium. *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*, 225-246.
- Konen, M. E., Jacobs, P. M., Burras, C. L., Talaga, B. J., Mason, J. A. (2002). Equations for predicting soil organic carbon using loss-on-ignition for north central US soils. *Soil Science Society of America Journal*, 66(6), 1878-1881.

- Lara-Viveros, F. M. et al. (2015). Contenido de Cd y Pb en suelo y plantas de diferentes cultivos irrigados con aguas residuales en el Valle del Mezquital, Hidalgo, México. *Revista Internacional de contaminación ambiental*, 31(2), 127-132.
- Lindsay, W. L., Norvell, W. A. (1978). Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil science society of America journal*, 42(3), 421-428.
- Llugany, M., Tolrà, R., Poschrieder, C., Barceló, J. (2007). Hiperacumulación de metales: ¿una ventaja para la planta y para el hombre? *Revista Ecosistemas*, 16(2).
- Macnair, M. R. (2003). The hyperaccumulation of metals by plants. *Advances in Botanical Research* 40, 63-105.
- McGrath, S. P., Sidoli, C. M. D., Baker, A. J. M., Reeves, R. D. (1993). *Integrated Soil and Sediment Research: A Basis for proper Protection*: Kluwer Academic Publishers
- McGrath, S. P., Lombi, E., Gray, C. W., Caille, N., Dunham, S. J., Zhao, F. J. (2006). Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Environmental Pollution*, 141(1), 115-125.
- Méndez, J. P., Ramírez, C. A. G., Gutiérrez, A. D. R., García, F. P. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 29-44.
- Micó C., Llopis, C. M., Peris, M., Sánchez, J., Recatala, L. (2006). Heavy metal content of agricultural soils in a Mediterranean semiarid area: the Segura River Valley (Alicante, Spain). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4(4), 363-372.
- Mortvedt, J. J., Beaton, J. D. (1995). Heavy metal and radionuclide contaminants in phosphate fertilizers. *Scope-scientific Committee on Problems of the Environment International Council of Scientific Unions*, 54, 93-106.
- Nowak, B., 1995. Sequential extraction of metal forms in the soil near a roadway in southern Poland, *Analyst*, 120, 737-739.
- Navarro-Pedreño, J., Gómez, I., Moral, R., Palacios, G., Mataix, J. (1997). Heavy metals and plant nutrition and development. *Recent Research Developments in Phytochemistry*, 1, 173-179.
- Olabarrieta, I. et al (2001). Efecto in vitro del cadmio en dos diferentes modelos de células animales. *Toxicology in vitro*, 15, 511-517.

- Peralta-Videa, J. R. et al. (2002). Potential of alfalfa plant to phytoremediate individually contaminated montmorillonite soils with Cd (II), Cr (VI), Cu (II), Ni (II) and Zn (II). *Environmental contamination toxicity*, 69, 74-81.
- Pineda, H. R. (2004). Presencia de hongos micorrízicos arbusculares y contribución de *Glomus intraradices* en la absorción y translocación de cinc y cobre en girasol (*Helianthus annuus* L.) crecido en un suelo contaminado con residuos de mina (Doctoral dissertation, Tesis para Obtener el Grado de Doctor en Ciencias Universidad de Colima. Tecoman, Colima).
- Rauret, G. (1998). Extraction procedures for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment. *Talanta*, 46(3), 449-455.
- Rhoades, J. D. (1982). Soluble salts. *Methods of soil analysis. Part, 2(2)*, 167-178.
- Robinson, B. H., Chiarucci, A., Brooks, R. R., Petit, D., Kirkman, J. H., Gregg, P. E. H., De Dominicis, V. (1997). The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. *Journal of Geochemical Exploration*, 59(2), 75-86.
- Rodríguez, O. R. (2011). Capacidad de extracción de cationes mediante acetato de amonio, acetato de sodio y cloruro de amonio. *Interciencia*, 36(3), 219-223.
- Rosa, C. E. V., Sierra, M., Radetski, C. M. (1999). Use of plant tests in the evaluation of textile effluent toxicity. *Ecotoxicology Environmental Research*, 2, 56-61.
- Sahuquillo, A., Rigol, A., Rauret, G. (2003). Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(3), 152-159.
- Salt, D. E., Rauser, W. E. (1995). MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology*, 107(4), 1293-1301.
- Sandoval, G. M. (2006). Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(1), 77-99.
- Sarwar, N., Bibi, S., Ahmad, M., Ok, Y. S. (2014). Effectiveness of zinc applications to minimize cadmium toxicity and accumulation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environmental earth sciences*, 71(4), 1663-1672.

- Sarwar, N., Imram, M., Shaheen, M. S., Ishaque, W., Hussain, S. (2017). Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere*, 171, 710-721.
- Sarwar, N., Saifullah, Malhi, S. S., Zia, M. H., Naeem, A., Bibi, S., Farid, G. (2010). Role of plant nutrients in minimizing cadmium accumulation by plant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 925-937.
- Schat, H., Llugany, M., Bernhard, R. (2000). *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Boca Raton, Florida, USA: Lewis Publishers.
- Shabani, N., Sayadi, M. H. (2012). Evaluation of heavy metals accumulation by two emergent macrophytes from the polluted soil: an experimental study. *Environmentalist*, 32, 91-98.
- Singh, O. V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., Jain, R. K. (2003). Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5-6), 405 -412.
- Speir, T. W., August, J. A., Feltham, C. W. (1992). Assessment of the feasibility of using CCA (copper, chromium and arsenic)-treated and boric acid-treated sawdust as soil amendments. *Plant and Soil*, 142(2), 235-248.
- Speir, T. W., Ross, D. J. (2002). Hydrolytic enzyme activities to assess soil degradation and recovery. *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*. CRC Press.
- Szulczewski, M. D., Helmke, P. A., Bleam, W. F. (1997). Comparison of XANES analyses and extractions to determine chromium speciation in contaminated soils. *Environmental Science and Technology*, 31(10), 2954-2959.
- Tong, Y.P., Kneer, R., Zhu, Y. G. (2004). Vacuolar compartmentalization: a second generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends Plant Science*, 9, 7-9.
- Wang, Y. P., Chao, C. C. (1992). Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae and heavy-metals on the growth of soybean and phosphate and heavy-metal uptake by soybean in major soil groups of Taiwan. *Journal of the Agricultural Association of China*, (157), 6-20.