





## **AGRADECIMENTOS**

En primer lugar agradecer a mi familia por todo su apoyo y esfuerzo durante este periodo.

Agradecer a mis tutores José Navarro Pedreño e Ignacio Gómez Lucas por su completa dedicación, exigencia, paciencia y ayuda ofrecida en cada contratiempo para hacer posible que este trabajo saliera adelante.

A mi compañera Claudia Gallego Moreno por su ayuda prestada en el laboratorio, así como la dedicación durante la preparación y seguimiento del experimento.

También agradecer a la profesora María Belén Almendro Candel por su ayuda prestada en el laboratorio. Y al resto del equipo del Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente de la Alcudia, con el que he podido disfrutar de un buen ambiente de trabajo durante la realización del experimento.

Por último, agradecer a la profesora Juana María Botía Aranda por su rápida y eficiente gestión de todas las dudas surgidas relativas a la gestión de convocatorias.

## **RESUMEN:**

Las posibilidades para usar cultivos en la eliminación de metales pesados del suelo han sido investigadas desde finales del siglo pasado. El objetivo del estudio es determinar la eficiencia de *Hordeum vulgare* (cebada) y *Medicago sativa* (alfalfa, variedad verdor) en la eliminación de níquel del suelo, así como la influencia de los efectos del níquel en la biodisponibilidad y absorción de micronutrientes. La fitorremediación depende tanto de la producción de biomasa, como de la capacidad de acumulación de níquel en los tejidos. En este experimento se encontró que la adición de níquel en agua de riego no afecta especialmente a la biodisponibilidad de los micronutrientes del suelo. Se determinó que la alfalfa es capaz de acumular una concentración de níquel en su parte aérea de 1361,6 mg/kg m. s. y la cebada de 521,8 mg/kg m. s. A partir de esto, se sugiere que la alfalfa puede ser usada potencialmente como una planta biorremediadora de suelos contaminados con níquel.

**Palabras clave:** níquel, fitorremediación, biomasa, metales.

## **ABSTRACT:**

The possibilities of using crops in removing metals from soil were investigated in field trials since the end of the past century. The aim of the study was to determine the efficiency of *Hordeum vulgare* and *Medicago sativa* in removing nickel, as well as the influence of the effects of nickel on the bioavailability and absorption of micronutrients. The phytoremediation efficiency of the investigated species depended both on biomass reduction and on the possibility of metal accumulation in tissues. In this experiment, it was found that the addition of nickel in irrigation water does not affect the bioavailability of the micronutrients in soil. It was determined that alfalfa is capable of concentrating the nickel in its aerial part with a value of 1361.6 mg/kg d. m. and barley with 521.8 mg/kg d. m. It is suggested that alfalfa can potentially be used as a bioremediation plant for nickel-contaminated soils.

**Keywords:** nickel, phytoremediation, biomass, metals.

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>8</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>9</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>6. PROYECCIÓN FUTURA.....</b>	<b>31</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>32</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>37</b>



## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas requieren al menos de catorce minerales esenciales para su crecimiento, además del carbono, oxígeno e hidrógeno que obtienen de múltiples fuentes. Estos elementos se consideran esenciales porque la mayoría de las plantas los necesitan para sobrevivir o porque sin ellos no podrían completar su ciclo de vida, crecer o reproducirse (Shukla *et al.*, 2014).

Los nutrientes minerales son tomados del suelo, pudiéndose encontrar como compuestos orgánicos e inorgánicos que condicionan la capacidad de absorción o adquisición por parte de la planta, es decir, se aumenta o disminuye la disponibilidad de los nutrientes en función del tipo de compuesto en el que se presente (Craine & Dybzinski, 2013). A pesar de esto y de que la cantidad de minerales requeridos varían de especie en especie, estos se pueden clasificar para la mayoría de las plantas como macronutrientes (N, K, Ca, P, Mg, y S) y micronutrientes (Fe, Cl, Mn, B, Zn, Cu, Mo, Ni). Los macronutrientes son los requeridos en grandes cantidades debido a que participan mayoritariamente de componentes estructurales (proteínas, pared celular, membranas, nucleótidos) y además, presentan un papel importante en el mantenimiento de agua y energía. La deficiencia de estos nutrientes puede afectar significativamente el desarrollo normal de las plantas; siendo la disponibilidad de nitrógeno y fósforo las que más afectan el crecimiento. Por otro lado, los micronutrientes se requieren en cantidades pequeñas y proveen características funcionales a las enzimas, participando mayoritariamente en las reacciones de tipo óxido-reducción; por ejemplo, la ureasa es una enzima que cataliza la conversión de urea a amoníaco y dióxido de carbono en las plantas, reacción que se ve favorecida por la presencia de níquel en el sitio activo de la enzima (Brundrett *et al.*, 2016).

El descubrimiento de los mecanismos de absorción, transporte y distribución de los minerales en las plantas ha permitido entender la importancia que tienen estos elementos. Existen múltiples estudios que analizan la absorción de cada mineral, evidenciando la competencia que existe entre trazas de metales que serán absorbidos, así como la competencia entre algunos macronutrientes y micronutrientes. Por ejemplo, la absorción de Mn inhibe fuertemente la absorción de Mg, y viceversa, mientras la absorción de K inhibe la toma tanto de Mn como la de Mg (Reid & Hayes, 2003). Esto se debe a que un elemento puede reemplazar al otro en algunos sistemas enzimáticos, reflejando que una poca afinidad a ciertos minerales le permite a las plantas adaptarse ante lo que el medio le provee (Shukla *et al.*, 2014). En contraste, la especificidad y dependencia de absorción de otros elementos aumenta la probabilidad de que las plantas presenten deficiencias de nutrientes que se traducen en un desequilibrio nutricional que puede afectar al crecimiento celular. En *Arabidopsis*, se ha demostrado que una deficiencia de Fe puede desencadenar síntomas de clorosis y estimular la absorción de Mn, Zn y Co pero no de Cu (Vert *et al.*, 2002).

La falta de selectividad por un elemento u otro y la poca regulación por parte de algunos canales de transporte se asocia a la absorción de especies tóxicas (Ni, Cd, Cr, Hg, Pb) y a la competencia con los micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Zn, Ni, y Mo), siendo los más favorecidos aquellos de mayor concentración (Liu, 1998; Page & Feller, 2015). Un exceso de alguno de estos compuestos resulta tóxico o fatal para la mayoría de las plantas. Por ejemplo, la presencia de altos niveles de Ni en el suelo puede inducir a la aparición de síntomas de clorosis, necrosis, y marchitamiento (Gajewska & Skodowska, 2007; Ghasemi & Ghaderian, 2009). Asimismo, el níquel puede contribuir a la deficiencia de cationes que compiten con él, disminuyendo de esta forma las concentraciones de Ca, Mn, Fe, N, K, Zn y Mn con el aumento de los niveles de Ni (Rahman *et al.*, 2005).

Por otra parte, existen plantas que acumulan metales, las cuales tienen la capacidad de captar los elementos del suelo y llevarlos a sus tejidos sin exhibir síntomas de fitotoxicidad. Algunas de estas plantas se consideran hiperacumuladoras, debido a que son capaces de contener concentraciones de metales 100 veces mayores que las plantas consideradas no acumuladoras. Así por ejemplo, las plantas hiperacumuladoras de níquel contienen más de 1000 mg Ni/kg de peso seco, mientras que para plantas no acumuladoras se alcanzan concentraciones tóxicas por encima de 10-50 mg Ni/kg de peso seco (Marschner, 1995). Esta habilidad de acumulación es la principal razón por la que su estudio y aplicación está dirigida al campo de la remediación de los suelos contaminados con metales pesados. Esta estrategia de remediación *in situ*, que usa la vegetación y su microbiota asociada, el suelo y técnicas agronómicas para reducir, contener o eliminar contaminantes ambientales, se denomina fitorremediación (Sharma & Pandey, 2014).

## 2. ANTECEDENTES

La idea de la fitorremediación fue inicialmente introducida en 1983, y su aplicación principal desde entonces ha sido en el tratamiento de aguas residuales (Ali *et al.*, 2013).

En el siglo XIX, las especies *Thlaspi caerulescens* y *Viola calaminaria* fueron las primeras plantas documentadas con la capacidad de acumular altos niveles de metales en hojas. Byers (1935) reportó que los géneros *Astragalus* eran capaces de acumular selenio. Minguzzi y Vergnano (1948) encontraron plantas que podían tener hasta un 1% de Ni en sus brotes. Rascio (1977), reportó una gran tolerancia y acumulación de Zn en brotes de *Thlaspi caerulescens*. Años después surgieron numerosos artículos de plantas capaces de acumular diversos metales, pero en las que aun así se cuestionaba su uso. En los años ochenta del pasado siglo, Utsunomyia y Chaney fueron quienes reintrodujeron la idea del uso de plantas para extraer metales y fue en la década de los noventa cuando se implementó por primera vez la fitoextracción de Zn y Cd por Baker en 1991 (Lasat, 2000).

A pesar de que sigue siendo un campo abierto de estudio, la fitorremediación se ha usado satisfactoriamente en algunos lugares del mundo para el tratamiento de diferentes focos de contaminación debido a que ofrece múltiples ventajas en comparación a otros métodos convencionales. Los estudios se han basado principalmente en el uso de plantas “hiperacumuladoras”. Un hiperacumulador puede concentrar más de 10 ppm de Hg, 100 ppm de Cd, 1000 ppm de Co, Cr, Cu y Pb, y 10000 ppm de Ni y Zn, dependiendo de la especie. La primera planta descrita como hiperacumuladora de níquel fue *Alysum bertolonii* (Alloway, 2013).

Las investigaciones en el campo de la fitorremediación se desarrollan en muchas partes del mundo, con especial énfasis en Norte América, África y Asia. En contraste, en Europa estas investigaciones han sido limitadas si se comparan con Estados Unidos y Canadá debido a que la normativa y la opinión pública son precavidas en el uso de las fitotecnologías (Sharma & Pandey, 2014).

Específicamente, la alfalfa y la cebada han sido evaluadas bajo diferentes condiciones para determinar su uso como plantas biorremediadoras. En el caso de la alfalfa, esta presenta características importantes como su gran producción de biomasa tanto por encima como por debajo de la superficie del terreno, y su capacidad de desarrollar un amplio sistema radicular con una gran capacidad exploratoria. Algunos experimentos con alfalfa se han llevado a cabo para determinar su capacidad de tratar suelos contaminados con Cd, Cr, Zn, Ni, Hg, hidrocarburos lineales, hidrocarburos aromáticos, entre otros (Agnello, 2015). Por otra parte, la cebada ha sido evaluada en suelos contaminados con Pb, Hg, Cd, Cu, Zn e hidrocarburos, siendo identificada como una planta

eficiente para la absorción y acumulación de Zn y Cd, y como una gran productora de biomasa hiperacumuladora para la remoción de plomo (Sierra *et al.*, 2011; Sridhar *et al.*, 2007).

### 3. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es examinar el efecto del níquel en la disponibilidad y absorción de determinados micronutrientes (Fe, Mn, Cu y Zn) en el sistema suelo-planta constituido por un suelo salino y dos especies reseñadas como hiperacumuladoras. Se evalúa el potencial de las plantas *Hordeum vulgare* y *Medicago sativa* para tratar suelos contaminados con níquel.

Para conseguir este objetivo, se procederá con los siguientes objetivos específicos:

- Realizar revisión bibliográfica sobre el tema.
- Establecer un diseño experimental, con un cultivo de *Hordeum vulgare* y *Medicago sativa* en suelo agrícola salino que se contaminará con Ni mediante el riego.
- Determinar analíticamente las concentraciones de Fe, Mn, Cu y Zn en el suelo y en cada una de las plantas cultivadas de las especies *Hordeum vulgare* y *Medicago sativa*, a distintas concentraciones de Ni.
- Valorar los resultados y elaborar las conclusiones, encaminadas a identificar la afección a la absorción de micronutrientes en cada una de las especies vegetales afectadas por la contaminación del metal, así como cuál de las dos especies es la más óptima para ser usada en biorremediación de suelos afectados por contaminación debida al níquel.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales empleados.

En este trabajo se usó un suelo de origen agrícola, de características salinas, procedente de San Isidro (Alicante), el cual fue tamizado para separar elementos gruesos, con tamaños superiores a 5 mm. Posteriormente, se caracterizó a través de las siguientes metodologías utilizadas habitualmente en el Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente, cuantificando los siguientes parámetros:

- Determinación de textura por el método de Bouyoucos. Determinada mediante un densímetro Bouyoucos, que se basa en que la densidad de una suspensión depende de la cantidad suspendida, pudiendo evaluar las variaciones de esa densidad respecto al tiempo y relacionarla con la velocidad de suspensión y el tamaño de las partículas suspendidas (M.A.P.A., 1986). En primer lugar, se deben dispersar los agregados de las partículas destruyendo la materia orgánica del suelo, lo que se consigue al añadir hexametáfosfato sódico y elevando el pH con carbonato sódico. Posteriormente se miden las temperaturas y densidades a los 40 segundos (arcilla y limo) y a las 2 horas (arcilla). Por diferencia, se calcula el contenido en arena. Estos porcentajes se cruzan en el diagrama triangular para determinar la textura, según la clasificación USDA (United States Department of Agriculture).
- Medición del pH. Se mide, en pH-metro previamente calibrado mediante patrones estandarizados, una suspensión de suelo/agua en proporción 1:2,5 (p/V) (M.A.P.A., 1986).
- Medición de la conductividad eléctrica con temperatura de referencia de 25°C. Se mide en conductímetro, previamente calibrado mediante patrones estandarizados de disoluciones de KCl, de conductividades conocidas, en extracto suelo/agua en proporción 1:5 (p/V), siguiendo el proceso establecido en la norma AENOR-UNE 77308: 2001. Calidad del suelo. Determinación de la conductividad eléctrica específica.
- Determinación de materia orgánica oxidable. La determinación de materia orgánica oxidable se basa en la utilización de dicromato potásico en medio sulfúrico como oxidante, valorando el exceso del ácido con sulfato ferroso amónico (sal de Mohr). El carbono orgánico oxidable se determina por retroceso o diferencia entre el dicromato utilizado y el valorado con la sal de Mohr. El contenido de materia orgánica se obtiene indirectamente mediante la consideración de que el 58% de la materia orgánica del suelo es carbono (M.A.P.A., 1986).

- Determinación del contenido de nitrógeno Kjeldahl. Utilizando el método Kjeldahl, para determinar el Nitrógeno total, transformando el N orgánico en N amoniacal y valorando este con ácido clorhídrico (HCl), mediante los procesos de digestión de la muestra, por vía húmeda en medio sulfúrico; destilación del ión amonio en medio alcalino; y posterior valoración, factorizando con ácido clorhídrico de normalidad conocida (M.A.P.A., 1986).
- Determinación de carbonatos. El contenido en carbonato cálcico equivalente, se ha determinado según la norma AENOR-UNE-77317, mediante el calcímetro de Bernard. Este método se basa en la reacción de ácido clorhídrico (HCl) al entrar en contacto con el carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ). De la reacción se desprende dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), que será lo que utilizemos para valorar la cantidad de carbonatos equivalentes que hay en la muestra, ya que, en condiciones de presión y temperatura constante, el volumen de dióxido de carbono producido es proporcional al contenido de carbonatos de la muestra.
- Medición de macronutrientes asimilables por acetato de amonio y micronutrientes por DTPA. Para conocer la concentración de estos macronutrientes, se realiza una extracción con acetato amónico y tras el filtrado, se determinan mediante espectrometría de absorción atómica con llama de nitroso/acetileno para Ca y llama de acetileno/aire para el Mg y espectrometría de emisión atómica con llama de acetileno/aire para Na y K (M.A.P.A., 1986). Si se prevé que las concentraciones de macronutrientes sean altas, se prepararán diluciones previas. Para determinar la concentración de estos micronutrientes, se extraen con DTPA 0,005N y tras 2 h de agitación y posterior filtrado, siguiendo lo especificado en la norma AENOR-UNE-77315, los contenidos disponibles de los metales se determinan mediante espectrometría de absorción atómica con llama de acetileno/aire.

Las características determinadas del suelo se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Caracterización del suelo agrícola para los cultivos.

<b>Propiedad</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Medida</b>
<b>Elementos gruesos</b>	Gruesos de 2 a 5 mm (% p/p)	28 ± 3
	Arena (%)	17 ± 2
<b>Textura</b>	Limo (%)	73 ± 2
	Arcilla (%)	10 ± 1
<b>pH</b>	pH a 20 °C	7,9 ± 0,1
<b>Conductividad eléctrica</b>	Cond. eléctrica a 25 °C (mS/cm)	7,8 ± 0,5
<b>Materia orgánica</b>	Mat. Orgánica oxidable (%)	2,7 ± 0,2
<b>Contenido de nitrógeno</b>	Nitrógeno total (Kjedahl) (%)	0,21 ± 0,01
<b>Contenido en carbonatos</b>	Carbonato de calcio equivalente (%)	57,5 ± 0,3
	Calcio (g/kg)	8,2 ± 0,9
<b>Macronutrientes asimilables por acetato de amonio</b>	Magnesio (g/kg)	1,7 ± 0,1
	Sodio (g/kg)	4,1 ± 0,1
	Potasio (g/kg)	0,6 ± 0,1
<b>Micronutrientes asimilables por DTPA</b>	Hierro (mg/kg)	0,8 ± 0,1
	Manganeso (mg/kg)	13,8 ± 0,2
	Zinc (mg/kg)	3,1 ± 0,1
	Níquel (mg/kg)	0,4 ± 0,1
	Cobre (mg/kg)	3,6 ± 0,2

Para el establecimiento del cultivo en el invernadero se sembraron en turba y tras su germinación, se trasplantaron las especies *Hordeum vulgare* (nombre común: Cebada) y *Medicago sativa* (nombre común: Alfalfa) al suelo salino. Se usaron cuatro repeticiones por tratamiento, distribuidas en un total de 32 macetas conteniendo 800 gr de suelo agrícola salino. Los tratamientos consistieron en la aplicación de cuatro niveles de metal pesado (níquel) mediante el riego, constituyendo el primer nivel el control (adición cero de Ni). Los siguientes tratamientos se prepararon disolviendo NiCl<sub>2</sub> en el agua de riego obteniendo concentraciones de: 0, 5, 15, 15, 50 mg/L.

Los cultivos se mantuvieron durante todo el tiempo en el invernadero bajo las condiciones mostradas en la Tabla 2. En la Figura 1 y Figura 2 se pueden observar los cultivos de las especies evaluadas. El suelo agrícola usado, los tratamientos establecidos, trabajo de campo y el trabajo de laboratorio se puede observar en los anexos (Figura A1 a Figura A6).

**Tabla 2.** Condiciones en el invernadero.

<b>Parámetro</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Humedad (%)</b>
<b>Media</b>	17,3	64,8
<b>D. estándar</b>	6,5	16,9
<b>Valor mín.</b>	6,9	20,6
<b>Valor máx.</b>	37,3	91,8



**Figura 1.** Cultivo de *Hordeum vulgare*.



**Figura 2.** Cultivo de *Medicago sativa*.

### 1.2. Tratamientos.

Durante siete semanas, desde la siembra en turba inicial para su germinación y para su posterior trasplante a los tiestos con el suelo salino, las plantas se regaron dos veces por semana con agua de riego, cuyas características se muestran en la Tabla 3.

Tras el trasplante, durante las cinco semanas siguientes, las plantas fueron regadas con el agua contaminada con níquel, adicionado en forma de cloruro de níquel (II) -  $\text{NiCl}_2$  - al agua base de riego, obteniendo las distintas concentraciones que configuraron los cuatro tratamientos.

La caracterización del agua de riego base se presenta en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Caracterización del agua de riego base.

<b>Parámetro</b>	<b>Medida</b>
<b>pH</b>	7,3 ± 0,1
<b>Cond. Eléctrica a 25 °C (mS/cm)</b>	0,806 ± 0,006
<b>Oxígeno disuelto (mg/L)</b>	7,27 ± 0,06
<b>Nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (mg/L)</b>	1,21 ± 0,01
<b>Nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (mg/L)</b>	0,02 ± 0,01
<b>Amonio (NH<sub>3</sub>) (mg/L)</b>	No detectado
<b>Fosfatos (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) (mg/L)</b>	0,11 ± 0,02
<b>Bicarbonatos (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (mg/L)</b>	134 ± 21
<b>Cloruros (Cl<sup>-</sup>) (mg/L)</b>	109 ± 1
<b>Sulfatos (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) (mg/L)</b>	252 ± 26
<b>Sodio (Na<sup>+</sup>) (mg/L)</b>	68,2 ± 0,3
<b>Potasio (K<sup>+</sup>) (mg/L)</b>	3,2 ± 0,5
<b>Calcio (Ca<sup>2+</sup>) (mg/L)</b>	25,6 ± 0,4
<b>Magnesio (Mg<sup>2+</sup>) (mg/L)</b>	19,7 ± 0,1

Los tratamientos empleados en esta experimentación son los dados por las concentraciones de níquel resultantes en el agua de riego, tal como se indica en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Diseño experimental.

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración de NiCl<sub>2</sub></b>	<b>Número de cultivos para <i>H. vulgare</i></b>	<b>Número de cultivos para <i>M. sativa</i></b>
<b>Control</b>	0 mg/L	4	4
<b>T1</b>	5 mg/L	4	4
<b>T2</b>	15 mg/L	4	4
<b>T3</b>	50 mg/L	4	4

### 1.3. Determinaciones analíticas.

Al final del experimento, se analizaron el suelo y la planta para determinar los efectos del riego con el agente contaminante.

Las partes aéreas de las plantas se limpiaron con agua desionizada y secaron en estufa de aire forzado a 60 °C. Posteriormente, se molieron y se procedió a la mineralización de la muestra. 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. Una vez las muestras están mineralizadas, se enrasa a 25 ml en un matraz aforado y se filtra 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) y de níquel.

Por otro lado, las muestras de suelo se secaron en el almacén de suelos a temperatura ambiente y se tamizaron con una malla de 2 mm. Posteriormente, se aplicó el método de extracción de Lindsay y Norwell (1978) para evaluar la disponibilidad de micronutrientes y metales pesados presentes en la muestra. El principio del método es la utilización de una solución de ácido dietilenotriaminopentaacético (DPTA), el cual es un agente quelante, que promueve la formación de complejos metálicos al reaccionar con los metales libres en solución. Debido a esto, los iones se liberan de la superficie de la muestra del suelo y disuelven en la solución. Los complejos metálicos se acumulan en la solución.

Para la estimación de la capacidad de concentración de metales en la planta, se utiliza el factor de bioconcentración –FBC- ecuación 1 (Banerjee & Gupta, 2017). De esta forma, con el cociente entre el elemento biodisponible y la concentración en la planta, se puede determinar si éstas almacenan el metal (o nutriente) en sus tejidos, y según esto establecer si podrían presentar rasgos de especies fitorremediadoras.

$$FBC = \frac{\text{Concentración del metal en la planta (mg/kg peso seco)}}{\text{Concentración del metal en el suelo (mg/kg de suelo)}} \quad \text{Ecuación 1}$$

### 1.4. Tratamiento estadístico.

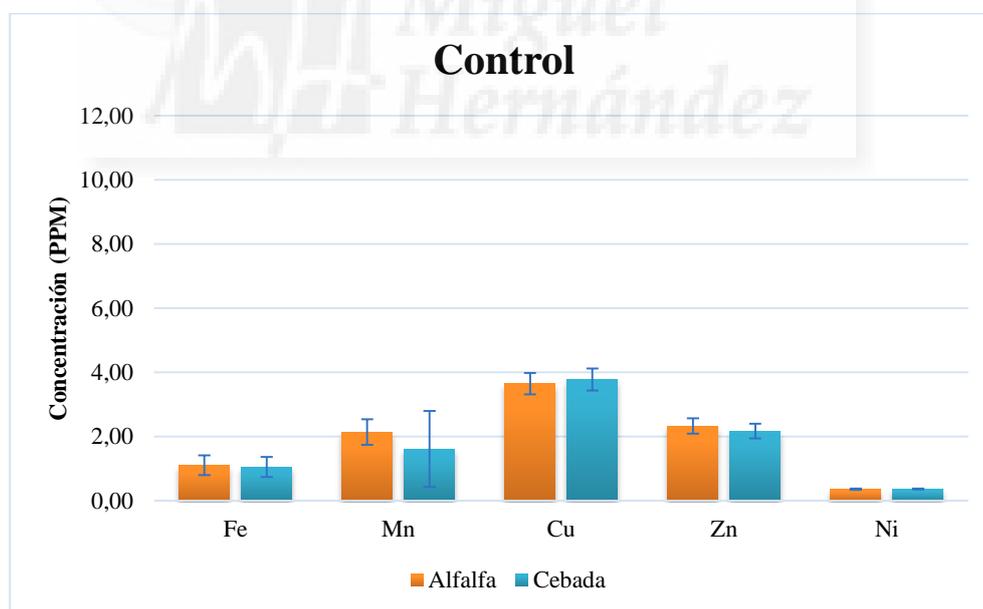
Se realizó una estadística descriptiva de los datos determinando la media y desviación estándar. Además, para comprobar si los tratamientos presentaban diferencias significativas, se realizó también el análisis de varianza (ANOVA) de una vía (Martín Andrés & Luna del Castillo, 2004).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

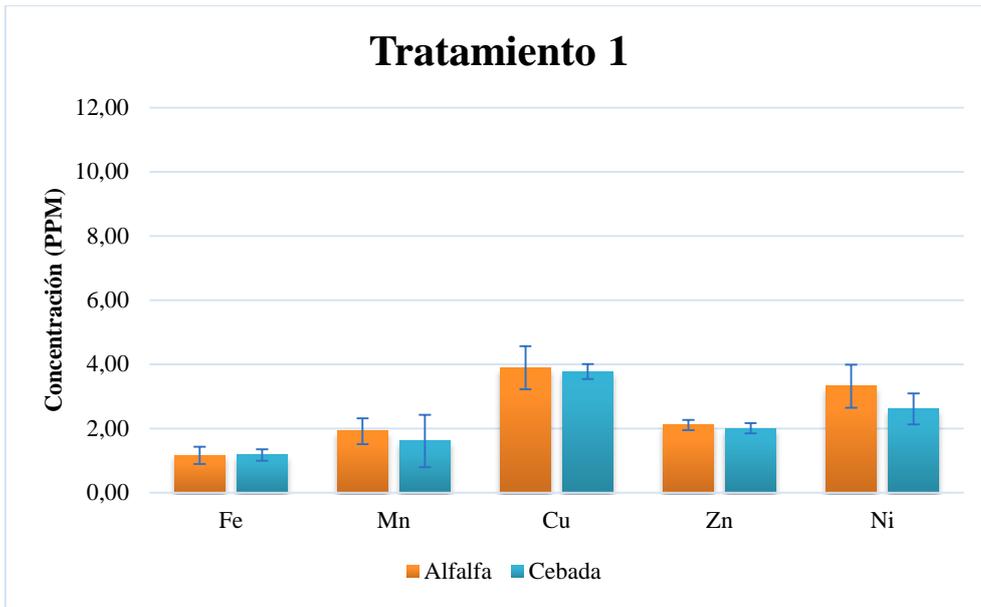
Con relación al suelo utilizado en este experimento, presenta un pH alcalino (7,9). Desde el punto de vista granulométrico el limo es el tipo granulométrico más abundante con el 73% de las muestras del suelo. De la extracción de los nutrientes asimilables por acetato de amonio (Ca, Mg, Na, K), el Ca se presentó en mayor cantidad con una concentración de 8,2 g/kg, seguido por el Na con 4,1 g/kg. Los micronutrientes (Fe, Mn, Cu y Zn) extraídos con DTPA se presentaron en el siguiente orden  $Fe < Zn < Cu < Mn$  donde la concentración de Fe fue de 0,8 mg/kg y el Mn de 13,8 mg/kg. El suelo, debido a la elevada conductividad eléctrica, muestra características de suelo salino, lo que es un elemento adicional que dificulta el crecimiento de las plantas sensibles a la salinidad.

### 1.5. Biodisponibilidad de micronutrientes en el suelo.

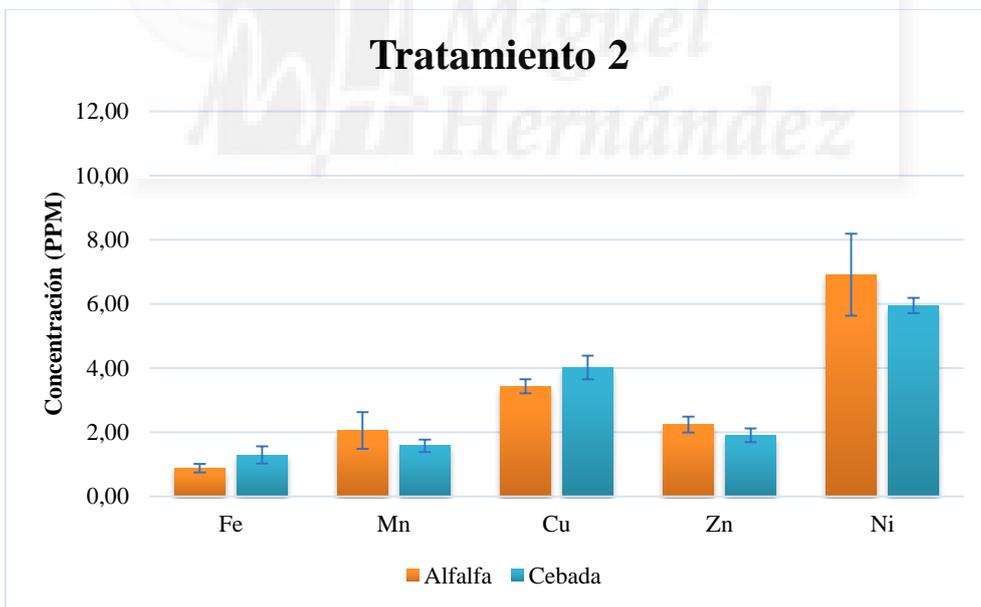
La disponibilidad de la mayoría de los micronutrientes en el suelo no se encontró influenciada significativamente por la adición de níquel en los suelos donde fueron cultivadas cada una de las especies de planta para ninguno de los cuatro tratamientos al final del cultivo, esto se puede observar al comparar el tamaño de las barras de un mismo color (es decir misma planta) para cada uno de los micronutrientes a través de los tratamientos (Figura 3 a Figura 6).



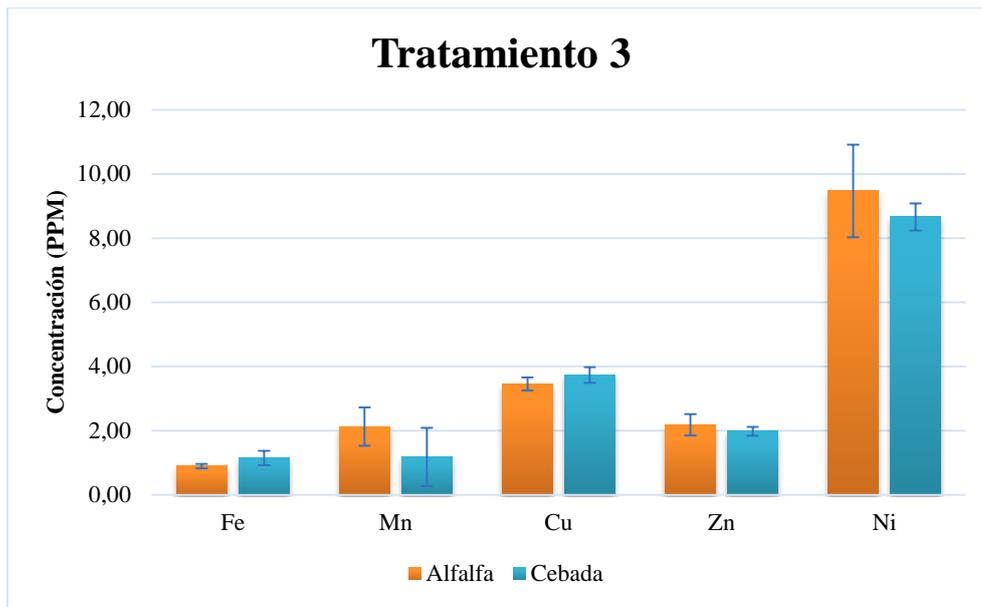
**Figura 3.** Micronutrientes y contaminante en el suelo para cada una de las plantas en el tratamiento control.



**Figura 4.** Micronutrientes y contaminante en el suelo para cada una de las plantas en el tratamiento 1.



**Figura 5.** Micronutrientes y contaminante en el suelo para cada una de las plantas en el tratamiento 2.



**Figura 6.** Micronutrientes y contaminante en el suelo para cada una de las plantas en el tratamiento 3.

Este resultado sugiere que el proceso físico de arrastre por riego y las interacciones químicas del agua de riego sin contaminar (control) y contaminada (T1, T2, T3) no provocan una lixiviación específica y significativa para la mayoría de los micronutrientes del suelo evaluados (Fe, Zn y Cu), por lo que los minerales están potencialmente disponibles para las plantas. Aunque los elementos estén presentes en el suelo en concentraciones variables, incluso altas, su absorción a través de las raíces está condicionada por múltiples factores como la humedad, aireación, carga microbiana, cantidad de materia orgánica, pH, temperatura, concentración de iones y condiciones fisiológicas de la planta (Sánchez, 2007). En el caso del Fe, el contenido de arcilla y de materia orgánica en el suelo influye sobre su biodisponibilidad, con tendencia a ser retenido en suelos con porcentajes altos de arcilla (Mengel, 1994). El Zn puede encontrarse adsorbido por coloides, en forma soluble, o fijado (Broadley *et al.*, 2007). El Cu se encuentra formando minerales o como parte de la materia orgánica, estando fijo como elemento intercambiable en suelo arcilloso (Brun *et al.*, 2001). Por otro lado, el manganeso presentó un descenso importante en su concentración al final del cultivo al compararse con su concentración en el suelo antes del cultivo (13.8 mg/kg), obteniéndose valores promedio de  $2.0 \pm 0.1$  mg/kg para los tratamientos del cultivo de alfalfa y  $1.5 \pm 0.2$  mg/kg para tratamientos sobre el cultivo de cebada, lo cual puede asociarse al arrastre o solubilización del compuesto según su solubilidad o por la extracción del cultivo, además de factores asociados a la reducción de su disponibilidad como la alcalinidad del suelo, la textura y la competencia microbiológica (El-Jaoual & Cox, 1998). Por ejemplo, la disociación de compuestos o la

presencia de iones de manganeso  $Mn^{2+}$  solubles se asocian a una baja adsorción en el suelo, y por lo tanto aumenta la probabilidad de ser arrastrados por el agua de riego. También se ha encontrado que a pH superiores a 5.5 se favorece la oxidación por acción biológica del Mn en suelos con buena aireación, por lo que disminuye su disponibilidad (Rengel, 2015). En nuestro caso, pensamos que el riego favoreció las condiciones de oxidación del manganeso, formando iones solubles que pudieran ser lixiviados.

Asimismo, el análisis de varianza sobre las cuatro repeticiones en la medición de las concentraciones de cada uno de los micronutrientes en los suelos tratados con agua de riego de *H. vulgare* y de *M. sativa* mostró que la adición de níquel no afectó de forma significativa la biodisponibilidad de los elementos minerales o micronutrientes. Para este análisis se obtuvo un estadístico de prueba crítico ( $F_{crítico}$ ) con un valor de 3,49 que se comparó con el estadístico de prueba (F) obtenido del análisis de las repeticiones, valores mostrados en la Tabla 5, y debido a que  $F < F_{crítico}$  se acepta la hipótesis de que las medias obtenidas para el mismo elemento son iguales. En contraste, a partir de la ANOVA se encontró que para el níquel  $F > F_{crítico}$ , por lo que se rechaza la hipótesis de que sus medias sean iguales y que por lo tanto al menos una de ellas es distinta.

**Tabla 5.** Concentración media de micronutrientes por tratamiento y por planta – ANOVA.

	MICRONUTRIENTE				
	Fe	Mn	Cu	Zn	Ni
<b>C_A</b>	1,10	2,13	3,65	2,32	0,36
<b>T1A</b>	1,16	1,92	3,89	2,11	3,31
<b>T2A</b>	0,88	2,05	3,43	2,24	6,91
<b>T3A</b>	0,89	2,12	3,45	2,18	9,47
<b>Valor F</b>	1,81	0,16	1,12	0,53	61,31
<b>Probabilidad</b>	0,20	0,92	0,38	0,67	2,E-07
<b>Media entre grupo</b>	ns	ns	ns	ns	**
<b>C_C</b>	1,05	1,61	3,77	2,17	0,36
<b>T1C</b>	1,17	1,61	3,77	2,00	2,61
<b>T2C</b>	1,29	1,57	4,02	1,90	5,95
<b>T3C</b>	1,15	1,18	3,73	1,98	8,66
<b>Valor F</b>	0,62	0,24	0,74	1,36	456,96
<b>Probabilidad</b>	0,62	0,87	0,55	0,30	1,E-12
<b>Media entre grupo</b>	ns	ns	ns	ns	**

ns: No significativo. \*\*: Significativo. C\_A: Cultivo control de Alfalfa, T1A: Tratamiento 1 en Alfalfa, T2A: Tratamiento 2 en Alfalfa. T3A: Tratamiento 3 en Alfalfa. C\_C: Cultivo control de Cebada, T1C: Tratamiento 1 en Cebada, T2C: Tratamiento 2 en Cebada. T3C: Tratamiento 3 en Cebada.

Este resultado sobre el níquel se asocia al aumento de la concentración promedio en cada uno de los suelos a medida que aumentaba su concentración en el agua de riego. Este comportamiento concuerda con que el níquel tiende a retenerse en suelos alcalinos, como el empleado. Así, su solubilidad y movilidad disminuyen en suelos alcalinos por lo que tienden a encontrarse biodisponibles para las plantas sin ser arrastrados o lixiviados. En este orden, el contenido de arcilla, la presencia de Mn, Fe y el contenido orgánico en el suelo cobran importancia significativa después de la consideración del pH (Iyaka, 2011).

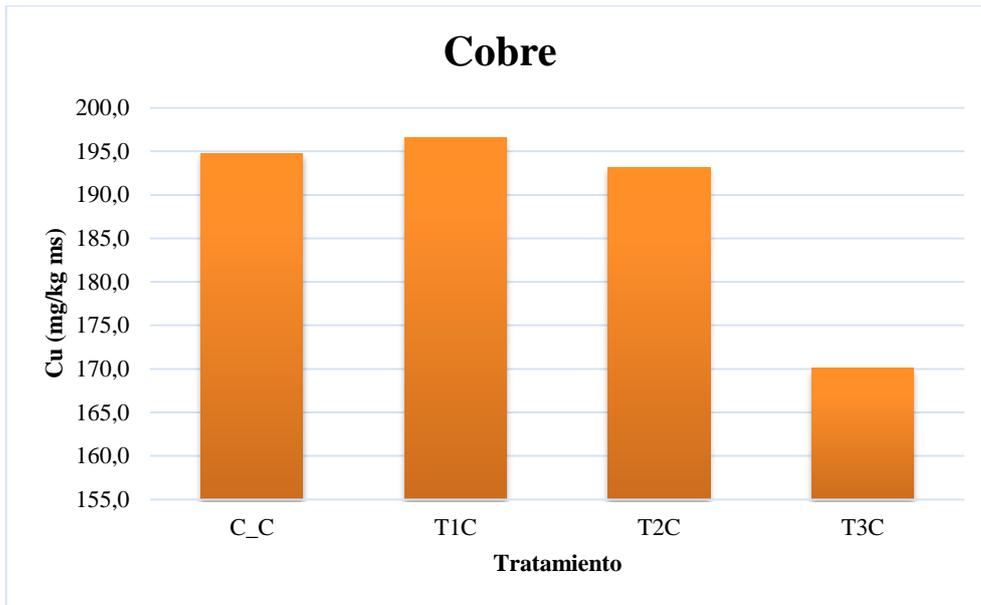
La fitodisponibilidad del níquel ha sido correlacionada con su actividad como ion libre en soluciones de muestras de suelo, y por lo tanto, su absorción por la planta dependerá de su fuente y forma química, que aparece de forma común en la naturaleza como el ion  $Ni^{2+}$  a pesar de que en algunas enzimas se encuentre en su forma  $Ni^{3+}$  (Uren, 1992).

Por otro lado, se presentó la misma tendencia de concentraciones de cada micronutriente a través de los tratamientos (Figura 3 a Figura 6). Por ejemplo, el cobre siempre se encontró en mayor concentración al compararse con las concentraciones de hierro, manganeso, y zinc. El cobre se encuentra a menudo en el estiércol animal y en los lodos de depuración que son usados en suelos agrícolas por lo que se relaciona a su alta concentración sobre suelos de este tipo (Berg *et al.*, 2005).

## 1.6. Absorción de nutrientes.

### 1.6.1. Nutrición mineral en *Hordeum vulgare* (cebada).

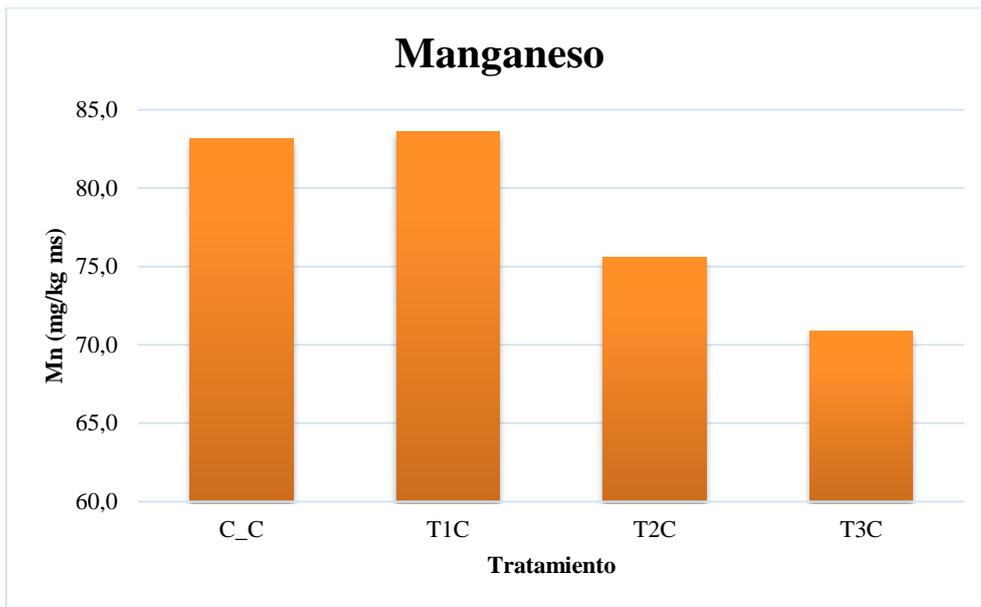
Los efectos de las diferentes concentraciones de níquel en la concentración de cobre en la parte aérea de la cebada se muestran en la Figura 7. Se observa que la concentración de cobre en la planta disminuye significativamente en el tratamiento 3, mientras que para los otros tratamientos la concentración de cobre no presenta mucha diferencia con respecto al control. Rahman y colaboradores (2005) encontraron que la concentración de cobre en los brotes superiores de un cultivo de cebada disminuían con el aumento de la concentración de Ni en una solución nutritiva (Rahman *et al.*, 2005).



**Figura 7.** Concentración de cobre en *Hordeum vulgare* por tratamiento.

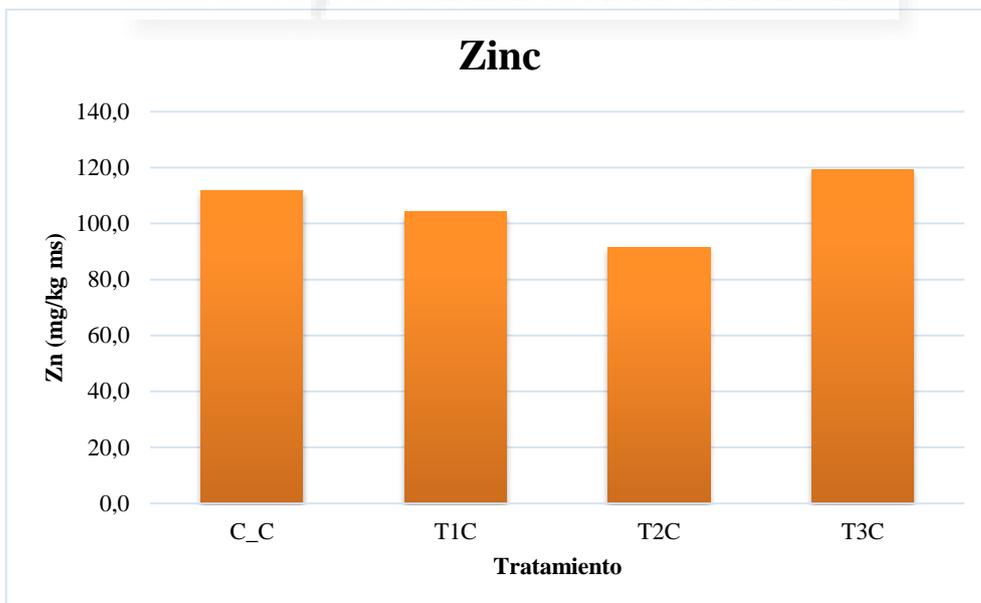
Por otro lado, el cobre tiene un papel importante en sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo de proteínas y carbohidratos, como la fotosíntesis, por lo que la cebada es muy sensible a su deficiencia (Al-Turki & Helal, 2004). Esto se relaciona al mantenimiento de las concentraciones de Cu en los tratamientos 1 y 2, reflejando la necesidad de la planta de absorber el nutriente a pesar del aumento de Ni (Mengel *et al.*, 2001).

En la Figura 8 se observa que la concentración de Mn en la parte aérea de la planta decrece con el aumento de las concentraciones de Ni. Este resultado no apoya a los resultados hallados por Brune y Dietz, quienes reportan para cultivos de cebada bajo condiciones tóxicas de Ni que no hay efectos sobre la concentración de Mn que se encuentra en las hojas de estas plantas (Brune & Dietz, 1995). Hannam y colaboradores reportan que se presentaron síntomas de deficiencia de Mn en plantas que crecían en bajo una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de Ni (Hannam, Riggs, & Graham, 1987).



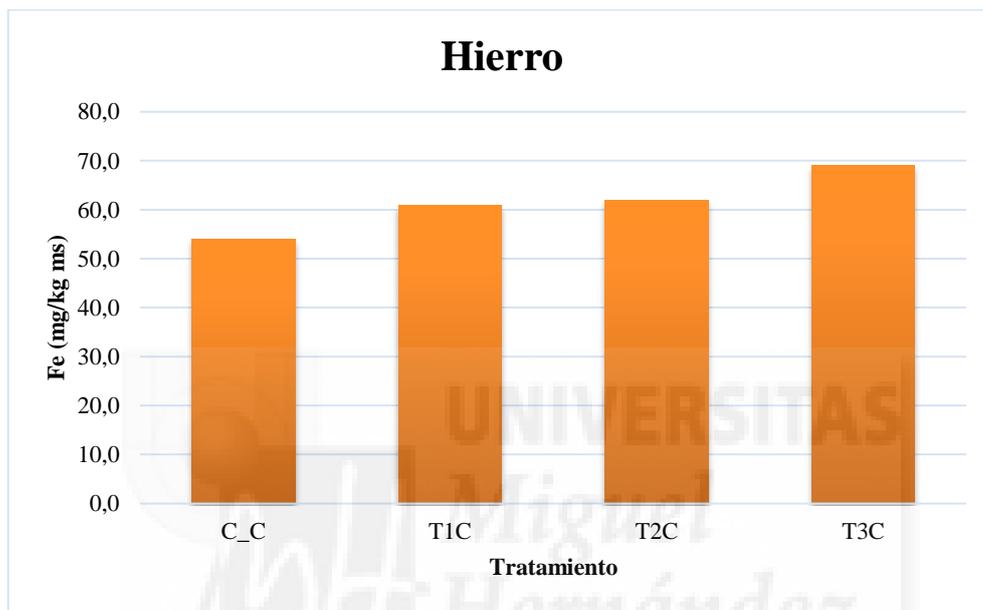
**Figura 8.** Concentración de manganeso en *Hordeum vulgare* por tratamiento.

La concentración de Zn en la planta según el tratamiento implementado mostró diferentes comportamientos (Figura 9). La máxima concentración de Zn en la planta se alcanzó en el tratamiento 3, mientras que la mínima concentración se alcanzó en el tratamiento 2. En brotes de plantas que crecen a concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  Ni se han encontrado concentraciones críticas de Zn (H. Marschner, 1993; Rahman *et al.*, 2005). De otra forma, se ha encontrado que la cebada en su estado maduro es una de las plantas más resistentes ante las deficiencias de Zn (Tandon, 1995).



**Figura 9.** Concentración de zinc en *Hordeum vulgare* por tratamiento.

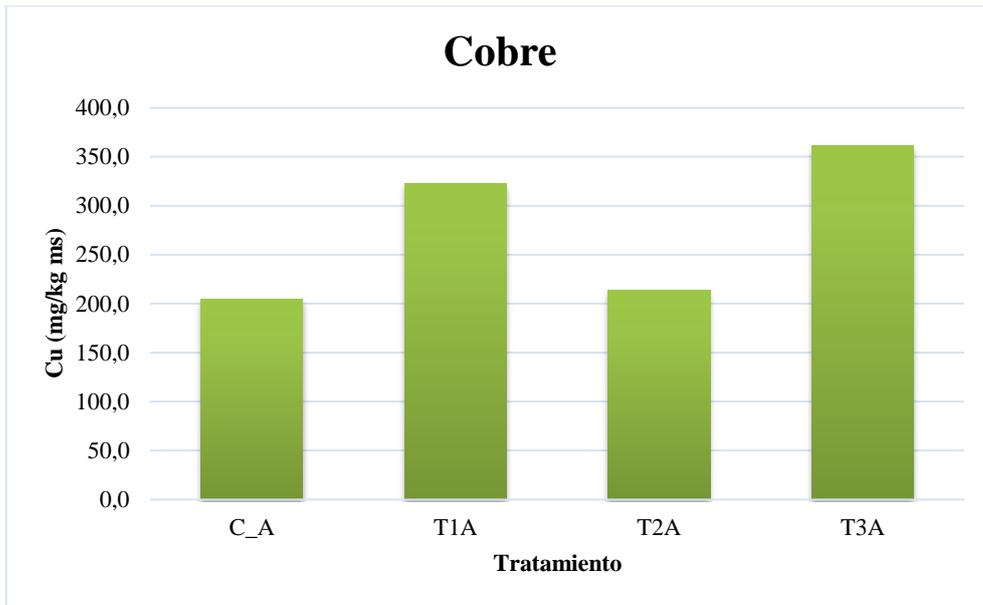
La concentración de hierro acumulado aumentó a medida que incrementaron los niveles de Ni (Figura 10). Este resultado es contrario a lo reportado para los brotes superiores de un cultivo de cebada evaluado por Rahman y colaboradores (Rahman *et al.*, 2005). En este caso, la diferencia de los resultados puede asociarse a que los valores obtenidos en el presente trabajo se hallaron en la parte aérea de la planta y no sólo en sus brotes superiores, por lo que la planta que ya había alcanzado con anterioridad cierto nivel de madurez antes de ser expuesta a los tratamientos, pudo tolerar o inducir otros mecanismos de respuesta para la absorción de hierro debido a que este elemento es esencial para la biosíntesis de clorofila (Santos *et al.*, 2013).



**Figura 10.** Concentración de zinc en *Hordeum vulgare* por tratamiento.

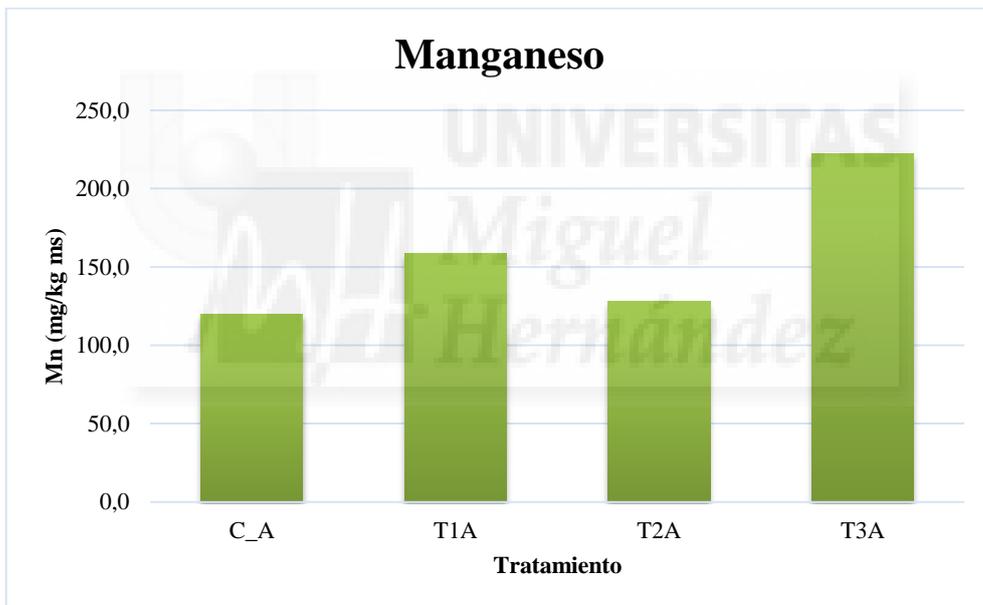
#### 1.6.2. Nutrición mineral en *Medicago sativa* (alfalfa).

La forma en la que varían las concentraciones de cada uno de los micronutrientes Cu, Mn, Zn y Fe es similar entre los tratamientos (Figura 11 a Figura 14).



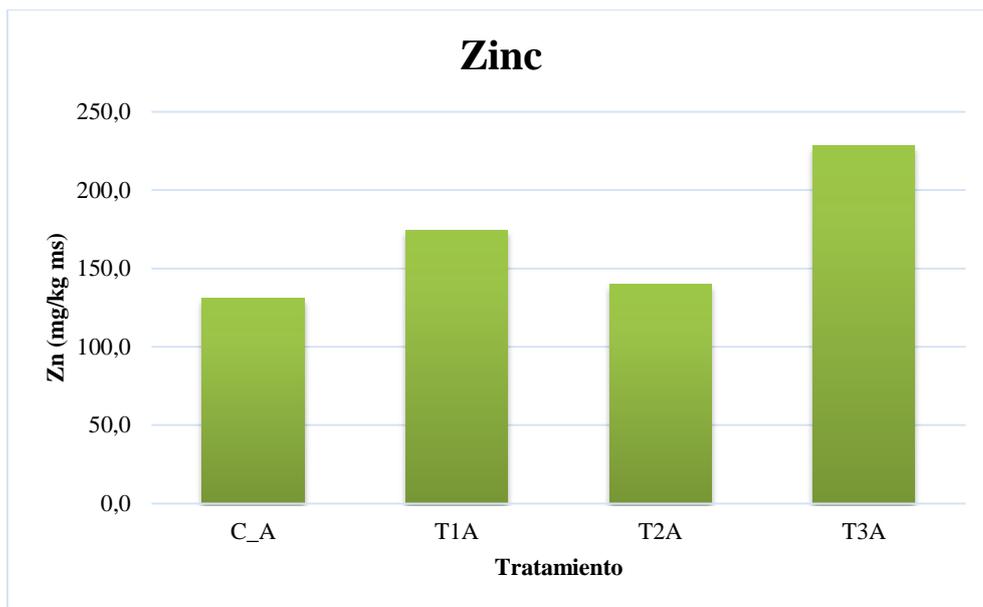
**Figura**

**11.** Concentración de cobre en *Medicago sativa* por tratamiento.

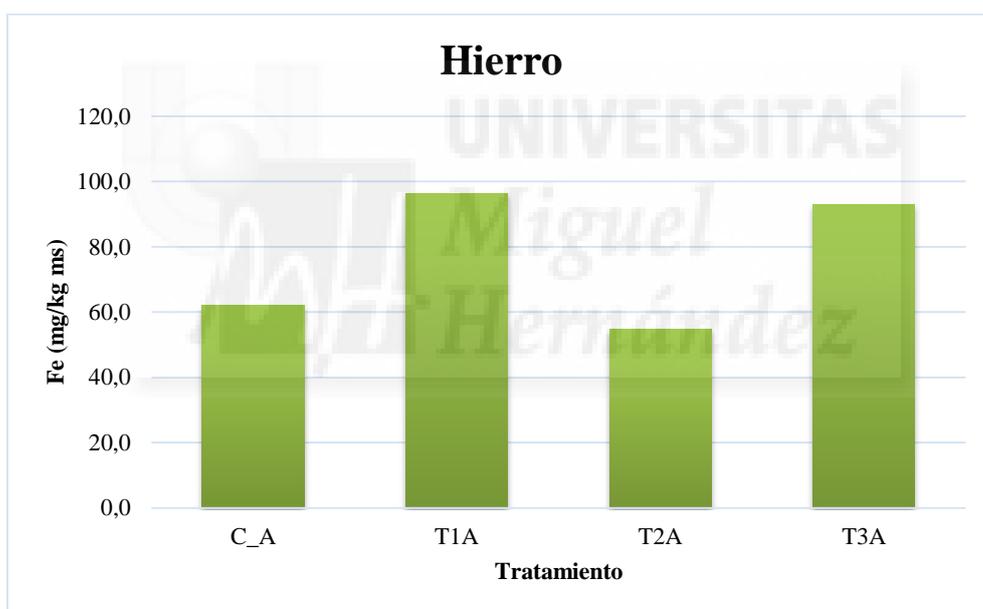


**Figura**

**12.** Concentración de manganeso en *Medicago sativa* por tratamiento.



**Figura 13.** Concentración de zinc en *Medicago sativa* por tratamiento.



**Figura 14.** Concentración de hierro en *Medicago sativa* por tratamiento.

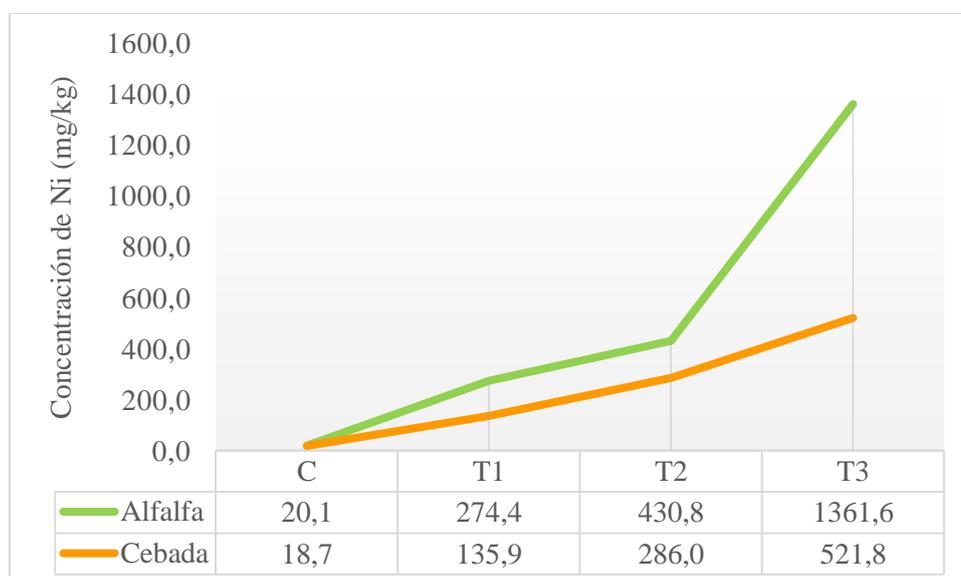
Se presentó mayor acumulación de Cu, Mn, Zn y Fe con el tratamiento 3, es decir, con el tratamiento con mayor concentración de Ni. Este resultado sugiere que para esta concentración de Ni la planta absorbe en proporciones similares los otros micronutrientes. Por otro lado, el tratamiento 2 contenía mayor cantidad de Ni que el tratamiento 1, pero fue con este último con el que se obtuvo mayores concentraciones de micronutrientes evaluados en la alfalfa. Este comportamiento no permite relacionar que el aumento del Ni esté asociado con la absorción de los demás elementos, y debido a que no existen estudios a cerca de un comportamiento similar se sugiere realizar nuevas evaluaciones del efecto del níquel sobre la absorción de

micronutrientes con las cuales se pueda determinar o detectar niveles óptimos de níquel o que permitan relacionarse a diferentes mecanismos de absorción y distribución de los micronutrientes en la planta. Se debe considerar que los efectos en las concentraciones de Ni varían de especie a especie, y que además la alfalfa presenta poca especificidad a algunos metales, lo que puede generar desordenes de absorción y transporte (Peralta-Videa *et al.*, 2002; Seregin & Kozhevnikova, 2006).

En otras plantas se ha observado que el Ni puede competir con otros metales. Se reporta por ejemplo una relación antagónica del Ni y el Zn en plantas Ni-acumuladoras. Asimismo, se reporta una relación similar entre el Ni y el Fe, y por lo general, el Fe es el componente que mayor efecto inhibitorio tiene sobre la absorción del Ni y su translocación desde las raíces hacia los brotes superiores en ciertas especies (Seregin & Kozhevnikova, 2006; Taylor & Allinson, 1981). Estos comportamientos no se evidenciaron linealmente con los tratamientos evaluados por lo que también se recomienda relacionar un mayor número de variables que puedan estar afectando la absorción de los micronutrientes a diferentes concentraciones de níquel. Además, se debe tener en cuenta que para la medición de los micronutrientes en la parte aérea de la planta se usaron las repeticiones de cada tratamiento como una única muestra para la recolección de suficiente material con el que se pudiera llevar a cabo la medición.

### 1.7. Bioacumulación de níquel.

La concentración de níquel en la parte aérea de las plantas a través de los diferentes tratamientos se muestra en la Figura 15. Al comparar entre tratamientos, la planta con mayor capacidad de acumulación fue *M. sativa*. En el tratamiento 3, la alfalfa alcanzó una concentración de níquel de 1361,6 mg/kg, mientras que la concentración de níquel en la cebada fue de 521,8 mg/kg. Las plantas capaces de acumular concentraciones por encima de 1000 mg/kg m.s. de Ni son consideradas hiperacumuladoras (Marschner, 1995).



**Figura 15.** Acumulación de níquel en cada uno de los tratamientos en las especies de alfalfa y cebada.

La capacidad de las plantas de tolerar y acumular el níquel se evaluó finalmente con el factor de bioconcentración. Este factor puede ser usado para sugerir la capacidad de las plantas de ser usadas en fitorremediación. A partir del tratamiento 3 se encontró que *M. sativa* tiene la capacidad de acumular una mayor cantidad de níquel en su parte aérea en comparación a *H. vulgare*, como se puede observar en la Tabla 6.

Tabla 6. Factor de bioconcentración de cada especie por tratamiento.

Especie	Tratamiento	Metal				
		Fe	Mn	Cu	Zn	Ni
<i>M. sativa</i>	C	56,2	56,2	56,2	56,2	56,2
	T1	82,8	82,8	82,8	82,8	82,8
	T2	62,3	62,3	62,3	62,3	62,3
	T3	104,6	104,6	104,6	104,6	143,8
<i>H. vulgare</i>	C	51,7	51,7	51,7	51,7	51,7
	T1	52,1	52,1	52,1	52,1	52,1
	T2	48,1	48,1	48,1	48,1	48,1
	T3	60,2	60,2	45,5	60,2	60,2

Este resultado sugiere en principio que *M. sativa* puede ser considerada como una planta acumuladora de níquel con un potencial uso en fitorremediación. Además, esto puede asociarse a los niveles de toxicidad que puede tolerar cada una de estas plantas. Se reporta que la concentración tóxica de Ni en suelo para *H. vulgare* es de 7 mg/kg m. s. y para *M. sativa* es de 17 mg/kg m. s. (Environmental Protection Agency, 2007). Teniendo en cuenta que los niveles de níquel alcanzados en el suelo con el tratamiento 3 para las mismas especies fueron 8.7 y 9.5 mg/kg para *H. vulgare* y *M. sativa* respectivamente, se encuentra que *H. vulgare* estuvo expuesta a niveles tóxicos de níquel, y por lo tanto la mayor capacidad de sobrevivir en suelos contaminados con níquel la tiene *M. sativa*.

En el cultivo de *H. vulgare* también se considera la alta capacidad de transferencia (o movilidad) que tiene el níquel desde el suelo a la planta, debido a que tiene la habilidad de formar complejos y así ser absorbido rápidamente, ya sea por ejemplo como un complejo péptido-níquel o un complejo histidina-níquel. Adicionalmente, en suelos agrícolas con un exceso de Cu y Zn se puede presentar competencia entre estos elementos con el Ni dado que

estos tres elementos pueden compartir el mismo sistema de absorción, lo que generaría deficiencia en uno de estos componentes y así presentarse síntomas de enfermedad o muerte de la planta (Liu *et al.*, 2011).



## CONCLUSIONES.

La determinación de la biodisponibilidad específica de un metal en los suelos permite estimar las trazas de elementos que están disponibles para las plantas. En este estudio, se concluye que la disponibilidad en suelo de los micronutrientes (Fe, Mn, Cu y Zn) no se ve afectada mayoritariamente por la adición de metales pesados, como el níquel. Con respecto al contaminante (níquel) se encontró que su adición a través de mecanismos de riego es efectiva, observándose una acumulación significativa al final del cultivo en las muestras de suelo a medida que su concentración aumentaba en cada uno de los tratamientos. Por la razón anterior, y teniendo en cuenta que las diversas interacciones químicas que hay entre los componentes del suelo y el metal favorecen su retención y acumulación, se observa una biodisponibilidad mayor de níquel.

El efecto que tiene la disponibilidad de níquel en el suelo sobre la concentración de cada uno de los micronutrientes no se puede generalizar sobre especies diferentes de plantas, debido a que esta relación es variable y está sujeta a diferentes factores ambientales y condiciones impuestas y propias de cada planta. Así, para *H. vulgare* se encontraron algunas relaciones entre micronutriente-níquel que apoyan otros resultados obtenidos por otros autores, así como resultados que contrastan de forma significativa. En tanto para *M. sativa* no se encontró una relación de proporción directa o indirecta entre micronutriente y aumento de la concentración de níquel.

Finalmente, de los resultados se sugiere que *M. sativa* es una planta con potencial de ser usada en el campo de la fitorremediación. Estos resultados deben apoyarse de experimentos que relacionen el crecimiento de la raíz y de la parte aérea de la planta ante diferentes concentraciones de exposición de níquel.

## 6. PROYECCIÓN FUTURA.

Los suelos pueden contaminarse con metales pesados y metaloides a través de emisiones industriales, residuos de la actividad minera, disposición de desechos metálicos, gasolina y pinturas con plomo, aplicación de fertilizantes, estiércol de animal, lodos de depuradoras, residuos de combustión del carbón, vertidos de la industria petroquímica o deposiciones atmosféricas. Los metales pesados que se consideran peligrosos y que se encuentran comúnmente en las áreas contaminadas son el plomo (Pb), cromo (Cr), arsénico (As), zinc (Zn), cadmio (Cd), cobre (Cu), mercurio (Hg) y níquel (Ni). Entre estos, la producción de cobre, zinc y níquel han sido las más altas históricamente. El níquel comprende aproximadamente el 3% de la composición de la corteza terrestre, estando en la posición 24 entre los elementos más abundantes del planeta. Su concentración promedio se encuentra habitualmente entre 5-500 mg/kg. Sin embargo, en suelos cercanos a refinerías de metal puede llegar a oscilar su concentración entre 24000 y 53000 mg/kg.

Bajo la situación ambiental que genera la contaminación de los suelos, es necesario establecer mecanismos para su protección, recuperación y restauración (remediación) que permitan alcanzar concentraciones de metales acumulados según la regulación que lo exija o las concentraciones a las cuales se considere que el lugar no es sitio de riesgo. Para alcanzar este propósito, se han encaminado muchas investigaciones y aplicaciones con el uso de plantas para la biorremediación de los suelos. En este sentido, la fitorremediación está siendo abordada actualmente en el mejoramiento del rendimiento y eficiencia de la remediación, por lo que los campos que están siendo potenciados incluyen el uso de: 1) Fitoextracción con agentes quelantes que aumenten la movilidad de los metales (sin aumentar el riesgo de lixiviación hacia aguas subterráneas) y que de tal forma puedan ser absorbidos de forma más fácil y rápida por las plantas; 2) Utilización de ingeniería genética para aumentar la capacidad de la planta de acumular grandes cantidades de metales o para mejorar la producción de biomasa; 3) Uso de técnicas agrícolas para promover el crecimiento óptimo de la planta a través del uso de fertilizantes o sistemas de cultivo adecuados; y 4) Uso de sistemas combinados de plantas-microorganismos que permitan degradar el contaminante de forma efectiva a partir de la promoción del crecimiento de la planta y la actividad metabólica de los microorganismos. A su vez, las investigaciones buscan establecer técnicas de fitorremediación exitosas que puedan disminuir la cantidad de contaminantes y reducir su desplazamiento hacia aguas subterráneas, y mejorar la calidad y productividad de los suelos.

La fitorremediación como tecnología comercial depende de la información y entendimiento que se tiene de los mecanismos y requerimientos para el crecimiento óptimo de las plantas. Por este motivo, son necesarios estudios que complementen la información necesaria para determinar especies biorremediadoras de suelos contaminados.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- AENOR. UNE 77308:2001. Calidad del suelo. Determinación de la conductividad eléctrica específica. Retrieved from [http://www.aenor.es/aenor/normas/normas/fichanorma.asp?tipo=N&codigo=N0024111#.WWg7L4g1\\_IU](http://www.aenor.es/aenor/normas/normas/fichanorma.asp?tipo=N&codigo=N0024111#.WWg7L4g1_IU)
- AENOR. UNE 77315: 2001. Calidad del suelo. Extracción de oligoelementos con una disolución tampón de ADTP. Retrieved from [http://www.aenor.es/aenor/normas/normas/fichanorma.asp?tipo=N&codigo=N0024091#.WWg7xYg1\\_IU](http://www.aenor.es/aenor/normas/normas/fichanorma.asp?tipo=N&codigo=N0024091#.WWg7xYg1_IU)
- AENOR. UNE 77317: 2001. Calidad del suelo. Determinación del contenido en carbonato. Método volumétrico. Retrieved from [http://www.aenor.es/aenor/normas/normas/fichanorma.asp?tipo=N&codigo=N0025221#.WWg7IYg1\\_IU](http://www.aenor.es/aenor/normas/normas/fichanorma.asp?tipo=N&codigo=N0025221#.WWg7IYg1_IU)
- Agnello, A. C. (2015). *Potential of alfalfa for use in chemically and biologically assisted phytoremediation of soil co-contaminated with petroleum hydrocarbons and metals*. Université Paris-Est. Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01131249>
- Al-Turki, A. I., & Helal, M. I. D. (2004). Mobilization of Pb, Zn, Cu and Cd, in Polluted Soil. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(11), 1972–1980. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2004.1972.1980>
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869–881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Alloway, B. J. (Ed.). (2013). *Heavy Metals in Soils* (Vol. 22). Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7>
- 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. <https://doi.org/10.22606/epp.2017.21003>
- Berg, J., Tom-Petersen, A., & Nybroe, O. (2005). Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Letters in Applied Microbiology*, 40(2), 146–151. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01650.x>
- Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., & Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytologist*, 173(4), 677–702. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x>

- Brun, L. A., Maillet, J., Hinsinger, P., & Pépin, M. (2001). Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, *111*(2), 293–302. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11202733>
- Brundrett, M., Ferguson, B., Gressshoff, P., Filleur, S., Mathesius, U., Munns, R., ... Watt, M. (2016). Nutrient uptake from soils. In R. Munns & S. Schmidt (Eds.), *Plants in Action* (2nd ed., p. 7). Australian Society of Plant Scientists. Retrieved from <http://plantsinaction.science.uq.edu.au/content/chapter-4-nutrient-uptake-soils>
- Brune, A., & Dietz, K. - J. (1995). A comparative analysis of element composition of roots and leaves of barley seedlings grown in the presence of toxic cadmium, molybdenum, nickel, and zinc concentrations. *Journal of Plant Nutrition*, *18*(4), 853–868. <https://doi.org/10.1080/01904169509364943>
- Craine, J. M., & Dybzinski, R. (2013). Mechanisms of plant competition for nutrients, water and light. *Functional Ecology*, *27*(4), 833–840. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12081>
- El-Jaoual, T., & Cox, D. A. (1998). Manganese toxicity in plants. *Journal of Plant Nutrition*, *21*(2), 353–386. <https://doi.org/10.1080/01904169809365409>
- Environmental Protection Agency. (2007). Ecological Soil Screening Levels for Nickel Interim Final. *Ecological Soil Screening Level (Eco-SSL)*, 133. Retrieved from [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/eco-ssl\\_nickel.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/eco-ssl_nickel.pdf)
- Gajewska, E., & Skodowska, M. (2007). Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *BioMetals*, *20*(1), 27–36. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9011-5>
- Ghasemi, R., & Ghaderian, S. M. (2009). Responses of two populations of an Iranian nickel-hyperaccumulating serpentine plant, *Alyssum inflatum* Nyar., to substrate Ca/Mg quotient and nickel. *Environmental and Experimental Botany*, *67*(1), 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.06.016>
- Hannam, R., Riggs, J., & Graham, R. (1987). Micronutrients. *Journal of Plant Nutrition*, *10*(9), 2039–2048. <https://doi.org/10.1080/01904168709363754>
- Iyaka, Y. A. (2011). Nickel in soils: A review of its distribution and impacts. *Scientific Research and Essays Special Review*, *6*(33), 6774–6777. <https://doi.org/10.5897/SREX11.035>
- Knudsen, D., Peterson, G. A., & Pratt, P. F. (1982). Lithium, sodium, and potassium. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. *Agronomy Monograph*, *2*(9), 225–246. Retrieved from <https://www.animalsciencepublications.org/publications/books/abstracts/agronomymonogra/>

methodsofsoilan2/225/preview/pdf

- Lasat, M. M. (2000). Phytoextraction of metals from contaminated soil: A review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research*, 2(5), 1–25. Retrieved from <https://www.engg.ksu.edu/HSRC/JHSR/vol2no5.pdf>
- Liu, G., Simonne, E. H., & Li, Y. (2011). Nickel Nutrition in Plants. *IFAS Extension University of Florida*, 6. Retrieved from <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/HS/HS119100.pdf>
- Liu, J. (1998). Cobalt : physiological effects and uptake mechanisms in plants / by Juhong Liu. Retrieved from <https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/handle/2440/19399>
- M.A.P.A. (1986). *Métodos oficiales de análisis. Tomo I, Tomo II, Tomo III*. Valencia: Secretaría General Técnica, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Retrieved from [https://books.google.com.co/books/about/Métodos\\_oficiales\\_de\\_análisis.html?id=faeLAAAACAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.co/books/about/Métodos_oficiales_de_análisis.html?id=faeLAAAACAAJ&redir_esc=y)
- Marschner, H. (1993). Zinc Uptake from Soils. In *Zinc in Soils and Plants* (pp. 59–77). Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-0878-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0878-2_5)
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780124735422>
- Martín Andrés, A., & Luna del Castillo, J. de D. (2004). *Bioestadística para las ciencias de la Salud (+)*. Ediciones Norma-Capitel. Retrieved from [https://books.google.com.co/books/about/Bioestadística\\_para\\_las\\_ciencias\\_de\\_la\\_Salud.html?id=kZ5NoA2BwjEC&redir\\_esc=y](https://books.google.com.co/books/about/Bioestadística_para_las_ciencias_de_la_Salud.html?id=kZ5NoA2BwjEC&redir_esc=y)
- Mengel, K. (1994). Iron availability in plant tissues – iron chlorosis on calcareous soils. *Plant and Soil*, 165, 275–283. <https://doi.org/10.2307/42939803>
- Mengel, K., Kirkby, E. A., Kosegarten, H., & Appel, T. (2001). Plant Nutrients. In *Principles of Plant Nutrition* (pp. 1–13). Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-010-1009-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-010-1009-2_1)
- Page, V., & Feller, U. (2015). Heavy Metals in Crop Plants: Transport and Redistribution Processes on the Whole Plant Level. *Agronomy*, 5(3), 447–463. <https://doi.org/10.3390/agronomy5030447>
- Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., Gomez, E., Tiemann, K. J., Parsons, J. G., & Carrillo, G. (2002). Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa growth and heavy metal uptake. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 119(3),

291–301. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12166663>

- Rahman, H., Sabreen, S., Alam, S., & Kawai, S. (2005). Effects of Nickel on Growth and Composition of Metal Micronutrients in Barley Plants Grown in Nutrient Solution. *Journal of Plant Nutrition*, 28(3), 393–404. <https://doi.org/10.1081/PLN-200049149>
- Reid, R., & Hayes, J. (2003). Mechanisms and control of nutrient uptake in plants. *International Review of Cytology*, 229, 73–114. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14669955>
- Rengel, Z. (2015). Availability of Mn, Zn and Fe in the rhizosphere. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15(ahead), 0–0. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000036>
- Sánchez, J. (2007). Fertilidad del suelo y nutrición mineral en plantas -Conceptos Básicos. *Fertitec S.A.*, 19. Retrieved from [http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/FERTILIDAD DEL SUELO Y NUTRICION.pdf](http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/FERTILIDAD_DEL_SUELO_Y_NUTRICION.pdf)
- Santos, E. F. dos, Zanchim, B. J., Campos, A. G. de, Garrone, R. F., & Lavres Junior, J. (2013). Photosynthesis rate, chlorophyll content and initial development of physic nut without micronutrient fertilization. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, 37(5), 1334–1342. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832013000500022>
- Seregin, I. V., & Kozhevnikova, A. D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(2), 257–277. <https://doi.org/10.1134/S1021443706020178>
- Sharma, P., & Pandey, S. (2014). Status of Phytoremediation in World Scenario. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 2(4), 178–191. <https://doi.org/10.12691/IJEBB-2-4-5>
- Shukla, R., Sharma, Y. K., & Shukla, A. K. (2014). Molecular mechanism of nutrient uptake in plants. *International Journal of Current Research and Academic Research*, 2(12), 142–154.
- Sierra, M. J., Millán, R., Cardona, A. I., & Schmid, T. (2011). Potential cultivation of *Hordeum vulgare* L. in soils with high mercury background concentrations. *International Journal of Phytoremediation*, 13(8), 765–778. <https://doi.org/10.1080/15226514.2010.525559>
- Sridhar, B. B. M., Han, F. X., Diehl, S. V., Monts, D. L., & Su, Y. (2007). Effects of Zn and Cd accumulation on structural and physiological characteristics of barley plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(1), 15–22. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202007000100002>
- Tandon, H. L. S. (1995). Micronutrients in soils, crops and fertilisers. *Micronutrients in Soils*,

*Crops and Fertilisers - a Sourcebook - Cum - Directory (1995)* - Retrieved from  
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19951906656>

Taylor, R. W., & Allinson, D. W. (1981). Influence of lead, cadmium, and nickel on the growth of *Medicago sativa* (L.). *Plant and Soil*, 60(2), 223–236. <https://doi.org/10.1007/BF02374107>

Uren, N. C. (1992). Forms, Reactions, and Availability of Nickel in Soils (pp. 141–203).  
[https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60937-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60937-2)

Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M. Lou, Briat, J.-F., & Curie, C. (2002). IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *The Plant Cell*, 14(6), 1223–33. Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12084823>



## ANEXOS



**Figura A1.** Suelo agrícola salino.



**Figura A2.** Aplicación del tratamiento a las plantas.



**Figura A3.** Plantas antes del secado en estufa.



**Figura A4.** Recogida de suelos.



**Figura A5.** Tamizado.



**Figura A6.** Procesamiento de material y trabajo de laboratorio.

