



**ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA**



**INSTITUTO DE RECURSOS
NATURALES Y AGROBIOLOGÍA
DE SEVILLA**

**CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

Efecto de ramnolípido JBR-425 en el desarrollo de *Brassica juncea* en suelos de huertos urbanos de Sevilla

Trabajo Fin de Grado presentado por: **Pedro del Río Guijarro**

Titulación: Grado en Ingeniería Agrícola.
Mención en hortofruticultura y jardinería.

Sevilla, septiembre 2019.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA

Efecto de ramnolípido JBR-425 en el desarrollo de Brassica juncea en suelos de huertos urbanos de Sevilla

Trabajo fin de grado llevado a cabo en:

- Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola (Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Universidad de Sevilla).
- Departamento de Protección del Sistema Suelo-Planta-Agua del IRNAS-CSIC.

Presentado por D. Pedro del Río Guijarro

Tutores:

Dña. María del Carmen Florido Fernández
Dra. en Ciencias Químicas.
Universidad de Sevilla.

D. Rafael López Núñez
Dr. en Ciencias Químicas.
Científico Titular (CSIC).

Sevilla, septiembre 2019

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dedicar unas palabras a todas esas personas que aportaron su granito de arena para que yo pudiera realizar este trabajo:

A mi tutora María del Carmen Florido agradecerle ese gran amor y esmero que pone en su trabajo, involucrándose en cuerpo y alma en mi aprendizaje durante todo el proyecto. Ha hecho fácil lo difícil, guiándome en todo momento.

A mi tutor Rafael López Núñez, por acercarme más al mundo de los huertos urbanos y darme las herramientas necesarias para la realización de este TFG.

Al Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS) y el Centro de Investigación Tecnológica e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITUS) por brindarme la posibilidad de desarrollar este estudio en sus instalaciones, así como la amabilidad de su personal, facilitándome todos los materiales necesarios.

A mis padres por incentivar me en mis estudios pudiendo llegar a esta etapa final gracias a su apoyo incondicional. Gracias por creer en mí.

A mis amigos por estar ahí con sus sabios consejos en los momentos más difíciles y de mayor presión, por ayudarme a superar algunas asignaturas y alentarme a no tirar nunca la toalla.

Gracias también a mi novia Nora por ser un pilar importante en mi vida e incluso haber sacado tiempo para ayudarme a finalizar este trabajo.

RESUMEN DEL TFG

La necesidad actual de recuperar los suelos contaminados con metales potencialmente tóxicos para disminuir su impacto en el medio, así como en la cadena trófica, hace que se desarrollen métodos para su extracción. Existe una preocupación adicional cuando la contaminación se produce en suelo urbano donde existe un cierto aprovechamiento, como es el caso de los huertos urbanos.

La fitoextracción es una técnica que busca la extracción de esos metales mediante la utilización de plantas, incorporándolas en su biomasa. Esta técnica puede ser potenciada mediante la aplicación de biosurfactantes biodegradables favoreciendo la biodisponibilidad de los contaminantes y su posterior asimilación en planta. A esta técnica se le denomina fitoextracción asistida o inducida.

Existen numerosos estudios donde se ha demostrado la gran eficacia que tienen las plantas de *Brassica juncea* como fitoextractoras y más cuando éstas son ayudadas por los agentes quelantes.

En este trabajo se busca evaluar la extracción de metales pesados de suelos contaminados procedentes de un parque de la localidad de Sevilla usando plantas de *Brassica juncea*, así como estimar la mejora que supone la aplicación de un biosurfactante biodegradable (Ramnolípido JBR-425).

Para ello se realizó un ensayo en invernadero con dos suelos de un parque urbano y otro agrícola en los que se sembró *Brassica juncea*. Cuando la planta creció, durante dos semanas se añadió a la mitad de las macetas una disolución de Ramnolípido JBR-425 con una concentración de 1000 mg/kg para evaluar su efecto.

Durante el ensayo en invernadero se evaluó el desarrollo que tuvieron las plantas en número de hojas, así como su altura de planta, hasta que esta llegó a producir semillas viables. Los datos recogidos evidenciaron un efecto negativo producido tanto por la contaminación del suelo como por la presencia del ramnolípido.

El suelo que se usó en el experimento, así como las plantas, se recogieron para su posterior análisis. Las muestras vegetales se dividieron en parte aérea, raíz y frutos, para determinar las cantidades de metales pesados en el suelo y extraídos en la parte aérea.

Para la extracción de los metales pesados en suelo se realizó una extracción con AEDT y posteriormente se midieron mediante ICP-OES. Así mismo también se midieron parámetros como conductividad eléctrica y pH.

Para la extracción de los metales extraídos por las plantas se realiza una digestión ácida de las muestras vegetales para luego medirlas usando ICP-OES.

Las plantas tratadas con ramnolípido presentaron un menor desarrollo tanto en altura de planta como en número de hojas; así mismo, la capacidad de producción de biomasa se vió mermada. Estos factores pueden deberse al efecto tóxico del ramnolípido, así como el efecto propio de los Elementos Potencialmente Tóxicos.

Aunque las plantas con aplicación de ramnolípido presentaron mayores concentraciones de metales pesados en sus tejidos, al haber una notable disminución de la biomasa estos no llegaron a extraer tanta cantidad como las plantas sin tratamiento.

INDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Problemática de la contaminación en suelos	1
1.1.1 Contaminación causada por metales pesados	1
1.1.2. Evaluación de la contaminación	2
1.1.2 Elementos potencialmente tóxicos	3
1.2. Riesgos ambientales. Movilidad y biodisponibilidad de los EPTs	5
1.2.1. Factores del suelo que afectan a la movilidad de los elementos potencialmente tóxicos6	
1.2.2. Biodisponibilidad de elementos potencialmente tóxicos.....	8
1.3. Recuperación de los suelos contaminados por EPTs	8
1.3.1 Fitorrecuperación o fitorremediación	9
1.3.2. Fitoextracción inducida por agentes quelantes	11
1.4. Biosurfactantes.....	13
1.4.1. Composición y función de los biosurfuctantes	13
1.4.2 Recuperación mediante biosurfuctantes de suelos contaminados por EPTs	14
1.5 <i>Brassica juncea</i>.....	14
1.5.1 Identificación y descripción botánica de la planta	14
1.5.2. Habitat.....	15
1.5.3. Biología y ecología	16
1.5.4. Usos de <i>Brassica juncea</i> como planta fitoextractora.....	16
1.6. Ensayos de germinación.....	17
1.7. Huertos Urbanos.....	18
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1 MATERIALES	21
3.1.1 Material vegetal	21
3.1.2 Suelo.....	21
3.1.3 Ramnolipido JBR-425.....	22
3.1.4 Placas petri.....	23
3.1.5 Macetas.....	23

3.2 MÉTODOS.....	23
3.2.1 Medidas previas de pH y conductividad.....	23
3.2.2 Experimentos de germinación en placa	24
3.2.3 Ensayo en invernadero.....	26
3.2.4 Extracción de metales disponibles con AEDT en los suelos	37
3.2.6 Determinación de metales disponibles en suelo por ICP-OES.....	38
3.2.7. Determinación de metales totales en suelo por fluorescencia de rayos X.....	39
3.2.8. Determinación de metales extraídos por la planta medidos por ICP-OES	39
3.2.9. Análisis estadístico	40
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1 Conductividad eléctrica y pH de los suelos.....	41
4.2 Concentración total de metales por fluorescencia de rayos X.....	43
4.3 Concentración de metales extraíbles con AEDT	43
4.4 Resultados de germinación en placas Petri	45
4.5 Seguimiento de las plantas en invernadero.....	47
4.5.1 Seguimiento de la altura de planta y número de hojas en Invernadero.....	47
4.5.2. Seguimiento de la floración en las plantas en invernadero.	48
4.6. Cosecha en ensayo en invernadero.	49
4.6.1. Estudio de la fructificación en el ensayo en invernadero.	49
4.6.2. Estudio de la biomasa en el ensayo en invernadero.....	51
4.6.3 Estudio de la Tasa de Crecimiento Relativo (TCR).....	52
4.6.4. Concentración de metales pesados en planta medidos por ICP-OES	53
4.7. Metales extraídos por las plantas	55
5. CONCLUSIONES	57
6. BIBLIOGRAFIA	59

Índice de Tablas

Tabla 1: Aportes máximos anuales de metales pesados (kg/ha) para suelos de diferentes capacidades de intercambio catiónico, (Fuentes Yagüe, 1999).	2
Tabla 2: Elementos tóxicos según diferentes autores. Rojo intenso para mayor toxicidad, naranja para toxicidad media, naranja pálida para toxicidad moderada a baja y amarillo para toxicidad baja (Pena-Pérez, 2016).	3
Tabla 3: Principales agentes quelantes.	12
Tabla 4: Caracterización del suelo utilizado.	22
Tabla 5: Tratamientos para ensayo en invernadero	30
Tabla 6: Distribución de repeticiones del ensayo en invernadero.	30
Tabla 7: Conductividad Eléctrica en extracto (1:5), pH en extracto acuoso (1:2,5), pH de los extractos con EDTA 0,5M (tamponado a pH7) (1:10) en los suelos originales.	41
Tabla 8: Conductividad Eléctrica media en extracto (1:5), pH medio en extracto acuoso (1:2,5), pH medio de los extractos con EDTA 0,5M (tamponado a pH7) (1:10). Valores medios y D.E. de tres replicados para cada suelo y tratamiento (N=3) tras el experimento en invernadero. Análisis de la Varianza según el Modelo Lineal General (MLG).	42
Tabla 9: Concentraciones de metales medidos por fluorescencia de rayos X.	43
Tabla 10: Concentraciones medias finales de Cu, Zn, Pb, Fe y Mn en mg/kg de suelo, extraídos con EDTA 0,5M (tamponado a pH 7) determinados mediante ICP-OES. Valores medios y D.E. de tres replicados para cada suelo y tratamiento (N=3). Análisis de la Varianza según el Modelo Lineal General (MLG).	44
Tabla 11: Concentraciones medias de Cu, Zn, Pb, Fe y Mn en mg/kg (m.s.) de parte aérea de plantas de Brassica juncea. Valores medios y desviación estándar (D.E.) de tres replicados para cada suelo y tratamiento (N=3). Análisis de la Varianza según el Modelo Lineal General (MLG).	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 12: Metales extraídos por las plantas (mg/kg Suelo)	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación molecular de mono-ramnolípidos (parte superior) y di-ramnolípidos (parte inferior) producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Fuente: (Lovaglio y col., 2011).	22
Figura 2: Macetas utilizadas para el ensayo en invernadero.	23
Figura 3: Suspensiones suelo:agua (1:2,5) para la medida de pH en disolución acuosa.	24
Figura 4: Medida de longitud radicular de semillas germinadas en papel (primer ensayo).	25
Figura 5: Segundo ensayo de germinación en placa con los sustratos: arena, suelo S1 y suelo S2.	26
Figura 6: Infraestructuras del invernadero (CITIUS, 2018): a) sistema de refrigeración, b) sistema de sombreado, c) estación de parámetros meteorológicos, d) grupo electrógeno, e) controlador lógico, f) mesa rodante.	27
Figura 7: Temperaturas diarias media, máxima y mínima.	28
Figura 8: Humedad diaria media, máxima y mínima.	29
Figura 9: Radiación diaria media, máxima y mínima.	29
Figura 10: Distribución al azar de los tratamientos en la mesa de trabajo.	31
Figura 11: Ejemplo de elementos gruesos retirados en el tamizado.	32
Figura 12: Disposición de las macetas en cajones.	33
Figura 13: Macetas distribuidas aleatoriamente.	34
Figura 14: Plántulas con cinco hojas verdaderas, obtenidas en el aclareo.	35
Figura 15: Plantas ordenadas por tratamiento y repetición. a) Suelo 1, b) Suelo 2, c) Suelo 3 (Control).	36
Figura 16: Agitado de la disolución de AEDT.	38
Figura 17: <i>Elongación radicular (cm)</i> , en el eje primario y mediante barras, y número de semillas germinadas, indicada mediante línea en el eje secundario, de <i>Brassica juncea</i> y <i>Lactuca sativa</i> en el primer ensayo. <i>Media y D.E. (N=20)</i> .	45
Figura 18: Índice de germinación en tanto por ciento de <i>Brassica juncea</i> y <i>Lactuca sativa</i> con distintos sustratos. (N=5).	46
Figura 19: Evolución de la altura del tallo (A) y del número de hojas (B) (N=12). Efecto del tipo de suelo x tratamiento con RL. Análisis de la varianza (MLG) Anova de una vía de medidas repetidas. Letras diferentes indican efecto significativo del tratamiento en la evolución ($p < 0,05$).	47
Figura 20: Evolución del porcentaje de floración (N=12). Las barras de error representan la D.E.	49
Figura 21: Peso fresco de frutos (A) y número de frutos (B), cosechados al final del ensayo en cada tratamiento (N=3). Barras de error representan D.E. Análisis de la varianza (MLG). Efecto del Suelo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre distintos suelos. Interacción Suelo x RL, letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias estadísticamente significativas entre distintos tratamientos (Test de Duncan, $p < 0,05$).	50

Figura 22: Peso fresco de la parte aérea (A) y peso seco de la parte aérea (B), peso fresco de la raíz (C) y Peso seco de la raíz (D), cosechados al final del ensayo en cada tratamiento (N=3). Barras de error representan D.E. Análisis de la varianza (MLG). Efecto del Suelo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre distintos suelos. Interacción Suelo x RL, letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias estadísticamente significativas entre distintos tratamientos (Test de Duncan, $p<0,05$). 52

Figura 23: Tasa de crecimiento relativo (TCR) (N=3). Barras de error representan D.E. Análisis de la varianza (MLG). Efecto del Suelo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre distintos suelos. Interacción Suelo x RL, letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias estadísticamente significativas entre distintos tratamientos (Test de Duncan, $p<0,05$). 53

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática de la contaminación en suelos

1.1.1 Contaminación causada por metales pesados

En todos los suelos siempre podremos encontrar pequeñas cantidades de metales pesados en su composición; algunos de estos cationes son necesarios para el normal desarrollo de las plantas. Cuando las cantidades de estos elementos se encuentran por encima de ciertos límites puede darse el caso de contaminación y producir fitotoxicidad. (Prieto Mendez y col., 2009).

Normalmente el incremento de los metales pesados suele tener un origen antrópico de diversas fuentes según Fuentes Yagüe (1999):

- Aportes excesivos de excrementos animales con altos porcentajes de cobre y zinc provenientes del pienso.
- Residuos sólidos urbanos así como lodos de depuradora con grandes contenidos de cobre.
- Desechos producidos en zonas industriales.
- Las zonas cercanas al tráfico urbano o vías de comunicación reciben la contaminación mediante la quema de hidrocarburos pasando éstos de la atmósfera al suelo.
- Pesticidas empleados antiguamente a base de cobre, mercurio y otros metales pesados; y algunos fitosanitarios como el sulfato de cobre.

Algunos cationes pesados como el Manganeso, Cobre y Zinc, generalmente polivalentes, son adsorbidos por el complejo de cambio con mucha energía dificultando su extracción desde el suelo. El autor propone que la concentración de metales pesados no debe exceder de estas cantidades para un pH entre 6 y 7:

- Cadmio (1-3 mg/kg de suelo).
- Zinc (150-300 mg/kg de suelo).
- Cobre (50-140 mg/kg de suelo).
- Mercurio (1-1,5 mg/kg de suelo).
- Niquel(30-75ppm)
- Plomo(50-70ppm)

Para pH superiores los contenidos se pueden incrementar ligeramente.

Tabla 1: Aportes máximos anuales de metales pesados (kg/ha) para suelos de diferentes capacidades de intercambio catiónico, (Fuentes Yagüe, 1999).

CIC meq/100g	Cadmio	Zinc	Cobre	Níquel	Plomo
<5	5,5	280	140	140	560
5-15	11	560	280	280	1120
>15	22	1120	560	560	2240

1.1.2. Evaluación de la contaminación

Fuentes Yagüe (1999) define la biodisponibilidad de un contaminante como la cantidad de ese contaminante que puede ser absorbido por un determinado organismo y la mide por los efectos que causa. Este autor también expone que la absorción de contaminantes por organismos del suelo altera las funciones de esos organismos afectando a la capacidad depuradora del suelo que sólo desarrollan aquellos microorganismos lo suficientemente resistentes.

El efecto de los elementos potencialmente tóxicos (EPTs) varía en función del suelo donde se desarrolle su estudio. Por ejemplo, existen diferencias cuando el pH del suelo varía, siendo estos EPTs más móviles cuando el pH es ácido, favoreciendo así su absorción en plantas.

Para la evaluación de los contaminantes en el suelo se utilizan dos procedimientos: El análisis químico de suelos y plantas en laboratorio (Evaluación cuantitativa) o el bioensayo con organismos de distintos niveles en la cadena trófica (Evaluación cualitativa).

La contaminación en suelos por EPTs llega a producir efectos negativos sobre el crecimiento y normal desarrollo de distintos organismos, así como en su calidad (Maqueda, 2003).

La presencia de determinadas bacterias y su población, no solo depende de la presencia o no de contaminantes, sino también del pasado que el suelo haya tenido; las bacterias, participan en numerosos procesos bioquímicos que tienen lugar en el suelo cambiando sus propiedades. Se estima que en un gramo de suelo con poca presencia de EPTs, su contenido en microorganismos es de entre 10^7 y 10^9 por cada gramo de suelo. (Doménech, 1993).

La procedencia de esta contaminación en suelos suele tener dos orígenes distintos: la endógena (origen in situ) o la exógena (origen externo al lugar donde se produce la contaminación). Estos dos orígenes ocasionan al medio en el que actúa

variaciones en las reacciones acido-base, oxidación, oxidación-reducción, complejación y adsorción-desorción descompensando el equilibrio que pueda existir en los suelos y desplazando las posibles especies que coexisten en este medio.

En España existe una ley que ampara la regulación de suelos contaminados, como es la Ley 22/2011 del 28 de Julio de Residuos y suelos contaminados. Así mismo existe un Real Decreto 9/2005 del 14 de Enero, modificada por la Orden PRA/1080/2017 el 2 de Noviembre, en el que se establecen actividades potencialmente contaminantes del suelo y las actuaciones y criterios a realizar para declarar zonas contaminadas.

En Andalucía, la Ley 7/2007 de Julio dentro de la Ley de Gestión Integrada de la calidad Ambiental, incluye algunas disposiciones sobre suelos contaminados en el capítulo IV del Título IV.

Dicha ley fue desarrollada en el Decreto 18/2015, de Enero, en el que se aprueba el reglamento que regula el régimen aplicable a los suelos contaminados.

1.1.2 Elementos potencialmente tóxicos

Podemos definir los elementos potencialmente tóxicos (EPTs) como aquellos elementos metálicos que pueden producir toxicidad en el medio afectando tanto al suelo como a los seres vivos que habitan en él, teniendo un periodo de recuperación alto.

Tabla 2: Elementos tóxicos según diferentes autores. Rojo intenso para mayor toxicidad, naranja para toxicidad media, naranja pálida para toxicidad moderada a baja y amarillo para toxicidad baja (Pena-Pérez, 2016).

Elementos muy tóxicos																	
H	Elementos Tóxicos																He
Li	Be	Elementos de toxicidad moderada										B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg	Toxicidad en determinadas condiciones										Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	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	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac															

Los primeros hombres ya aprendieron a extraer metales en la edad de cobre y con ello trajeron la contaminación de nuestro entorno. Actualmente el ritmo de contaminación por metales pesados es considerablemente mayor que en aquella

época teniendo un efecto negativo a largo plazo una vez que las concentraciones de estos contaminantes alcanzan niveles tóxicos para la vida de determinados organismos.

La toxicidad de algunos metales ya se conoce desde hace muchos años, los griegos y romanos ya diagnosticaban síntomas de envenenamiento por plomo que en muchas ocasiones acababa en la muerte.

De los 118 elementos conocidos por el hombre, 91 de ellos son metales. Aún así, no todos los metales tienen el mismo comportamiento en el medio con las mismas concentraciones; por ejemplo, el hierro es un elemento esencial para los seres vivos, y sólo llega a ser tóxico en concentraciones muy superiores a las de cobre. Los EPTs suponen un peligro para el medio ya que, al no ser biodegradables permanecen en el suelo indefinidamente afectando a las plantas y animales que pueden ingerirlos por error.

El término metales pesados puede resultar ambiguo, ya que algunos autores los diferencian por su densidad o peso atómico (Breckle, 1991; Tiller, 1989) mientras que otros se basan en sus propiedades o toxicidad.

Para este estudio se definen como metales pesados a aquellos elementos que tienen una densidad igual o superior a 5 g cm^{-3} cuando están en forma elemental, extendiéndose a elementos de carácter metálico con número atómico superior a 20 (excluyendo metales alcalinos y alcalino-térreos). Junto a estos metales hay otros elementos químicos que se suelen englobar con ellos por presentar orígenes y comportamientos asociados; es este el caso del As, B, Ba y Se.

Dentro de los EPTs hay dos grupos:

- Oligoelementos o micronutrientes: Se necesitan en pequeñas cantidades o cantidades traza. Pasado un cierto umbral se consideran tóxicos. En este grupo están: As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn.
- Metales sin función biológica conocida: Resultan altamente tóxicos provocando disfunciones y tienen tendencia a la bioacumulación. En este grupo se encuentran el Pb y el Hg.

1.2. Riesgos ambientales. Movilidad y biodisponibilidad de los EPTs

Actualmente existe una clara tendencia por parte de los países industrializados a contaminar los suelos con EPTs. Estos elementos producen tales toxicidades que acaban restringiendo el uso de esos terrenos a otras prácticas diferentes de la agricultura, debido principalmente a los riesgos que conlleva para la salud humana. Así mismo, esta contaminación supone un riesgo de mayor extensión cuando afecta a la calidad de las aguas, tanto subterránea como superficial.

Las características del suelo juegan un papel importante en reducir o aumentar la disponibilidad y toxicidad de los EPTs en el suelo (Colombo y col., 1998).

Los metales contaminantes tienden a aparecer en mayores proporciones en la parte más cercana a la superficie (entre los 0-40 cm). (Baird, 1999). Esto tiene un efecto perjudicial ya que las plantas suelen presentar su mayor desarrollo radicular en esos primeros centímetros de suelo. Las plantas que se desarrollan en suelos contaminados tienden a absorber más oligoelementos y EPTs que aquellas que crecen en suelos con concentraciones normales. La concentración de EPTs en tallo y hoja tiene relación con la concentración de éstos en el suelo y especialmente en la solución del suelo (Kabata-Pendias, 2001).

Los efectos desfavorables que pueden tener estos EPTs en el suelo pueden ser:

- Quedan retenidos en el suelo, ya sean disueltos en la solución o bien fijados por procesos de adsorción, complejación y precipitación.
- Llegan a ser absorbidos por las plantas y, de ese modo, llegar a la cadena trófica.
- Contaminación de la atmósfera por volatilización.
- Pueden solubilizarse y llegar a las aguas superficiales o subterráneas.

1.2.1. Factores del suelo que afectan a la movilidad de los elementos potencialmente tóxicos

La contaminación de los suelos afecta de diversas maneras dependiendo de las siguientes características edáficas de éstos:

- pH:
Los metales tienen tendencia a estar más disponibles con pH ácido a excepción del As, Mo, Se y Cr que les es más favorable el suelo alcalino. Por el contrario, a pH elevado, los metales precipitan como hidróxidos reduciendo así su solubilidad y biodisponibilidad.
- Textura:
Los suelos con mayor Capacidad de Intercambio Catiónico son los que tienen los porcentajes más altos de arcilla. Esto favorece la capacidad de adsorción de estos EPTs y dificulta la movilidad a las capas más inferiores.
- Mineralogía:
La composición inicial del suelo influye ya que cada mineral tiene unos determinados valores de superficie específica y descompensación eléctrica. Ambas características son las responsables del poder de adsorción de cada grupo de minerales.
Los óxidos e hidróxidos de Fe y Mn, juegan un importante papel en la retención de los metales. Tienen una alta capacidad de fijar los metales. Además, estos compuestos se presentan finamente diseminados en la masa del suelo por lo que son muy activos. Los suelos con altos contenidos de Fe y Mn tienen una gran capacidad de adsorber metales, especialmente Cu, Pb y en menor extensión Zn, Co, Cr, Mo y Ni.
- Materia Orgánica:
Muchos elementos forman complejos con la materia orgánica del suelo, pudiendo tener un doble efecto en la movilidad de EPTs. La materia orgánica soluble puede formar complejos que movilicen los metales,

mientras que la materia orgánica no soluble puede inmovilizarlos. La complejación por la materia orgánica del suelo es uno de los procesos que gobiernan la solubilidad y la biodisponibilidad de EPTs. La toxicidad de los metales se potencia en gran medida por su fuerte tendencia a formar complejos organometálicos, lo que facilita su solubilidad, disponibilidad y dispersión. La estabilidad de muchos de estos complejos frente a la degradación por los organismos del suelo es una causa muy importante de la persistencia de la toxicidad. Pero también la presencia de abundantes quelatos puede reducir la concentración de otros iones tóxicos en la solución del suelo.

- Condiciones redox:

El potencial de oxidación-reducción es el responsable de que los elementos se puedan encontrar en una forma u otra de oxidación, con las propiedades intrínsecas de cada una. Estas condiciones redox influyen también a aquellos metales asociados o adsorbidos a hidróxidos de Fe y Mn.

- Salinidad:

La salinidad afecta a la movilidad de los metales pesados por dos vías:

-Los cationes Sodio y Potasio pueden reemplazar a los metales en lugares de adsorción.

-Los aniones cloruro forman complejos solubles estables con metales como el Cadmio, Zinc y Mercurio.

Estos factores afectan a la disponibilidad relativa por las plantas y por tanto a la incorporación en los organismos.

Otro factor que influye es el tiempo que pasan esos metales pesados en el suelo. A este proceso se le llama envejecimiento, y provoca que esos metales adquieran posiciones de adsorción más fuertes donde acaban fuertemente retenidos.

1.2.2. Biodisponibilidad de elementos potencialmente tóxicos

El término biodisponibilidad es muy usado en la actualidad en distintas disciplinas. En el contexto que nos ocupa biodisponibilidad hace referencia a la extensión en que un contaminante está disponible para ejercer un efecto adverso sobre los seres humanos u otros organismos (Batelle y Exponent, 2000; Kelley y col. 2002). En una evaluación de riesgos medioambientales que incluya suelos y sedimentos, esta definición incluye la extensión en que el metal se puede disociar del medio en que se encuentra y llegar a estar disponible para ser absorbido (Batelle y Exponent, 2000).

Otros estudios han demostrado la capacidad propia de las plantas como bioindicadores de la fitodisponibilidad y biodisponibilidad de los EPTs presentes en el suelo (Basta y Gradwohl, 2000). Usar plantas como bioindicadoras para el estudio de los contaminantes presentes en el suelo es aún un territorio poco consensuado donde no existe una metodología aceptada universalmente. Aún así, algunos autores describen ciertos procedimientos (Hund-Rinke y col., 2003). También existen estudios en los que se utilizan pequeños invertebrados del suelo y se evalúa la mortalidad, crecimiento y desarrollo, así como su acumulación de contaminantes. (Conder y Lanno, 2000; Conder y col., 2001; Lanno y col., 2004).

1.3. Recuperación de los suelos contaminados por EPTs

Los metales no se degradan, así que pueden acumularse en el ecosistema provocando concentraciones elevadas y efectos adversos en la mayoría de los organismos; por ello, se han desarrollado técnicas para recuperar suelos contaminados por EPTs (Gardea-Torresday y col., 2002; Kärenlampi y col., 2000).

Como los metales no se degradan en el suelo, la solución que se ha propuesto se basa en la extracción o en la inmovilización de estos metales en la matriz edáfica.

Por esta razón diversas investigaciones se han enfocado a desarrollar técnicas que exploten de forma conjunta los procesos biológicos dependientes de plantas y microorganismos, así como procesos químicos como el uso de agentes quelatantes o secuestrantes (Maqueda, 2003).

1.3.1 Fitorrecuperación o fitorremediación

Se entiende por fitorrecuperación o fitorremediación el uso de plantas para extraer contaminantes del suelo, usando la capacidad de éstas de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de sustancias tóxicas como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos (PQB, 2003).

La fitorrecuperación de suelos contaminados se basa en el uso conjunto de plantas, enmiendas del suelo y técnicas agronómicas para eliminar, retener, o disminuir la toxicidad de los contaminantes del suelo (Chaney y col., 1997). Este grupo de fitotecnologías reúne un gran número de ventajas, especialmente su carácter verde y la economía; no utilizan reactivos químicos peligrosos, ni afectan negativamente a la estructura del suelo; además, el proceso se realiza *'in situ'* evitando costosos transportes (Cunningham y col., 1995).

Actualmente la práctica más frecuente para el tratamiento de zonas contaminadas consiste en la excavación y el depósito en vertederos, o el tratamiento físico-químico. Por ello, resulta atractiva la capacidad de las plantas para extraer, contener o inmovilizar los metales y así fitorrecuperar suelos contaminados. Las plantas actúan a través de dos mecanismos:

- Estabilización/Fijación de los contaminantes en suelo.
- Absorción por las raíces y su acumulación en la parte aérea de las plantas.

Estas cualidades de algunas plantas hiperacumuladoras han despertado un gran interés en la comunidad científica y obliga a resolver problemas relativos a otras disciplinas. Brooks, (1998) hace hincapié en la importancia, para el avance de la fitorrecuperación, en la integración de diversos campos científicos como botánica, fisiología, agronomía, química y genética.

Estas fitotecnologías se pueden clasificar en:

- Fitoextracción: Uso de plantas acumuladoras de EPTs o compuestos orgánicos para retirarlos del suelo mediante su absorción y concentración en las partes cosechables.

- Fitoestabilización/fitoinmovilización: Uso de plantas para reducir la biodisponibilidad de los contaminantes del entorno, mejorando las propiedades físicas y químicas del medio.
- Fitovolatilización: Uso de plantas para eliminar los contaminantes del suelo mediante volatilización.
- Fitodegradación: Uso de plantas y microorganismos asociados para degradar contaminantes orgánicos.

Esta técnica por si misma tiene también una serie de limitaciones como:

- El contaminante tiene que estar cercano a la rizosfera.
- Las condiciones físicas y químicas del suelo (pH, salinidad, contenido en materia orgánica...) que limita el crecimiento de la planta.
- La concentración del contaminante; llegando a ser problemático en concentraciones por encima del umbral tolerable por la planta.
- Riesgos de lixiviación de los EPTs más móviles.
- Las fitorecuperación llega hasta donde lleguen las raíces.
- El tiempo del proceso puede ser prolongado.

Estas condiciones limitan su aplicación en grandes superficies con contaminación baja y con plazos de recuperación relativamente altos.

Aun así esta técnica presenta una serie de ventajas como pueden ser:

- Realización de la práctica in situ, sin necesidad de transportar el sustrato contaminado.
- Bajo costo material consistente en el sembrado de las especies fitoextractoras.

- Permiten su aplicación tanto en suelo como en aguas.
- Sólo requieren prácticas agronómicas convencionales.
- Actúan mejorando las propiedades físicas y químicas del suelo.
- Son medioambientalmente aceptables ya que se basan en la formación de una cubierta vegetal
- Existen procesos degradativos en los que, la presencia de vegetación, favorece.

Se conoce la existencia de plantas hiperacumuladoras en las que se dan problemas de crecimiento; por ello se propone el uso de plantas resistentes a EPTs que son capaces de producir más biomasa y así mayor extracción.

1.3.2. Fitoextracción inducida por agentes quelantes

El proceso de fitoextracción puede ser mejorado mediante la aplicación de agentes quelantes, facilitando la absorción de los EPTs por parte de las plantas. Su método de acción consiste en fomentar la movilidad de estos metales y así translocarlos a las plantas.

Existen dos estrategias:

- Fitoextracción continua: Se basa en el cultivo de especies hiperacumuladoras.
- Fitoextracción asistida o inducida: Se basa en la creación de cultivos de elevada biomasa inducidos a acumular altas concentraciones de metales mediante la aplicación de enmiendas químicas al suelo, como los agentes quelantes.

Los agentes quelantes forman complejos muy estables con los metales, aumentando su solubilidad y de ese modo son más fácilmente absorbidos por las plantas.

Dependiendo del poder de complejación de los metales, estos agentes quelantes se pueden dividir en:

- Fuertes: AEDT, HEEDTA, DPTA, NTA.
- Medios: Poliflavonoides, sulfonatos, ácidos húmicos y fúlvicos, aminoácidos, ácido glutámico, polifosfatos...
- Débiles: Ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido tartárico (Bertsch, 1995).

El poder de complejación afecta a la eficiencia de aplicación, debido a que cuanto más fuerte sea el quelante, más estable es el complejo y mejor absorción.

Tabla 3: Principales agentes quelantes.

Agente quelatante	Fórmula	
AEDT (Ácido etilendiaminotetracético)	$C_{10}H_{16}N_2$	$\begin{array}{c} \text{HOOC-CH}_2 \diagdown \\ \text{HOOC-CH}_2 \diagup \end{array} \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{c} \diagup \text{CH}_2\text{-COO} \\ \diagdown \text{CH}_2\text{-COO} \end{array}$
DPTA (Ácido dietilentriaminopentacético)	$C_4H_{23}O_{10}N_3$	$\begin{array}{c} \text{HOOC-CH}_2 \diagdown \\ \text{HOOC-CH}_2 \diagup \end{array} \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{c} \diagup \text{CH}_2\text{-COO} \\ \diagdown \text{CH}_2\text{-COO} \end{array} \\ \text{CH}_2\text{-COOH} \end{array}$
Ácido cítrico	$C_6H_8O_7$	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{HOOC-CH}_2\text{-C-CH}_2\text{-COOH} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$

El AEDT es un compuesto sintético que se ha utilizado frecuentemente en el estudio de la fitoextracción asistida de metales en suelos contaminados, ya que es una de las sustancias con mayor capacidad quelante y es muy efectivo para aumentar la concentración de metales en la parte aérea de las plantas (Nascimento y col., 2006).

En un estudio realizado por Evangelou y col, 2016 se afirma que el uso de quelantes como el AEDT puede acarrear problemas al medio ya que una excesiva solubilización de estos EPTs podría implicar un riesgo de lixiviación a las aguas subterráneas o un potencial riesgo para las plantas y microorganismos de la zona.

Actualmente se han propuesto otros agentes quelantes sustitutos del AEDT con

mayor biodegradabilidad pero de menor poder quelante. Esto, aunque limite su utilización en fitoextracción inducida, puede suponer un beneficio al medio en el que actúa.

1.4. Biosurfactantes

Algunos hongos y bacterias tienen la capacidad de producir y secretar ciertos compuestos naturales con diversos fines. Los Biosurfactantes (BS) son sustancias producidas por estos organismos con propiedades emulsificantes y dispersantes con el objetivo de solubilizar las fuentes de carbono de sustratos insolubles (Supaphol y col.,2011).

1.4.1. Composición y función de los biosurfactantes

Con la contaminación al ambiente por petróleo, a partir de la década de 1970 se comenzaron a sintetizar surfactantes, es decir, compuestos sintéticos con actividad tensoactiva, a fin de remover hidrocarburos y recuperar los ambientes contaminados. Los surfactantes sintéticos (SS) por su composición química pueden ser aniónicos, catiónicos y no iónicos y poseen propiedades emulsificantes, dispersantes, entre otras (Cort y col., 2002). Los SS ayudan a remover los contaminantes del medio, ya que permiten la desorción de contaminantes hidrofóbicos en suelo, agua y otros ambientes. Sin embargo, se ha constatado que los SS son tóxicos para algunos microorganismos, y su efecto también se refleja sobre la baja eficiencia en la biodegradación, hecho que los hace poco recomendables como aditivos para la biorrecuperación de suelos contaminados (Ivshina y col., 1998; Karanth y col., 1999). Debido a la ecotoxicidad que tienen los SS al ambiente, la tendencia se dirige hacia la búsqueda de moléculas tensoactivas, productos biodegradables y tecnologías que sustituyan el uso de SS a fin de disminuir el impacto que éstos tienen sobre el ambiente.

Los BS microbianos mejor estudiados son los glicolípidos (ramnolípidos, trehalolípidos y soforolípidos). Las bacterias del género *Pseudomonas* sp. producen mono y diramnolípidos, moléculas basadas en una o dos unidades de ramnosa respectivamente.

1.4.2 Recuperación mediante biosurfactantes de suelos contaminados por EPTs

La presencia de surfactantes y biosurfactantes favorece la biorrecuperación y se ha considerado el enorme papel que tiene la biodisponibilidad para ello.

Existen numerosos estudios donde se demuestra que la desorción y la movilidad del contaminante hidrófobo en el suelo aumenta con la presencia de surfactantes. Volkering y col (1998) aseguran que, para la selección de un surfactante para la recuperación biológica, los mejores parámetros son la tensión interfacial y la desorción del contaminante.

Aunque actualmente se estudian varios biosurfactantes, la mayoría de esos estudios se elaboran con los ramnolípidos sintetizados con la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, la surfactina (Olivera y col. 2000) los lipopéptidos (Tecon y Van der Meer 2000) y los soforolípidos (Schippers y col. 2000).

Carvajal de la Haza (2016) y Márquez Esteban (2018) demostraron que el uso de ramnolípidos JBR-425 a concentración de 1000 mg RL/kg de suelo aumentaba la extractabilidad de Cu en suelo.

1.5 *Brassica juncea*

1.5.1 Identificación y descripción botánica de la planta

Comúnmente se llama mostaza parda para distinguirla de otras especies como la mostaza blanca o amarilla (*Sinapsis alba*) o la mostaza negra (*Brassica nigra*). En México es probable que se le llame nabo por su parecido a *Brassica rapa*.

Se puede distinguir de otras especies de *Brassica* por tener pétalos de más de 6 mm de largo y solo 2-3 pares de particiones en las hojas basales (diferencias con *Brassica tournefortii*) y por tener los frutos extendidos o apuntados hacia arriba, pero no muy pegados al raquis y de 3 cm o más de largo (diferencia con *Brassica nigra*).

Se puede confundir con otras especies de *Sisymbrium* y con *Diploaxis muralis*.

Descripción técnica (Marzocca 1976)

Hábito y forma de vida: Hierba anual, glabra o algo pubescente, más o menos glauca, erecta, algo ramificada.

Tamaño: De 30 a 130 cm.

Tallo: Cilíndrico y glauco (con una capa de cera), ramificado.

Hojas: Inferiores con pecíolos largos, de 10-25 cm de largo, lirado-pinnatifidas, irregularmente dentadas, con el lóbulo terminal más grande u ovado; lóbulos laterales menores y escasos; hojas superiores con o sin pecíolos, alternas, oblongo-elípticas, lanceoladas o lineares, mucho más pequeñas, con uno o dos lóbulos laterales y pocos dientes; la base atenuada.

Inflorescencia: Racimos de hasta 30 cm.

Flores: Flores amarillas, 1.2 cm o más en diámetro, pedicelos de 7-15 mm.

Frutos y semillas: Pedicelos delgados, 1-1.5 cm de largo, silicuas glabras y cilíndricas, extendidas a erectas, pero no adpresas, de 3-6 cm de largo, con un pico delgado y sin semillas, no mayor de 1/3 del fruto. Semillas globulares, de 1.5-2 mm en diámetro, café oscuro, con dibujo reticulado puntiforme.

Plántulas: Cotiledones con duplicados (Muenscher, 1955).

Raíz: Napiforme.

Características especiales: Huele a mostaza al estrujarse.

1.5.2. Habitat

Se porta como arvense y ruderal.

Distribución por tipo de clima: Se presenta en climas templados, tropicales secos y tropicales húmedos. Tolera altitudes de 500 a 4200 m y temperaturas medias anuales de 6 - 27 ° C, pero los cultivos derivados crecen mejor con una temperatura media mensual entre 15 y 18 ° C (James A. Duke, 1983).

Distribución por tipo de suelos

Se encuentra en suelos con pH de 4.3 a 8.3; cultivos derivados de la especie prefieren suelos ligeramente ácidos (James A. Duke, 1983).

Influencia del ser humano sobre su distribución local o regional

El ser humano dispersa la especie como contaminante de semillas, junto con las variedades cultivadas, que se asilvestran.

1.5.3. Biología y ecología

Propagación, dispersión y germinación: Propagación por semilla.

Ciclo de vida: Planta anual.

Fenología: En Argentina florece en primavera, pero en México se ha observado también en verano. En España su siembra puede realizarse a comienzos de otoño.

1.5.4. Usos de *Brassica juncea* como planta fitoextractora.

Existen trabajos previos realizados donde se pretendía usar *Brassica juncea* para extraer metales del suelo (Carvajal de la Haza, 2016; Márquez Esteban, 2018). En estos estudios se analizó la capacidad extractora de estas plantas con ramnolípido (1000 mg/kg de suelo) y en sustrato contaminado artificialmente con varios niveles concluyendo que existe una reducción severa de producción de biomasa cuando la dosis de Cu está por encima de los 500 mg Cu/kg.

Bernal y col. (2007), en un estudio realizado en Aznalcóllar (Sevilla) sobre un suelo contaminado por un vertido de lodos ácidos con un contenido en cobre de 202 mg/kg, encontraron mayores concentraciones de cobre en hoja con respecto a tallo y raíz. Dichos valores fueron de 37 mg/kg en hoja mientras que en tallo y raíz registraron en torno a 10 mg/kg. Más tarde se añadieron algunos estiércoles de vaca con lo que se aumentó la producción de biomasa, posiblemente por el mayor aporte de nutrientes. Estos autores concluyen en una eficacia del proceso de unos 150 mg/kg de cobre extraído en una producción de biomasa de 3000 kg/ha. Estos datos revelan que sería necesario 48000 ciclos de cultivo consecutivos para la total descontaminación del suelo.

Aunque los datos no arrojan una gran eficacia, el autor recalca en la utilidad de *Brassica juncea* como detector de cambios en la biodisponibilidad de Cu, Pb y Zn en el suelo.

1.6. Ensayos de germinación

Agronómicamente se considera que una semilla ha germinado cuando a partir de ella se origina una planta adulta capaz de alcanzar la fase reproductora. Esto quiere decir que la planta es capaz de desarrollarse hasta producir nuevas semillas viables. La International Seed Testing Association (ISTA), asociación internacional de entidades relacionadas con el análisis de semillas considera que la germinación de las semillas es un proceso en el que hay una activación del estado metabólico manifestado por la división celular y la diferenciación de las distintas partes de las plantas (ISTA, 2003). El primer paso que da la semilla es la emergencia de la radícula (Rodríguez-Quillón y Adam, 2008).

Este autor sostiene que estos ensayos tienen como objetivo asegurar que la germinación, nascencia y evolución de la plántula sean correctas. Estos test de germinación, realizados en laboratorio, son una información útil sobre el estado de las semillas, sin embargo, estos resultados pueden variar de los resultados obtenidos en campo.

El test de germinación estándar recoge el porcentaje de plántulas normales obtenido tras un análisis de las semillas germinadas. Es una prueba que informa sobre las semillas que más rápidamente han reanudado la actividad metabólica y el crecimiento propios de la germinación (Peretti, 1994). Consiste básicamente en colocar las semillas sobre un sustrato adecuado, humedecerlas y controlar las condiciones de incubación durante un cierto periodo de tiempo, durante el cual se realizan conteos de germinación, observando el número de semillas que han germinado.

Una práctica muy habitual consiste en colocar las semillas en un recipiente con buena absorción de agua como papel de filtro, arena o sustratos gelificados. Al cabo de unos días se realiza un recuento y medición de las radículas de las plantas y se descartan aquellas que sean inferior a 3 mm.

Para controlar las condiciones de temperatura, humedad e iluminación, estas cajas de germinación se introducen en germinadores termostatizados permitiendo regular estos parámetros atendiendo a las exigencias de cada especie. La temperatura más habitual suele estar comprendida entre los 10-35°C sin que se produzcan variaciones de más de 10 °C.

La ISTA recoge en sus archivos una serie de recomendaciones a seguir para

el correcto desarrollo del experimento dependiendo de la especie a elegir como pueden ser: temperatura, sustrato, humedad, días de conteo...

Para la representación de los datos obtenidos, Zucconi, (1981) propuso una fórmula para el cálculo del Índice de Germinación (IG). Este método ha sido el adoptado oficialmente para detectar toxicidad en sustratos y evaluar los efectos tóxicos que estos puedan tener.

1.7. Huertos Urbanos

Desde finales de los 90 y sobre todo en los 2000, se ha ido extendiendo por ciudades de todo el mundo la creación de huertos urbanos para satisfacer las necesidades de sus habitantes. Algunas veces estos huertos se instalan en terrenos poco deseados para cualquier otra actividad ya sea porque son espacios no edificables o contaminados por acción humana.

Existen iniciativas por parte de algunos ayuntamientos para fomentar estos espacios; Por ejemplo, en Zaragoza existe el programa “Esto no es un solar” con la finalidad de dar utilidad a espacios del casco histórico desaprovechados y descuidados.

López Nuñez (2019) estudió la contaminación de algunos suelos de parques y huertos urbanos de la provincia de Sevilla, tres en ciudades pequeñas y uno en la capital obteniéndose resultados de contaminación más altos en la capital que en los otros municipios. Este parque con mayor contaminación tuvo mayores concentraciones de cobre y plomo debido principalmente al uso de fitosanitarios y vertido de productos procedentes de derribos de edificios con pinturas.

En parques con contaminación de suelos se deben tener una serie de precauciones por el peligro de bioacumulación de metales tanto para la fauna local como humanos. Por ello se ve recomendable desarrollar medidas que biorrecuperación en estos suelos.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo consiste en la recuperación de suelos urbanos contaminados por Elementos Potencialmente Tóxicos (EPTs) mediante la técnica de la fitorrecuperación asistida llevada a cabo por plantas de *Brassica juncea* y estudiar el efecto que tiene la aplicación de Ramnolípido (JBR-425) en dichos suelos.

Los objetivos específicos que se desarrollan son los siguientes:

1. Estudiar el desarrollo de plantas de *Brassica juncea* en invernadero con suelos contaminados con distintas concentraciones de EPTs y presencia o no de ramnolípido: seguimiento de la evolución del número de hojas, altura de planta, floración y fructificación.
2. Evaluar la producción de biomasa y calcular la tasa de crecimiento relativo, tanto en la parte aérea como radicular.
3. Determinar la cantidad de Cobre, Plomo y Zinc extraído por las plantas de *Brassica juncea*
4. Determinar el Cobre, Plomo y Zinc biodisponible mediante extracción con EDTA y posterior medición por ICP del suelo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Material vegetal

Se usan para el estudio semillas y plantas de mostaza parda (*Brassica juncea*). Esta planta se considera que posee un poder acumulador de diversos elementos potencialmente tóxicos (EPTs), entre ellos el Cobre, el Zinc y el Plomo. Es una planta muy utilizada en ensayos de fitoextracción, aunque presenta un limitado ritmo de crecimiento y producción de biomasa.

Las semillas utilizadas de *Brassica juncea* proceden de la casa Intersemillas, productora ES-17-46/1319, variedad SCALA, nº lote 3316202-1, análisis: diciembre 2014.

Las semillas utilizadas de *Lactuca sativa* proceden de la casa Battle referencia 03040-01, fabricante 013701BOLS, variedad larga verde claro, análisis septiembre 2018.

3.1.2 Suelo

Se utilizan tres tipos de suelo:

- Suelo 1 (S1) de la parcela 152 del parque de Miraflores, de Sevilla situada en la zona de parcelas agrícolas, cuyas coordenadas geográficas son (37°24´N 5°57´W).
- Suelo 2 (S2) de la parcela 242 del parque de Miraflores, de Sevilla situada en la zona de parcelas agrícolas, cuyas coordenadas geográficas son (37°41´N 5°96´W).
- Suelo 3 (S3) de una parcela agrícola del término municipal de Lebrija, se utiliza como control.
- En la tabla 3 se presentan los parámetros fisicoquímicos de los suelos, caracterizados en el laboratorio de análisis del IRNAS (CSIC).

Tabla 4: Caracterización del suelo utilizado.

Suelo	Textura	pH (extracto acuoso 1:2,5)	CO ₃ Ca (%)	M.O. (%)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)
S1	Franco-arcillo arenoso	7,35	14,00	6,04	52,3	25	22,5
S2	Franco-arcillo arenoso	7,75	16,16	8,00	52,3	25	22,5
S3	arcilloso	7,60	19,00	1,10	1,6	28,3	70,1

3.1.3 Ramnolípido JBR-425

Los ramnolípidos son tensioactivos aniónicos sintetizados y excretados por la bacteria *Pseudomonas Aeruginosa*. El ramnolípido JBR-425 es una mezcla equimolar de mono- y di-ramnolípido, con una concentración global del 25%, suministrado por la empresa Jeneil Biosurfactants Inc. (Estados Unidos).

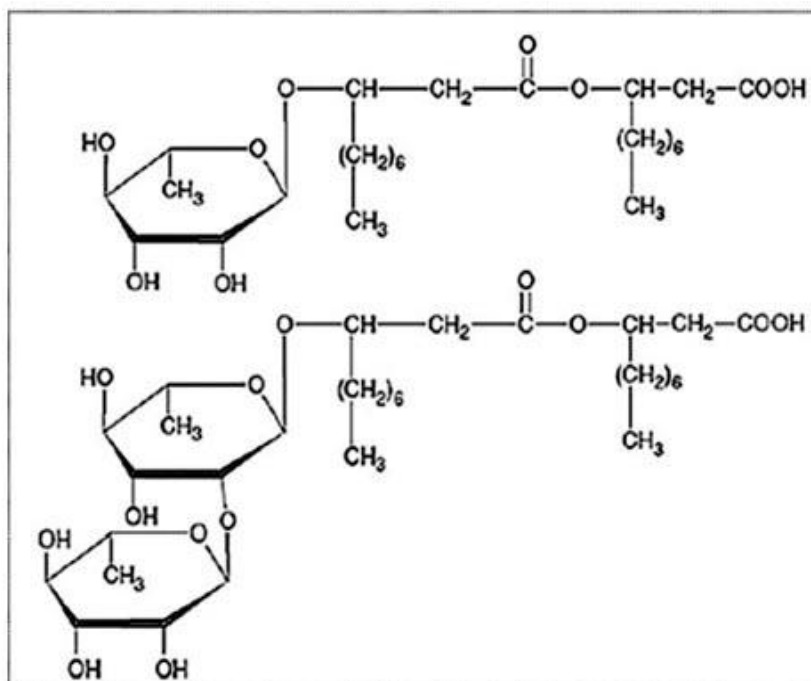


Figura 1: Representación molecular de mono-ramnolípidos (parte superior) y di-ramnolípidos (parte inferior) producidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Fuente: (Lovaglio y col., 2011).

3.1.4 Placas petri

Con medidas de 9 cm de diámetro y 1,5 cm de altura, disponibles en el departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la ETSIA.

3.1.5 Macetas

Las macetas utilizadas tienen unas medidas de 7x7x10 cm³, con una capacidad de 500 g de suelo/maceta. Fueron suministradas por el servicio de invernaderos del CITIUS (Universidad de Sevilla).



Figura 2: Macetas utilizadas para el ensayo en invernadero.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Medidas previas de pH y conductividad

Se realiza la medida del **pH en disolución acuosa en proporción suelo:agua (1:2,5)** de los suelos, que fueron utilizados para el ensayo de germinación en placa y en macetas:

1. Se colocan 10 g de tierra seca al aire y tamizada por 2 mm en un vaso de 100 ml, añadiendo 25 ml de agua destilada.
2. Se agita con varilla de vidrio de forma manual durante treinta minutos, con periodos de reposo.

3. Se deja reposar treinta minutos hasta que la tierra se deposita en el fondo y se introduce seguidamente el bulbo del electrodo del pH-metro, marca Crison, en la disolución sobrenadante, dejando transcurrir aproximadamente un minuto para tomar el resultado o hasta que se estabilice la lectura.



Figura 3: Suspensiones suelo:agua (1:2,5) para la medida de pH en disolución acuosa.

- Se mide la **conductividad eléctrica (1:5)** de estos suelos.

1. A las suspensiones suelo:agua para las medidas de pH se les añade 25 ml de agua destilada, en total quedan 50ml de agua, resultando una proporción suelo:agua (1:5)

2. Se deja reposar 24 horas, se filtró con papel de filtro Whatman 42 y se determina la conductividad eléctrica de la disolución en el conductímetro marca Crison. (Métodos oficiales de análisis. Tomo 3. Ed Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid 1986).

3.2.2 Experimentos de germinación en placa

Se hizo un **primer ensayo** previo de germinación en placas Petri (9 cm de diámetro y 1,5 cm de altura) para comprobar el porcentaje de germinación de las semillas de *Brassica juncea* y *Lactuca sativa*. Para ello se pusieron 20 semillas de cada especie en una placa con papel humedecido con agua destilada y se mantuvieron durante 5 días en cámara de germinación a 20°C, tiempo después del cual, se hace recuento de las semillas germinadas (longitud superior a 0,3 cm) para tener un primer resultado de la viabilidad de las semillas que se usarán en los próximos ensayos.

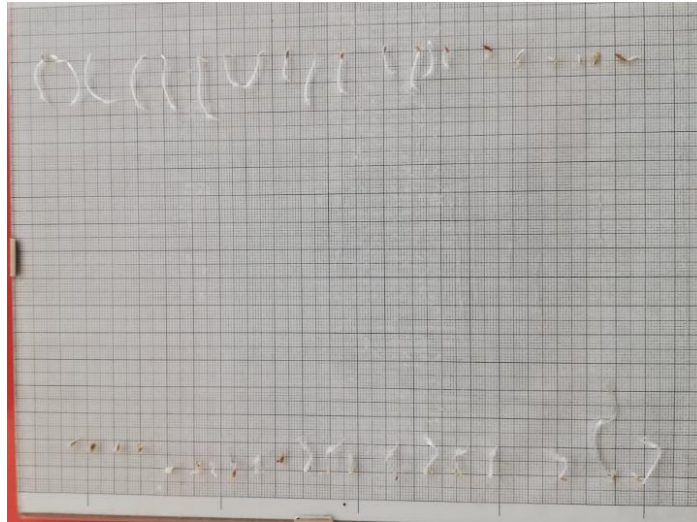


Figura 4: Medida de longitud radicular de semillas germinadas en papel (primer ensayo).

Se hizo un **segundo ensayo** previo de germinación en placas Petri (9 cm de diámetro y 1,5 cm de altura) utilizando arena lavada (Control) y dos suelos objeto del estudio en este trabajo. En este segundo ensayo se hacen cinco réplicas en las que en cada una de ellas se añaden 25 gramos de sustrato tamizado a 10 mm, con los siguientes sustratos: arena (Control), suelo S1 y suelo S2 y se ponen 10 semillas por placa anotando como en el caso anterior las semillas germinadas en cada placa y sus longitudes radiculares (longitud superior a 0,3 cm), para calcular el índice de germinación en cada tratamiento, mediante el método de Zucconi. (Zucconi, y col.,1981).

La fórmula que se emplea es la siguiente:

$$\text{Índice de germinación (IG)} = (G/G_0) \times (L/L_0) \times 100$$

Siendo: G: Semillas germinadas sobre el sustrato estudiado.

G₀: Semillas germinadas en el control.

L: Longitud total de raíces en el sustrato estudiado.

L₀: Longitud total de raíces en el control.

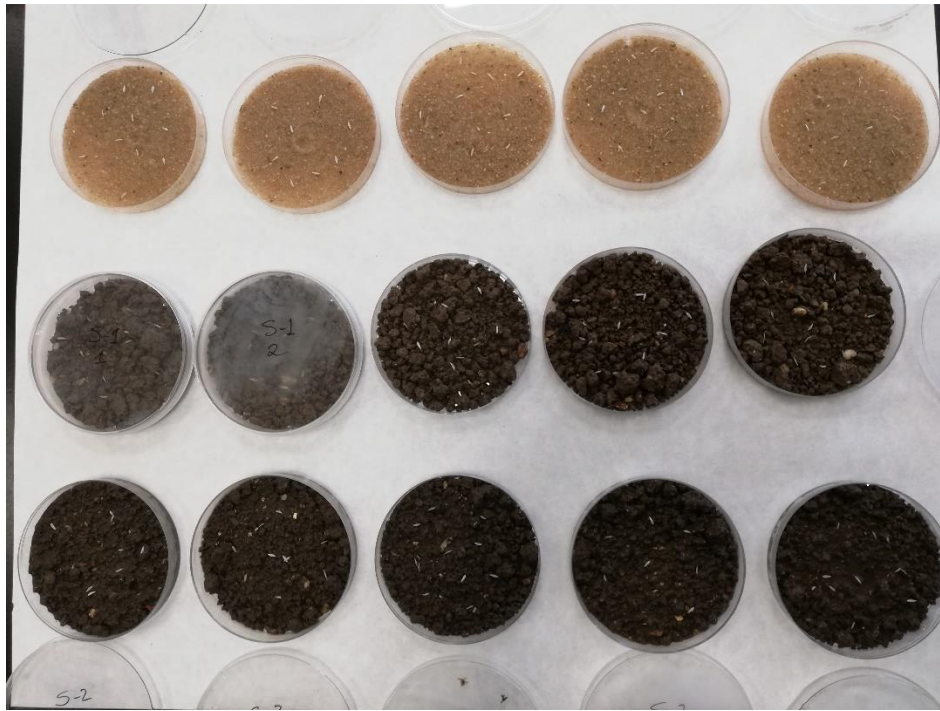


Figura 5: Segundo ensayo de germinación en placa con los sustratos: arena, suelo S1 y suelo S2.

3.2.3 Ensayo en invernadero

3.2.3.1 Descripción del invernadero

El ensayo se realiza en el módulo 8 del invernadero situado en la quinta planta del CITIUS, edificio Celestino Mutis, situado en la avenida Reina Mercedes s/n en Sevilla. Se trata de un invernadero de unos 60 m² de superficie. Dispone de sistema de control medioambiental automatizado, incluyendo calefacción, refrigeración, ventilación, sombreado e iluminación artificial. El módulo está ocupado por 12 mesas rodantes para aprovechar mejor la superficie de cultivo. La superficie de la mesa es de 4 m². Cada módulo de invernaderos está controlado por un controlador lógico programable independiente situado en el interior de cada uno de los módulos, con una batería de interruptores que permiten el apagado o el encendido manual o automático de los parámetros a controlar (sombreado, temperatura fría y calor, ventilación e iluminación de las mesas). A su vez todos los datos son integrados en un PC desde el cual es posible modificar las condiciones deseadas mediante un software diseñado específicamente para este cometido. El control de la temperatura se realiza mediante máquinas de refrigeración/calefacciones independientes para cada módulo y dispuestas en pares, para asegurar el mantenimiento de las condiciones climáticas incluso en caso de avería de una de las máquinas.

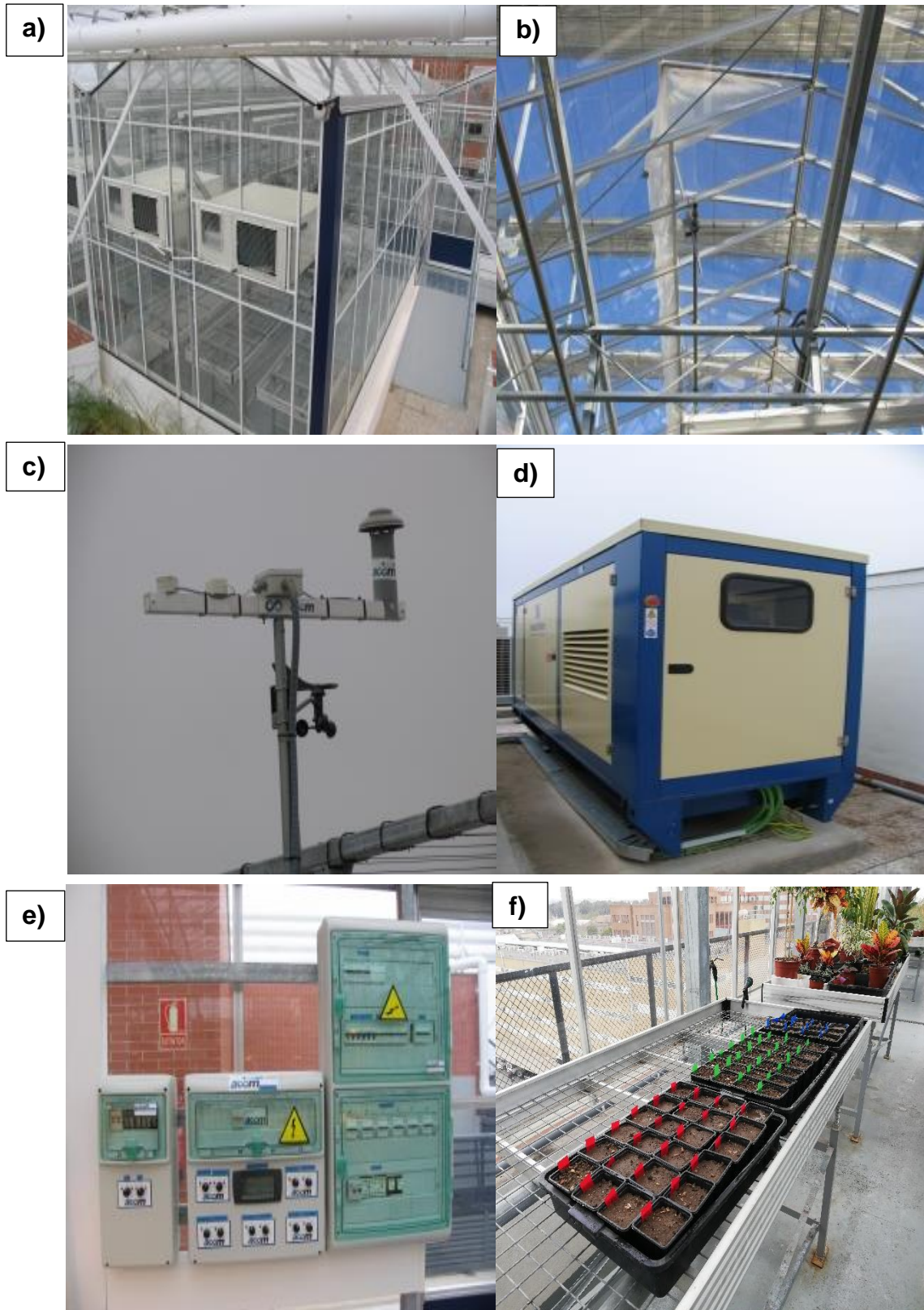


Figura 6: Infraestructuras del invernadero (CITIUS, 2018): a) sistema de refrigeración, b) sistema de sombreado, c) estación de parámetros meteorológicos, d) grupo electrógeno, e) controlador lógico, f) mesa rodante.

La iluminación es independiente para cada mesa y en cada módulo y se realiza mediante lámparas de alta presión de sodio, que dan una luz óptima para el _____

crecimiento de los vegetales si bien en este ensayo no se aplica luz artificial a las plantas. La ventilación se realiza mediante un par de ventanas cenitales de apertura controlada y modificable mediante sensor de temperatura que constan de una malla anti-insectos para evitar polinizaciones no deseadas. El sombreado se realiza mediante una malla exterior y es común para todos los módulos. Igualmente es modificable según los valores de luminosidad requeridos. Todos los parámetros meteorológicos son recogidos de manera independiente por una estación situada en la parte superior de los invernaderos y que suministra datos de temperatura, humedad y luminosidad de manera continua a un controlador lógico. Los invernaderos cuentan con un grupo electrógeno propio y exclusivo que garantiza la corriente eléctrica en caso de corte de suministro. (CITIUS., 2018).

En las siguientes Figuras (Figuras 7, 8 y 9) se muestran la evolución de la temperatura, humedad y radiación, en el interior del invernadero, durante el período que duró el ensayo:

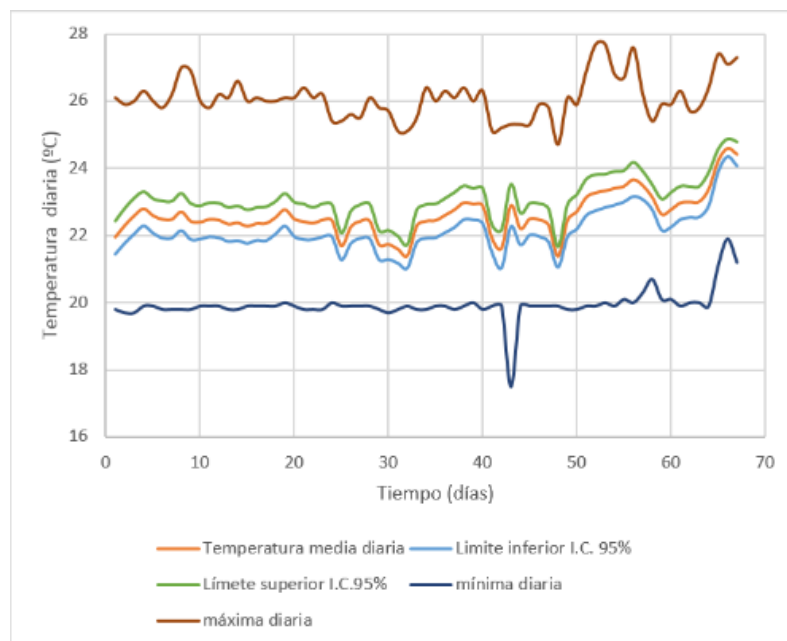


Figura 7: Temperaturas diarias media, máxima y mínima.

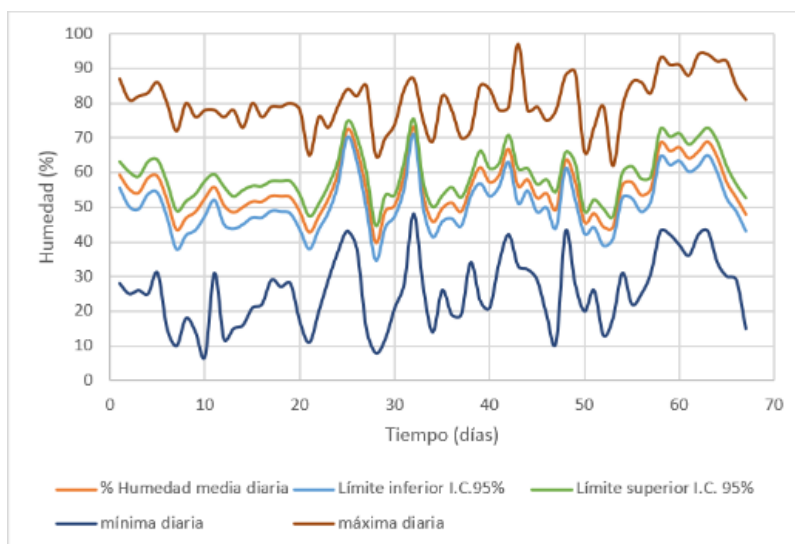


Figura 8: Humedad diaria media, máxima y mínima.

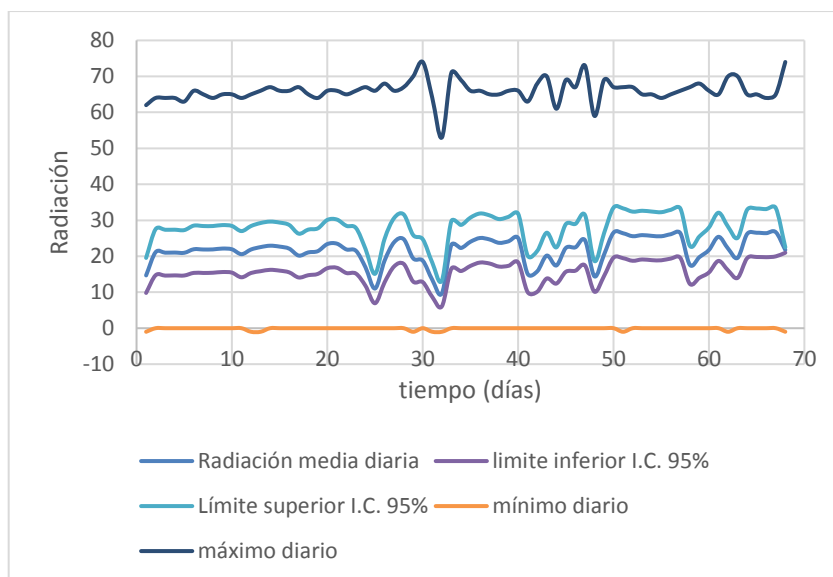


Figura 9: Radiación diaria media, máxima y mínima.

3.2.3.2 Diseño del ensayo en invernadero

Se utilizan las macetas descritas en el apartado 3.1.5 de este trabajo, las cuales tienen una capacidad de 500 g del suelo objeto de este estudio. La distribución que se hace es la siguiente:

Previamente se disponen las macetas en 3 bandejas donde crecerán hasta tener al menos 5 hojas verdaderas. Luego se distribuyen al azar por toda la mesa de cultivo y se les coloca un plato de plástico para recoger toda el agua de riego y no haya perdidas.

Tabla 5: Tratamientos para ensayo en invernadero

	Suelos		
	Miraflores Alto	Miraflores Bajo	Lebrija (Control)
Control ORL	Suelo 1 + ORL	Suelo 2 + ORL	Suelo 3 + ORL
Tratamiento RL	Suelo 1 + RL	Suelo 2 + RL	Suelo 3 + RL

Las macetas distribuidas en tres bloques al azar quedan de la siguiente manera en la mesa de trabajo (Tabla 6 y Figura 10):

Tabla 6: Distribución de repeticiones del ensayo en invernadero.

Bloque I

V5	R24	R3 RL	V8 RL	A1	V1 RL
V16	A18	V20 RL	V2	A16 RL	R12
A6 RL	V21 RL	A10 RL	A11	R8 RL	R14
A22 RL	R5 RL	R22 RL	R9	A7	V10

Bloque II

A19	R4 RL	R21 RL	V7	V19	A24
V17 RL	R7	A5 RL	R16	V6	A12 RL
A20 RL	R18	A15	R2 RL	V22	R1
V24 RL	A8	R23 RL	V14 RL	A14 RL	V3 RL

Bloque III

R10	V4	V12 RL	A3	R6	R20 RL
A17 RL	R15 RL	R17 RL	V11	A2	A13 RL
R13	A4	V9 RL	R19 RL	A9 RL	V23
R11	V13 RL	V15 RL	A23 RL	V18	A21



Figura 10: Distribución al azar de los tratamientos en la mesa de trabajo.

3.2.3.3 Manejo del suelo

Una vez medidas las macetas ($7 \times 7 \times 10 \text{ cm}^3$), resultando un volumen total de 490 cm^3 y calculado la densidad del suelo, resultando una densidad de 1.008 kg/dm^3 , se decide que la cantidad de suelo que irá en cada maceta sea de aproximadamente 460 g.

El suelo se deja secar repartido en bandejas en una estufa a 40°C durante dos semanas, más tarde se procede a tamizar todo el suelo con un tamiz de luz de malla de 10 mm, con el cual se separan los elementos más gruesos procedentes del vertido de residuos (escombros).

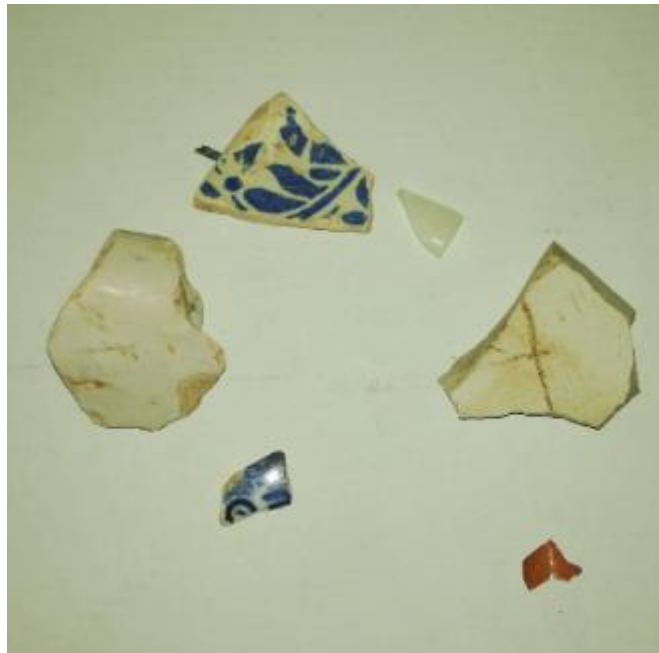


Figura 11: Ejemplo de elementos gruesos retirados en el tamizado.

Una vez seco y tamizado se reparte en las macetas y se procede a calcular la cantidad de agua necesaria para llevar los 460 g de suelo a capacidad de campo, observando por la parte inferior de la maceta cuando quedaba humedecida al ir añadiendo agua, con el objeto de que al regar no haya lixiviación y posible lavado de los tratamientos que se van a aplicar, observando que la maceta quedaba a capacidad de campo con una cantidad de 205 ml de agua, a partir de esta cantidad empezaba a lixiviar. Para mantener el suelo en condiciones óptimas para el desarrollo de las plantas debemos mantenerlo como mínimo a un 60% de su capacidad de campo, y por tanto el peso total de la maceta más el suelo húmedo deberá ser de: $8,2 \text{ g (maceta vacía)} + 460 \text{ g (suelo seco)} + 123 \text{ g (agua)} \times 0,6 = 591,2 \text{ g}$. A continuación, se disponen las macetas en tres cajones (cada uno de los tres suelos) y se procede a su siembra.

3.2.3.4 Siembra

Una vez estudiados los índices de germinación en placa que tenían las semillas con los diferentes tratamientos que se aplican en este estudio, se decide poner aproximadamente 15 semillas, para poder obtener un número de plantas suficiente para los posteriores análisis que se van a realizar; dejándolas caer en la parte superior del suelo, intentando que queden uniformemente repartidas por toda la superficie.

Previamente (en ensayos de germinación en placa) se había comprobado que las semillas tenían un mayor índice de germinación cuando no se introducían en el suelo contaminado, motivo por el cual, se decide plantar de esta forma.



Figura 12: Disposición de las macetas en cajones.

3.2.3.5 Aplicación del tratamiento

Cuando las plantas llegaron a tener 5 hojas verdaderas (día 21 desde siembra) se aplicó el tratamiento, de esa manera los suelos que llevaron ramnolípido quedaron humedecidos con la dosis oportuna de este biosurfactante más agua, y los suelos que no lo llevaron fueron humedecidos sólo con agua, con el objetivo de que quedaran todos uniformemente humedecidos. Luego se distribuyeron las macetas de forma aleatoria (Tabla 6) con platos de plástico para recoger el lixiviado y que no se perdiera.

El riego de los suelos durante el desarrollo de las plantas se hace con una regadera con agua procedente de la red de Emasesa y con una periodicidad de tres veces por semana, ya que se comprueba, que debido a las condiciones de ventilación y temperatura del invernadero, el suelo quedaba por debajo del 60 % de su capacidad de campo pasadas 72-96 horas desde su humectación.

Una vez terminado el experimento y retirado el material vegetal se unificaron los suelos por repetición y tratamiento y se guardaron en bolsas de plástico, para

posteriores análisis.



Figura 13: Macetas distribuidas aleatoriamente.

3.2.3.6 Aclareo de las plantas y recogida del material vegetal

Veintiún días después de la plantación la mayoría de las plantas se encontraban en estadio de 5 hojas verdaderas, y se hace una primera recogida de material vegetal (aclareo), dejando una planta por maceta, y pudiendo realizar con esta primera recolección un estudio estadístico del número de plantas germinadas por tratamiento y de biomasa.



Figura 14: Plántulas con cinco hojas verdaderas, obtenidas en el aclareo.

Dos meses después de la plantación las plantas se encuentran en estadio de madurez y han producido semillas, por lo que se decide realizar la recolección, anotando como en el caso anterior los datos de peso fresco y peso seco de la parte aérea y de las raíces por separado, producidas en los diferentes tratamientos y repeticiones, para poder hacer el estudio de la biomasa en este último momento.

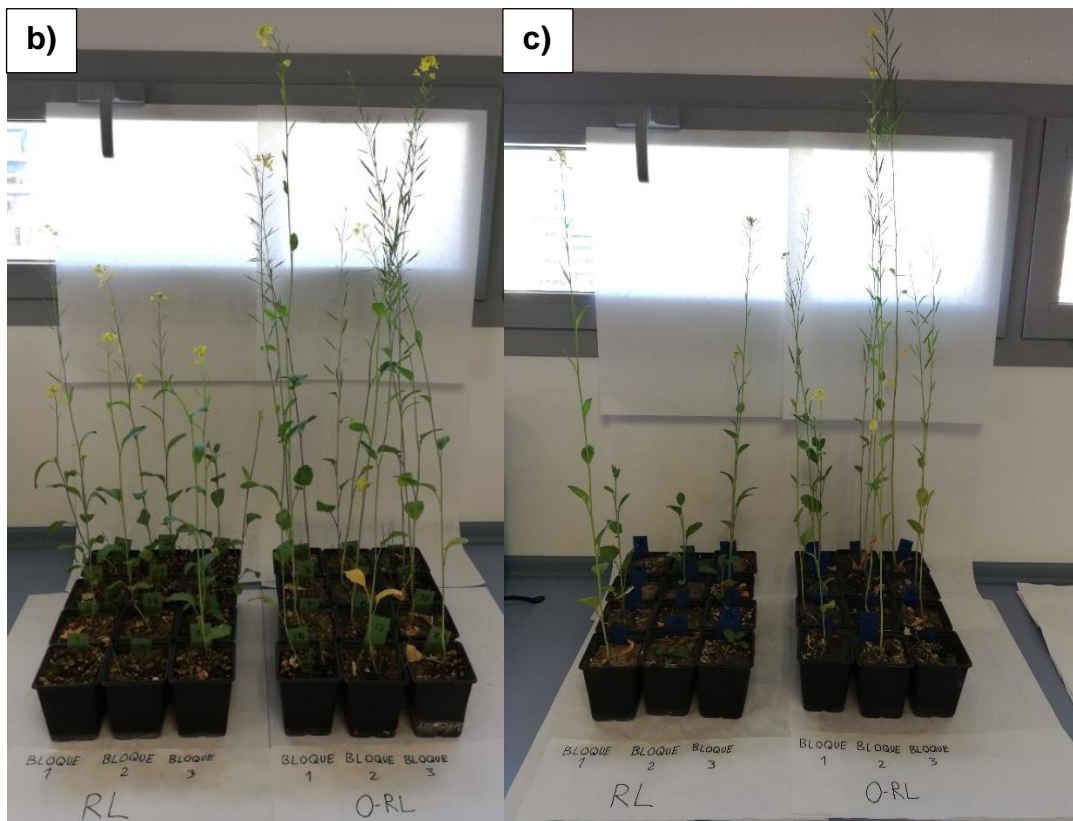


Figura 15: Plantas ordenadas por tratamiento y repetición. a) Suelo 1, b) Suelo 2, c) Suelo 3(Control).

3.2.3.6 Estudio del crecimiento (biomasa)

Una vez realizada la recolección, las plantas se separan por raíz y parte aérea y se pesan, obteniendo el peso fresco. Luego, las plantas se secan dentro de sobres durante 48 horas a 60°C hasta peso constante obteniéndose el peso seco.

Las plantas que fueron cosechadas cuando tenían 5 hojas verdaderas permitieron obtener una estimación de la biomasa seca inicial, para ello se aprovechó las plantas obtenidas durante el aclareo. La biomasa seca final se obtiene como suma de la parte aérea y radicular. Con estos datos se calcula la tasa de crecimiento relativo (TCR) en este periodo.

$$TCR = (\ln BS_f - \ln BS_i) D^{-1} \text{ (g g}^{-1}\text{día}^{-1}\text{)}$$

Dónde:

BS_f: Biomasa seca final

BS_i: Biomasa seca inicial

D: Número de días del experimento

3.2.4 Extracción de metales disponibles con AEDT en los suelos

Una vez terminados los ensayos de germinación en placa y el ensayo de invernadero, se extraen los metales disponibles en estos suelos con ácido etilendiaminotetraacético (AEDT).

Esta metodología aplicada para el estudio de la contaminación de los suelos se basa en la utilización de una solución que contiene este agente quelante.

A pesar de los inconvenientes que pueden plantear este tipo de agentes, como la disolución parcial de ciertos componentes del suelo (carbonatos, hidróxidos), la utilización de agentes quelantes ha constituido uno de los mayores avances en el análisis de micronutrientes del suelo (Sims y Johnson, 1991).

Estos agentes quelantes reducen la actividad de los iones metálicos libres en la solución del suelo mediante la formación de complejos solubles metal-quelato. Como respuesta a esta quelatación, se produce un nuevo suministro de iones libres a la solución del suelo, desde la fase sólida. La cantidad de micronutrientes (metales en general) extractada por el agente quelante refleja así, tanto la concentración inicial en la solución del suelo como la capacidad del suelo para mantener esa concentración. De esta forma, los agentes quelantes simulan la toma de nutrientes por las raíces

vegetales y su restitución posterior desde las fases sólidas del suelo.

Protocolo experimental:

Se pesan 2,5 g de suelo en tubos de centrifuga añadiéndose 25 ml de AEDT 0,05 M ajustado a pH 7,0 con amoníaco (Ure y col., 1993). En cada tanda de análisis se incluye un blanco únicamente con AEDT. Se agita durante una hora a 20°C, se centrifuga a 7000 rpm durante 10 minutos, y se filtra el sobrenadante con papel Whatman 42 y se recoge en botes de plástico. El contenido de metales se determina posteriormente por ICP-OES.

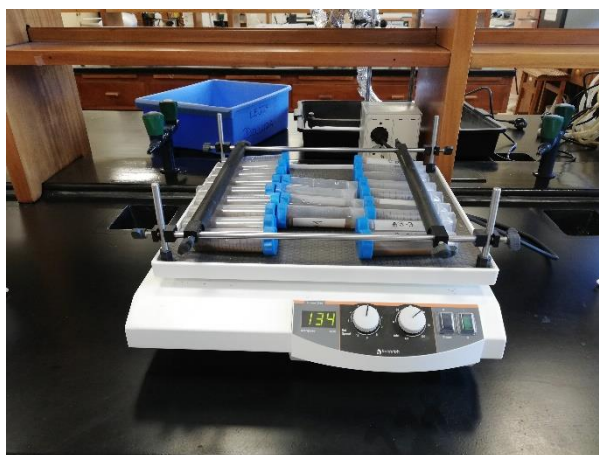


Figura 16: Agitado de la disolución de AEDT.

3.2.6 Determinación de metales disponibles en suelo por ICP-OES.

Se realiza la determinación de metales pesados por ICP-OES en las muestras de suelo procedentes de los distintos tratamientos. Para ello se tomaron las muestras previamente preparadas y se mandaron a analizar.

Para proceder a la medida en ICP de la muestra, es necesaria la preparación de la misma mediante una digestión ácida. Para ello se toma un peso conocido y se digiere con ayuda de agua regia, enrasando finalmente a un volumen concreto. Los resultados se expresan en mg l^{-1} , ya que se mide sobre la digestión realizada a la muestra. Para conocer los mg kg^{-1} de cada elemento analizado en la muestra inicial, sólo habrá que multiplicar los mg l^{-1} indicados por el volumen de enrase en ml y dividir entre el peso de la muestra en gramos. La digestión ácida y la determinación analítica de los elementos a analizar en las muestras por ICP-OES se han realizado en el Servicio de Análisis del IRNAS (CSIC).

En esta técnica, la introducción continua de la muestra líquida y un sistema de nebulización forma un aerosol que es transportado por el Argon a la antorcha del plasma, acoplado inductivamente por radio frecuencia. En el plasma, debido las altas temperaturas generadas, los analitos son atomizados e ionizados generándose los espectros de emisión atómicos de líneas características. Los espectros son dispersados por la red de difracción y el detector sensible a la luz se encarga de medir las intensidades de las líneas. La información es procesada por el sistema informático.

3.2.7. Determinación de metales totales en suelo por fluorescencia de rayos X

Para el estudio se hace uso de un analizador Niton XL3t 950s GOLDD + XRF (Thermo Scientific Inc.) con un soporte de laboratorio blindado que permite usar el instrumento de manera segura y sin necesidad de disponer de autorización para instalaciones radiactivas. El analizador está constituido con un tubo de rayos-X con un ánodo de Ag operado a 50 KeV, 200 μ A y 2 W, y con un gran detector de deriva de Si geoméricamente optimizado (GOLDD). Es posible la detección de elementos tales como: Ba, Sb, Sn, Cd, Ag, Mo, Zr, Sr, U, Rb, Th, Pb, Se, As, Tl, Hg, Zn, Cu, Ni, Co, Fe, Mn, Cr, V, Ti, Sc, Ca, K, Cl, S, P.

Las muestras se midieron llenando una cápsula para XRF (Premier Lab Supply modelo SC-4331, 26 mm de diámetro interno, 24 mm de altura) tapada con una fina película de propileno de 4 μ m (Premier Lab Supply modelo 240-255, 63 mm de diámetro). Dicha cápsula se coloca sobre la ventana de medición del soporte de laboratorio y se escanea por triplicado cada muestra, obteniendo así un valor medio.

3.2.8. Determinación de metales extraídos por la planta medidos por ICP-OES

En este ensayo utilizamos las muestras vegetales obtenidas en el ensayo en invernadero, las cuales previamente separamos en parte aérea y radicular. Para proceder a la medida en ICP de la muestra, es necesaria la preparación de la misma mediante una digestión ácida. Para ello se toma un peso conocido y se digiere con ayuda de ácido nítrico, enrasando finalmente a un volumen concreto. Los resultados se expresan en mg l^{-1} , ya que se mide sobre la digestión realizada a la muestra. Para conocer los mg kg^{-1} de cada elemento analizado en la muestra inicial, sólo habrá que multiplicar los mg l^{-1} indicados por el volumen de enrase en ml y dividir entre el peso

de la muestra en gramos. La digestión ácida y la determinación analítica de los elementos a analizar en las muestras por ICP-OES se han realizado en el Servicio de Análisis del IRNAS (CSIC).

3.2.9. Análisis estadístico

Se realizó el Análisis de la Varianza según el Modelo Lineal General (MLG) de uno o dos vías, o de medidas repetidas, según los casos. Para contrastar la homogeneidad de la varianza se aplicó el test de Levene.

Cuando las varianzas resultaron homogéneas se aplicó el test de Student ($P < 0,05$) en el caso de comparar dos categorías, o el test de Duncan para más de dos categorías.

Cuando las varianzas no eran homogéneas se aplicó el test de Mann-Whitney en el caso de comparar dos categorías, o el test de Kruskal-Wallis en el caso de tres o más categorías.

Se ha utilizado el programa estadístico SPSS Amos versión 25 para Windows

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Conductividad eléctrica y pH de los suelos.

Se realiza una medición del pH y conductividad eléctrica en muestras de suelos originales (Tabla 7) a los que también se les realiza la extracción con EDTA con la finalidad de compararlos tras el ensayo en maceta en el invernadero.

Tabla 7: Conductividad Eléctrica en extracto (1:5), pH en extracto acuoso (1:2,5), pH de los extractos con EDTA 0,5M (tamponado a pH7) (1:10) en los suelos originales.

	CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	pH (Suelo:Agua 1:2,5)	pH (Suelo:Extracto EDTA 1:10)
Suelo 1	324	8,84	7,73
Suelo 2	322	8,20	7,70
Suelo 3	343	8,20	7,72

En la Tabla 8, en el ANOVA de 2 vías basado en la mediana podemos apreciar cómo la aplicación del ramnolípido no influye en la conductividad eléctrica mientras que el factor suelo influye en este parámetro. En el ANOVA de 1 vía podemos ver como el efecto de los tratamientos combinados (Suelo x Ramnolípido) es significativo (Test de kruskal-Wallis, $p=0,049$), sin embargo, no se aprecia interacción ya que el ramnolípido no afecta a la conductividad eléctrica en ninguno de los tres suelos.

En el ANOVA de 2 vías podemos ver como los factores suelo y ramnolípido influyen en los valores de pH en agua, aunque luego no haya interacción significativa entre estos ($p=0,06$). En el ANOVA de 1 vía estudiado para la interacción Suelo x Ramnolípido, vemos que hay un efecto significativo de los tratamientos combinados ($p<0,05$). Tanto el Suelo 1 como el Suelo 3 no sufren cambios significativos con la aplicación de ramnolípido, sin embargo, en el caso del suelo 2 se produce una ligera variación en este parámetro.

Tabla 8: Conductividad Eléctrica media en extracto (1:5), pH medio en extracto acuoso (1:2,5), pH medio de los extractos con EDTA 0,5M (tamponado a pH7) (1:10). Valores medios y D.E. de tres replicados para cada suelo y tratamiento (N=3) tras el experimento en invernadero. Análisis de la Varianza según el Modelo Lineal General (MLG).

Factor Suelo	Factor RL	C.E. ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		pH en agua (1:2,5)		pH extracto EDTA	
		media	D.S.	media	D.S.	media	D.S.
Suelo 1	0 RL	372 a	7	8,43 c	0,07	7,69 ab	0,03
	RL	395 ab	33	8,48 c	0,02	7,65 ab	0,04
	Total (N=6)	383 A	24	8,45 B	0,05	7,67 A	0,04
Suelo 2	0 RL	496 c	18	8,13 a	0,04	7,58 a	0,04
	RL	440 abc	46	8,30 b	0,04	7,63 ab	0,11
	Total (N=6)	468 B	44	8,22 A	0,10	7,61 A	0,08
Suelo 3 (control)	0 RL	488 bc	33	8,44 c	0,05	7,82 b	0,06
	RL	474 bc	105	8,49 c	0,04	8,05 b	0,21
	Total (N=6)	481 B	70	8,47 B	0,05	7,94 B	0,19
	0 RL (N=9)	452	63	8,33 A	0,16	7,70	0,11
	RL (N=9)	436	69	8,42 B	0,10	7,78	0,24
	Total (N=18)	444	65	8,38	0,14	7,74	0,19
p-valor test de Levene (*)	en la media	0,018		0,320		0,029	
Basado :	en la mediana		0,441				0,356
ANOVA de 2 vías:							
	Efecto del factor Suelo	0,013	0,011(**)	0,000		0,000	0,002(**)
	Efecto del factor RL	0,520	0,453(**)	0,001		0,145	0,791(**)
	Interacción Suelo x RL	0,435		0,060		0,115	
Anova de 1 vía:							
	Factor (Suelo x RL)		0,049(**)	0,000			0,020(**)

(*) $p > 0,05$: se acepta homogeneidad de varianzas según test de Levene para el Modelo Lineal General : Suelo + RL + (Suelo x RL)

(**) test de Kruskal-Wallis para muestras independientes o test de Mann-Whitney para muestras independientes.

En una misma columna, letras mayúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre niveles de un mismo factor según el test post-hoc de Duncan. Letras minúsculas en una mismas columna indican diferencias de medias significativas entre niveles de tratamientos combinados (Suelo x RL).

En general, estos datos revelan que los tres suelos no presentaron problemas de salinidad y que la aplicación de ramnolípido no produjo diferencias significativas. Los datos también reflejan que el suelo 1 no tuvo menor pH que los suelos 2 y 3, y por tanto no deberían de producirse efectos de movilización de EPTs que puedan deberse a pH en el suelo 1 más contaminado.

4.2 Concentración total de metales por fluorescencia de rayos X.

Se realizó una medición de los metales totales de los suelos originales con el objetivo de comparar éstos.

Tabla 9: Concentraciones de metales medidos por fluorescencia de rayos X.

	Cu (ppm)	Zn (ppm)	Pb (ppm)	Fe (ppm)	Mn (ppm)
Suelo 1	206	192	375	18306	393
Suelo 2	91	125	158	21812	389
Suelo 3	37	88	29	31045	644

El suelo 3 presentó valores bajos correspondientes a un suelo no contaminado, el suelo 2 valores moderados correspondientes a un nivel medio de contaminación y el 1 valores relativamente altos indicativos de una contaminación significativa. Un estudio sobre la contaminación por metales pesados en los suelos 1 y 2 tomados en el huerto urbano puede encontrarse en López y col. (2019).

4.3 Concentración de metales extraíbles con AEDT

En la Tabla 10 se puede apreciar como el suelo 1 presenta las mayores concentraciones de metales disponibles siendo significativamente superior con la aplicación de RL en todos los elementos excepto el zinc. El suelo 3 (Control) refleja los datos más bajos en metales disponibles de los tres, incluso tras la aplicación de ramnolípido. Estos resultados son debido a que el suelo 1 era el que presentaba mayores problemas de contaminación (Tabla 9) mientras que el suelo 3 es un suelo control con muy poca contaminación. En la media de las muestras (N=9) podemos apreciar como la concentración de metales es diferente significativamente en Cobre, Hierro y Manganeso con el tratamiento con ramnolípido. Esto nos indica la capacidad del ramnolípido para movilizar EPTs.

Tabla 10: Concentraciones medias finales de Cu, Zn, Pb, Fe y Mn en mg/kg de suelo, extraídos con EDTA 0,5M (tamponado a pH 7) determinados mediante ICP-OES. Valores medios y D.E. de tres replicados para cada suelo y tratamiento (N=3). Análisis de la Varianza según el Modelo Lineal General (MLG).

Factor		Cu mg kg ⁻¹		Zn mg kg ⁻¹		Pb mg kg ⁻¹		Fe mg kg ⁻¹		Mn mg kg ⁻¹	
Suelo	Factor RL	media	D.S.	media	D.S.	media	D.S.	media	D.S.	media	D.S.
Suelo 1	0 RL	93,3 c	1,8	21,8 bc	0,7	141,5 c	4,0	39,3 a	1,4	57,2 b	3,8
	RL	99,9 d	5,1	23,9 c	0,5	148,3 d	3,8	50,1 b	1,8	66,4 c	2,0
	Total (N=6)	96,6 C	5,0	22,8 C	1,3	144,9 C	5,1	44,7 A	6,1	61,8 C	5,7
Suelo 2	0 RL	35,7 b	2,3	18,4 b	2,7	51,6 b	4,2	46,7 ab	5,6	54,8 b	4,0
	RL	37,3 b	2,4	20,8 bc	4,0	53,6 b	3,4	58,9 c	7,6	58,4 b	5,7
	Total (N=6)	36,5 B	2,3	19,6 B	3,3	52,6 B	3,6	52,8 B	9,0	56,6 B	4,8
Suelo 3 (Control)	0 RL	6,4 a	0,5	2,1 a	0,2	4,8 a	0,3	38,7 a	2,7	47,3 a	3,5
	RL	6,5 a	0,7	2,2 a	0,5	5,1 a	0,1	40,2 a	5,6	52,4 a	2,3
	Total (N=6)	6,4 A	0,5	2,1 A	0,3	5,0 A	0,2	39,4 A	4,0	49,9 A	3,8
	0 RL (N=9)	45,1 A	38,3	14,1	9,2	66,0	60,2	41,5 A	5,0	53,1 A	5,5
RL (N=9)	47,9 B	41,3	15,6	10,4	69,0	63,1	49,7 B	9,4	59,0 B	6,9	
Total (N=18)	46,5	38,7	14,8	9,6	67,5	59,9	45,6	8,4	56,1	6,8	
p-valor test de Levene (*) basado :	en la media	0,130		0,002		0,034		0,088		0,227	
	en la mediana			0,576		0,569					
ANOVA de 2 vías (MLG):											
	Efecto del factor Suelo	0,000		0,000	0,001 (**)	0,000	0,001(**)	0,001		0,000	
	Efecto de Factor RL	0,043		0,131	0,479(**)	0,065	0,480(**)	0,003		0,001	
	Interacción Suelo x RL	0,119		0,575		0,216		0,144		0,435	
ANOVA de 1 vía (MLG):											
	Efecto factor (Suelo x RL)	0,000		0,000	0,017 (**)	0,000	0,008 (**)	0,001		0,001	

(*) p > 0,05 : se acepta homogeneidad de varianzas según test de Levene para el Modelo Lineal General : Suelo + RL + (Suelo x RL)

(**) test de Kruskal-Wallis o test de Mann-Whitney para muestras independientes.

En una misma columna, letras mayúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre niveles de un mismo factor según el test post-hoc de Duncan.

Letras minúsculas en una mismas columna indican diferencias de medias significativas entre niveles de tratamientos combinados (Suelo x RL).

En la tabla 10, en el ANOVA de 2 vías podemos apreciar cómo el factor suelo es influyente para todos los elementos analizados, así mismo, la aplicación de RL parece solo producir diferencias significativas en Cobre, Hierro y Manganeso. En el ANOVA de 1 vía podemos ver como el efecto de los tratamientos combinados (Suelo x Ramnolípido) es significativo (Test de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) posiblemente porque en el suelo 1, sí se detectó un aumento significativo en las concentraciones disponibles de los elementos considerados, con la excepción de Zn.

4.4 Resultados de germinación en placas Petri

Ensayo previo de germinación en placa Petri (primer ensayo).

Para determinar qué plantas usaremos en el experimento, se realiza un ensayo de viabilidad con dos tipos de especies distintas y se determina mediante el número de semillas germinadas y elongación cual es la más favorable. Dichas especies son *Brassica juncea* y *Lactuca sativa*.

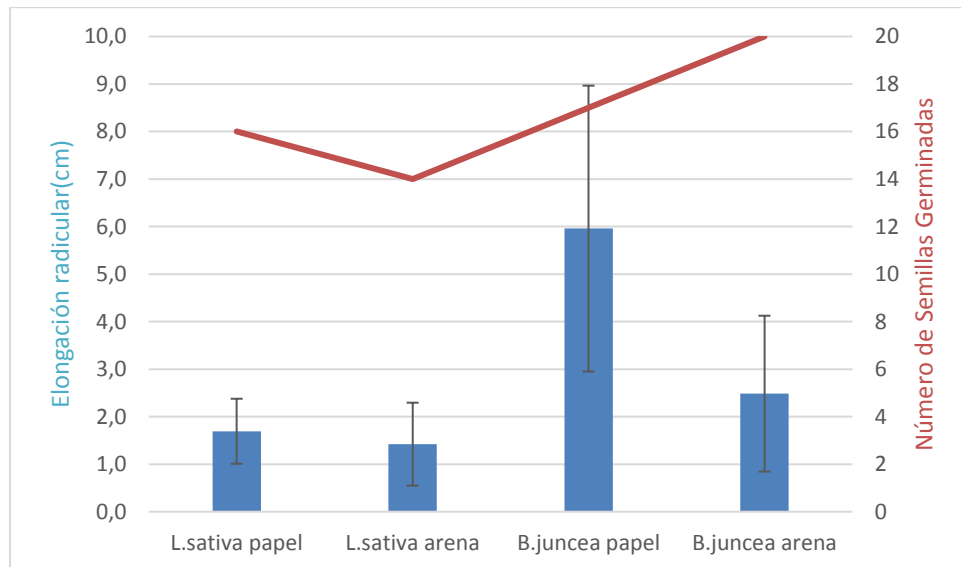


Figura 17: Elongación radicular (cm), en el eje primario y mediante barras, y número de semillas germinadas, indicada mediante línea en el eje secundario, de *Brassica juncea* y *Lactuca sativa* en el primer ensayo. Media y D.E. (N=20).

En la Figura 17 podemos apreciar que la *Brassica juncea* tiene una altura de planta superior a *Lactuca sativa*, con un mayor número de semillas germinadas, tanto en papel como en arena con valores en torno a 80-100% lo que indica que son semillas viables.

Ensayo previo de germinación en placa Petri (segundo ensayo).

En este segundo ensayo de germinación, se sembraron ambas especies en placas Petri con los siguientes sustratos: Suelo 1, Suelo 2 y arena utilizada como control a la que se asignó el 100% de IG calculado según Zucconi y col.,1981. Cada tratamiento se realizó por quintuplicado.

Los resultados obtenidos se representan en la Figura 18.

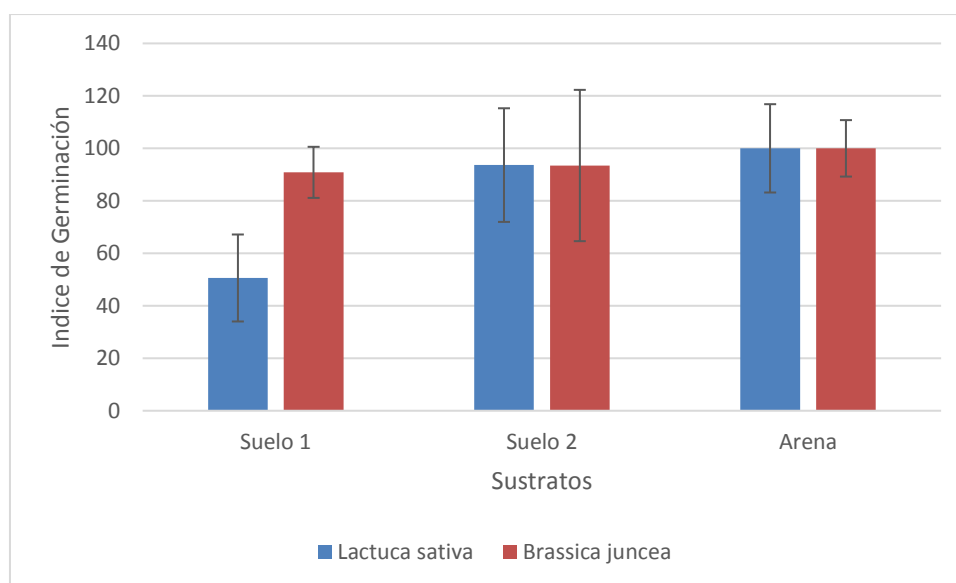


Figura 18: Índice de germinación en tanto por ciento de Brassica juncea y Lactuca sativa con distintos sustratos. (N=5).

El Índice de Germinación con *Brassica* fue algo menor en el suelo 2 y en suelo 1 respecto al control de arena. Con lechuga el IG fue algo menor en el suelo 2 respecto al control y significativamente menor (aproximadamente la mitad) en el suelo 1.

La germinación de lechuga posiblemente se ha visto afectada por el mayor contenido de EPTs en el suelo 1 (Figura 18). De acuerdo esto, la lechuga podría resultar problemática para realizar ensayos posteriores al no presentar buena germinación en uno de los suelos. Además, *Brassica* presentó un comportamiento más homogéneo en cuanto a su germinación en los distintos suelos por lo que resultaría más recomendable para otros ensayos. *Brassica juncea* es una especie que efectivamente se ha propuesto para la fitoremediación de suelos contaminados (Bernal y col., 2007; Carvajal de la Haza, 2016; Márquez Esteban, 2018) por lo que cabe suponer que debe adaptarse a contenidos relativamente altos de EPTs.

4.5 Seguimiento de las plantas en invernadero

4.5.1 Seguimiento de la altura de planta y número de hojas en Invernadero.

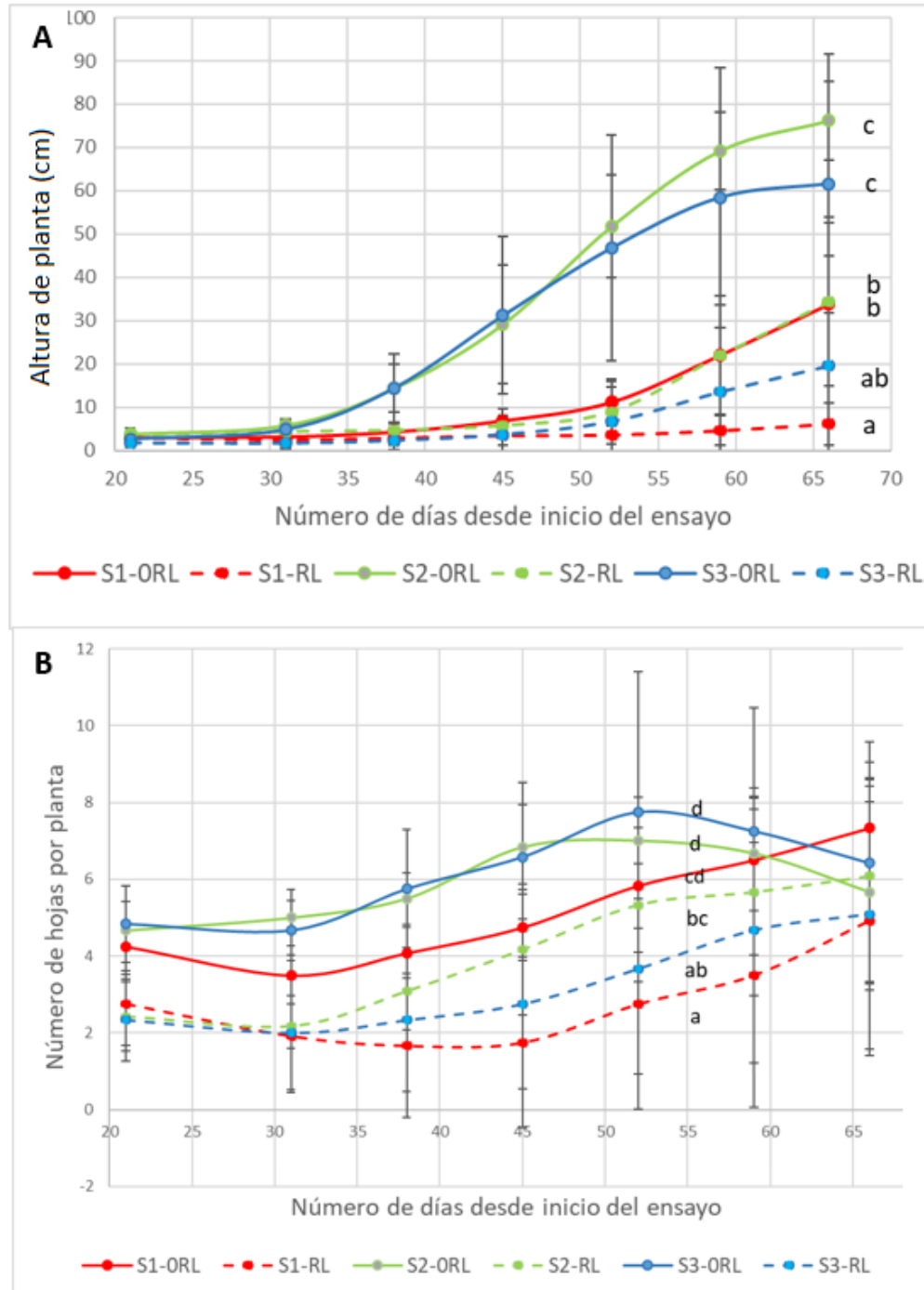


Figura 19: Evolución de la altura del tallo (A) y del número de hojas (B) (N=12). Efecto del tipo de suelo x tratamiento con RL. Análisis de la varianza (MLG) Anova de una vía de medidas repetidas. Letras diferentes indican efecto significativo del tratamiento en la evolución ($p < 0,05$)

En la Figura 19 se representan los parámetros de altura de la parte aérea, así como del conteo de su número de hojas y su evolución en el tiempo. Previamente se confirmó que el bloque no tuvo efecto sobre estos parámetros. Podemos ver cómo han afectado los distintos suelos, con tratamiento o sin él, a las plántulas de *Brassica juncea*. Con estos datos esperamos apreciar curvas de respuesta de las plántulas a la presencia de metales pesados y cómo influye el ramnolípido en los distintos suelos.

En la Figura 19(A) vemos como la altura de planta es mayor para los Suelos 2 y 3, sin ramnolípido, con valores significativamente parecidos. En la Figura 19(B) vemos como los tres suelos sin RL presentan valores significativamente parecidos.

En ambas Figuras parece que la presencia de RL inhibe tanto la altura de la planta como el número de hojas y que estos valores son significativamente distintos.

En el análisis de la varianza de dos vías con medidas repetidas, según el Modelo Lineal General (MLG), se ha encontrado que tanto el tiempo como el tipo de suelo y la aplicación de ramnolípido tienen efecto significativo ($p=0,000$). Además, se ha encontrado que hay interacción significativa entre ellos, por ello se ha realizado el estudio de los tratamientos combinados SueloxRL, con 6 niveles, realizándose el análisis de la varianza de una vía, con medidas repetidas, y separación de medias mediante el test de Duncan ($p<0,05$). Las diferencias significativas entre estos tratamientos se representan en la Figura 19 con letras minúsculas.

4.5.2. Seguimiento de la floración en las plantas en invernadero.

En la Figura 19 se representa el porcentaje de floración en cada tratamiento respecto al que presentó la mayor floración al que se le asignó el 100%. Buscamos estudiar el porcentaje de plantas que presentan botón floral en los distintos suelos y tratamientos con la intención de ver la influencia de los metales pesados en la floración.

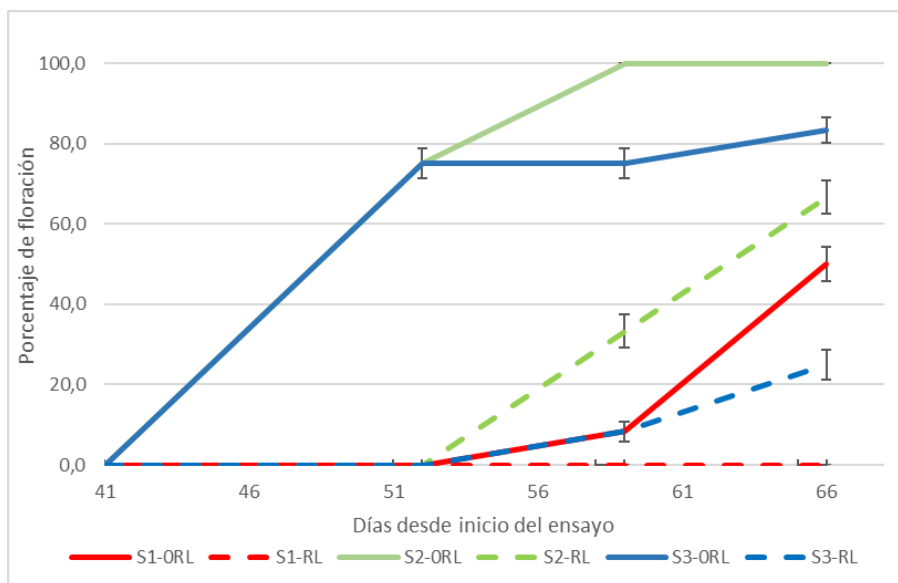


Figura 20: Evolución del porcentaje de floración (N=12). Las barras de error representan la D.E.

Se puede observar que todos los tratamientos fueron significativamente diferentes entre sí. Existe una similitud entre los Suelos 2 y 3 sin RL hasta que a partir de los 51 días estos se diferecian. Las plantas crecidas en el Suelo 2 fueron las que mejores resultados dieron; por el contrario el Suelo 1 presento los valores más bajos (Llegando incluso a no fructificar).

El efecto del ramnolípido se hace evidente en todos los suelos apreciándose un retardo de la floración en aquellas donde se ha aplicado.

4.6. Cosecha en ensayo en invernadero.

4.6.1. Estudio de la fructificación en el ensayo en invernadero.

En la Figura 21 se representan los valores de peso fresco de frutos y número de frutos obtenidos tras la recolección de las plantas en invernadero. En ella podemos observar que el Suelo 1 presentó ausencia de fructificación, tanto con presencia de ramnolípido como sin él; Los pesos más altos de fruto los presentaron los suelos 2 y 3 sin presencia de ramnolípido y el número de frutos (Grafico 20.B) fue mayor en el suelo 2 que en el suelo 3. En los suelos 2 y 3 la adición de ramnolípido dio lugar a una disminución importante en en el peso de los frutos y en el número de frutos respecto a los mismos suelos sin el ramnolípido.

Una vez confirmado que el factor bloque no afectó a estos parámetros Se realizó un análisis de la varianza de dos vías, según el Modelo Lineal General (MLG). Se ha encontrado que tanto el tipo de suelo como la aplicación de ramnolípido tuvieron efecto significativo ($p < 0,05$). Además, se ha encontrado que hay interacción significativa entre los factores considerados, por ello se ha realizado el estudio de los tratamientos combinados SueloxRL, con 6 niveles, realizándose el análisis de la varianza de una vía. Las diferencias significativas entre estos tratamientos se representan en la figura 21 con letras minúsculas.

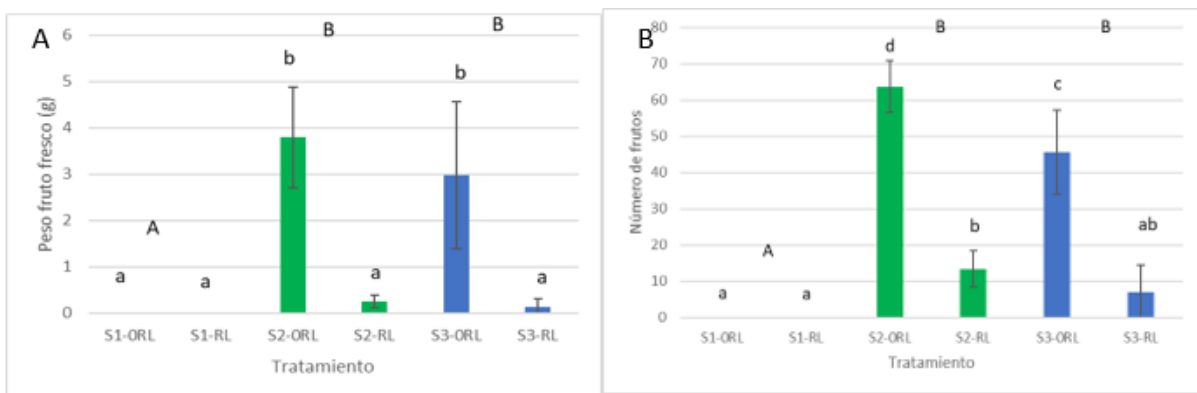


Figura 21: Peso fresco de frutos (A) y número de frutos (B), cosechados al final del ensayo en cada tratamiento (N=3). Barras de error representan D.E. Análisis de la varianza (MLG). Efecto del Suelo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre distintos suelos. Interacción Suelo x RL, letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias estadísticamente significativas entre distintos tratamientos (Test de Duncan, $p < 0,05$).

Estos resultados indican que varios factores pueden haber intervenido: La toxicidad propia del ramnolípido queda de manifiesto en la caída de producción observada en el suelo 3 en presencia del ramnolípido, ya que este suelo no presenta un contenido significativo de EPTs (Tabla 9). Esta toxicidad específica del ramnolípido podría ser también responsable de la caída de producción en el suelo 2, aunque una toxicidad adicional por los metales pesados movilizados (Tabla 10) por el ramnolípido podría también haber actuado en el caso del suelo 2. El valor más alto de número de frutos en el Suelo 2 sin ramnolípido (S2-ORL) respecto al 3 puede deberse de la mayor floración en el suelo 2 (Figura 21) aunque puede ser debido a una mayor fertilidad de este suelo derivada de su mayor contenido orgánico (Tabla 4) por ser un suelo de huerta.

En el Suelo 1 no se obtienen frutos debido probablemente a la escasa floración encontrada en este suelo (Figura 21) que a su vez podría atribuirse al mayor contenido de EPTs.

4.6.2. Estudio de la biomasa en el ensayo en invernadero.

Los parámetros de biomasa que se estudiaron fueron: Peso Fresco de la Parte Aérea (PFA), Peso Seco de la Parte Aérea (PSA), Peso Fresco de la Raíz (PFR) y Peso Seco de la Raíz (PSR) y se muestran en la Figura 22.

En el análisis de la varianza de dos vías, según MLG, se confirmó previamente que el factor bloque no afectó a los parámetros estudiados. Sí se ha encontrado que tanto el tipo de suelo como la aplicación de ramnolípido tuvieron efecto significativo ($p < 0,05$), y que hubo interacción significativa entre estos dos últimos factores en el caso para la variable PSR. Por ello se ha realizado el estudio de los tratamientos combinados SueloxRL, con 6 niveles, realizándose el análisis de la varianza de una vía. Las diferencias significativas entre estos tratamientos se representan en la Figura 22 con letras minúsculas y las diferencias significativas entre suelos con letra mayúscula.

En la Figura 22 se puede apreciar la menor producción en biomasa de las plantas con aplicación del ramnolípido en los tres suelos. El efecto del tratamiento con ramnolípido parece ser más acusado en el Suelo 3, presentándose en este una disminución de la biomasa de la raíz seca del 81% frente al suelo 2 en el que la disminución supuso el 69%. Esto puede ser debido a la diferencia de textura entre los dos suelos más arcilloso en el caso del suelo 3 y el mayor porcentaje de materia orgánica del suelo 2 que podría tener un efecto beneficioso en el desarrollo radicular.

La biomasa, tanto aérea como radicular, en los suelos sin ramnolípido fue mayor en los suelos 2 y 3 respecto al 1, y en el caso del peso fresco aéreo el suelo 2 superó al suelo 3. En el caso de los suelos con ramnolípido estas tendencias se mantuvieron aproximadamente igual, aunque el peso seco radicular no resultó diferente entre los tres suelos.

De nuevo, como en los parámetros comentados anteriormente se observa el efecto tóxico del ramnolípido en los tres suelos y el efecto de la mayor fertilidad del suelo 2.

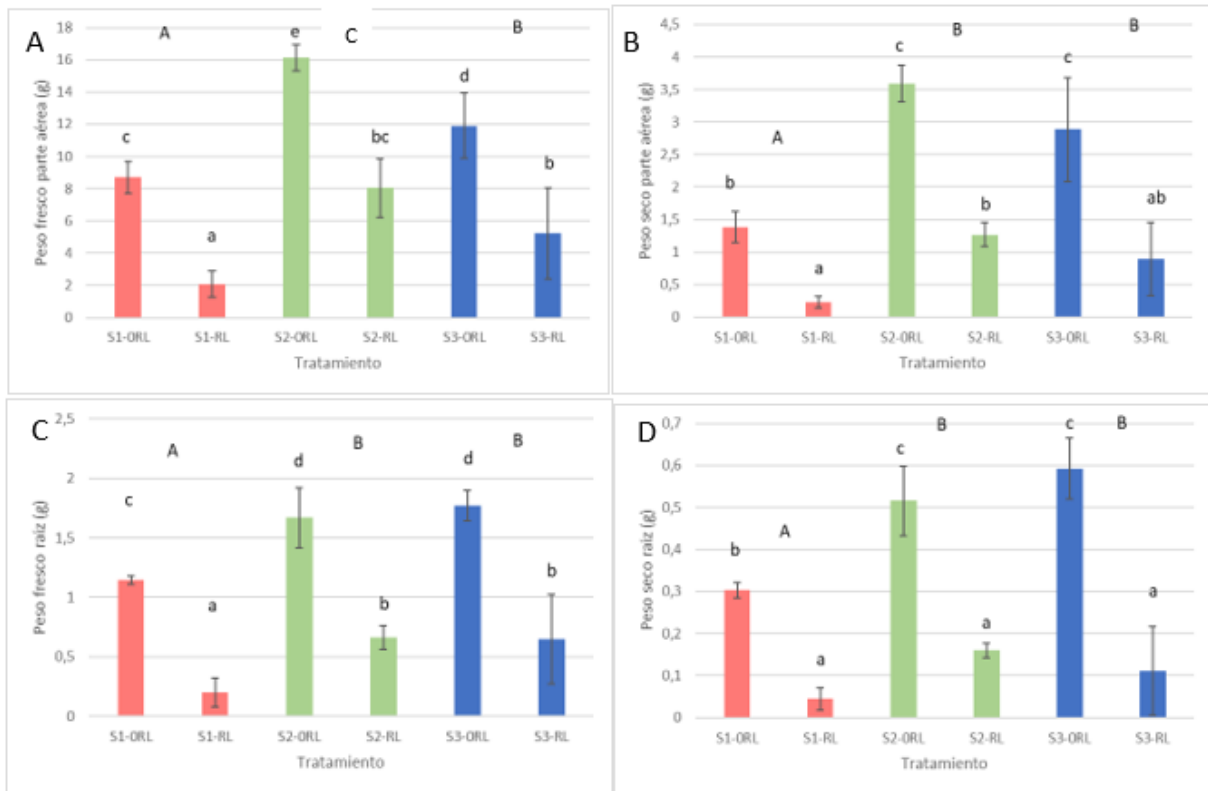


Figura 22: Peso fresco de la parte aérea (A) y peso seco de la parte aérea (B), peso fresco de la raíz (C) y Peso seco de la raíz (D), cosechados al final del ensayo en cada tratamiento (N=3). Barras de error representan D.E. Análisis de la varianza (MLG). Efecto del Suelo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre distintos suelos. Interacción Suelo x RL, letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias estadísticamente significativas entre distintos tratamientos (Test de Duncan, $p < 0,05$).

4.6.3 Estudio de la Tasa de Crecimiento Relativo (TCR).

Obtenidos previamente los datos de peso seco de las plantas obtenidas en invernadero, se procede a calcular la Tasa de Crecimiento Relativo (TCR) para los distintos suelos en presencia y ausencia de ramnolípido.

El suelo 1 presentó una menor TCR frente a los suelos 2 y 3 que presentaban tasas de crecimiento similares. La aplicación del ramnolípido tuvo siempre un efecto depresor siendo mucho más acusado en las plantas que crecieron en el Suelo 1.

Por otro lado, los suelos 2 y 3 tuvieron comportamientos similares sin diferencias significativas incluso tras la aplicación de ramnolípido.

En el análisis de la varianza de dos vías, según el Modelo Lineal General (MLG), previamente confirmado que el factor bloque no afectó a la TCR, se ha encontrado que tanto el tipo de suelo como la aplicación de ramnolípido tienen efecto

significativo ($p < 0,05$), y que hay interacción significativa entre estos dos factores. Por ello se ha realizado el estudio de los tratamientos combinados SueloxRL, con 6 niveles, realizándose el análisis de la varianza de una vía. Las diferencias significativas entre estos tratamientos se representan en la Figura 23 con letras minúsculas y las diferencias significativas entre suelos con letra mayúscula.

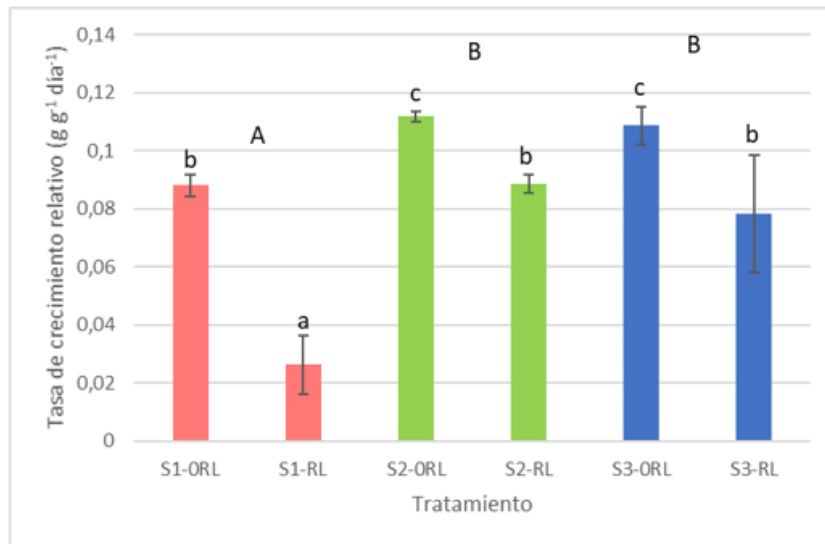


Figura 23: Tasa de crecimiento relativo (TCR) (N=3). Barras de error representan D.E. Análisis de la varianza (MLG). Efecto del Suelo, letras mayúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre distintos suelos. Interacción Suelo x RL, letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias estadísticamente significativas entre distintos tratamientos (Test de Duncan, $p < 0,05$).

4.6.4. Concentración de metales pesados en planta medidos por ICP-OES

A partir de las muestras de parte aérea y raíz del ensayo en invernadero, se realizan las mediciones de las concentraciones de metales pesados usando el ICP-OES.

Tabla 11. Concentraciones medias de Cu , Zn, Pb, Fe y Mn en mg/kg (m.s.) de parte aérea de plantas de *Brassica juncea*. Valores medios y desviación estándar (D.E.) de tres replicados para cada suelo y tratamiento (N=3). Análisis de la Varianza según el Modelo Lineal General (MLG).

Factor Suelo	Factor RL	Cu mg kg ⁻¹		Zn mg kg ⁻¹		Pb mg kg ⁻¹		Fe mg kg ⁻¹		Mn mg kg ⁻¹	
		media	D.E.	media	D.E.	media	D.E.	Media	D.E.	media	D.E.
Suelo 1	0 RL	12,6 b	4,1	47,9 bc	8,8	1,0	0,2	46,8 a	14,0	44,4 c	11,5
	RL	33,1 c	2,3	88,4 d	9,8	0,9	1,1	253,1 b	175,6	115,0 d	8,5
	Total (N=6)	22,8 B	11,6	68,2 B	23,7	1,0	0,7	150,0	158,7	79,7 B	39,7
Suelo 2	0 RL	5,3 a	0,3	34,0 ab	4,5	0,2	0,3	45,5 a	8,9	15,9 ab	2,4
	RL	6,7 a	1,2	52,6 c	2,3	3,9	3,7	43,6 a	8,0	29,3 abc	6,9
	Total (N=6)	6,0 A	1,1	43,3 A	10,7	2,1	3,1	44,6	7,6	22,6 A	8,7
Suelo 3 (Control)	0 RL	5,0 a	1,6	26,6 a	7,4	0,6	0,7	65,1 a	36,3	11,8 a	3,2
	RL	7,3 a	2,8	55,2 c	11,6	0,5	0,4	156,5 ab	147,2	33,1 bc	17,4
	Total (N=6)	6,0 A	2,5	40,9 A	17,9	0,6	0,5	110,8	108,2	22,5 A	16,2
	0 RL (N=9)	7,5	4,5	36,1	11,2	0,6	0,5	52,5	22,1	24,0	16,5
	RL (N=9)	15,7	13,2	65,4	18,9	1,8	2,5	151,1	146,2	59,1	43,2
	Total (N=18)	11,6	10,5	50,8	21,3	1,2	1,9	101,8	113,4	41,6	36,5
p-valor test de Levene (*) basado :	en la media	0,170		0,197		0,06		0,002		0,042	
	en la mediana					0,192		0,441		0,740	
ANOVA de 2 vías (MLG):											
	Efecto del factor Suelo	0,000		0,000		0,284	0,513 (**)	0,194	0,144(**)	0,000	0,011(**)
	Efecto de Factor RL	0,000		0,000		0,140	1,000(**)	0,048	0,031(**)	0,000	0,019(**)
	Interacción Suelo x RL	0,000		0,100		0,103		0,206		0,001	
ANOVA de 1 vía (MLG):											
	Efecto factor (Suelo x RL)	0,000		0,000		0,126	0,075(**)	0,095	0,054(**)	0,000	0,011(**)

(*) p > 0,05 : se acepta homogeneidad de varianzas según test de Levene para el Modelo Lineal General : Suelo + RL + (Suelo x RL)

(**) test de Kruskal-Wallis para muestras independientes (tres categorías) o test de Mann-Whitney para muestras independientes (2 categorías)

En una misma columna, letras mayúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre niveles de un mismo factor según el test post-hoc de Duncan. Letras minúsculas en una mismas columna indican diferencias de medias significativas entre niveles de tratamientos combinados (Suelo x RL).

En la Tabla 11 puede verse como en el suelo 1 las plantas presentaron las mayores concentraciones en Cobre, Zinc, Hierro y Manganeso con respecto al Suelo 2 y 3, teniendo en estos últimos, valores de metales significativamente similares entre ellos.

La aplicación de RL parece tener influencia en el Suelo 1 ya que su concentración de metales es significativamente diferente con la presencia o ausencia de RL. Por el contrario, en los Suelos 2 y 3 parecen tener valores parecidos en Cobre y Hierro aunque diferentes en el caso del Zinc.

En el caso del Suelo1-RL podemos apreciar como el Cu alcanza valores superiores a 30 mg kg^{-1} , que según Kabata-Pendias y Pendias (2011) podría producir cierta toxicidad en plantas sensibles.

En la Tabla 11, en el ANOVA de 2 vías podemos apreciar cómo los factores suelo y ramnolípido son influyentes para todos los EPTs analizados, así mismo, existe también interacción SueloxRamnolípido; En el ANOVA de 2 vías basado en la mediana podemos apreciar como el factor Ramnolípido es influyente ($p < 0,05$) tanto para Hierro como para Manganeso y que solo es significativo el factor suelo para el Manganeso (Test de Mann-Whithney, $p < 0,05$). En el ANOVA de 1 vía podemos ver como el efecto de los tratamientos combinados (Suelo x Ramnolípido) es significativo para los EPTs (Test de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). En el ANOVA de 1 vía basado en la mediana podemos apreciar como la interacción SueloxRamnolípido es significativo (Test de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

4.7. Metales extraídos por las plantas

Tabla 11: Metales extraídos por las plantas (mg/kg Suelo)

	Tratamiento	Cobre	Zinc
Suelo 1	0-RL	$8,82 \times 10^{-3}$	$33,53 \times 10^{-3}$
	RL	$3,31 \times 10^{-3}$	$8,84 \times 10^{-3}$
Suelo 2	0-RL	$9,54 \times 10^{-3}$	$61,20 \times 10^{-3}$
	RL	$4,19 \times 10^{-3}$	$32,88 \times 10^{-3}$
Suelo 3	0-RL	$7,00 \times 10^{-3}$	$37,24 \times 10^{-3}$
	RL	$3,29 \times 10^{-3}$	$24,84 \times 10^{-3}$

En la Tabla 12 podemos ver como el Suelo 2 es en el que se consigue la mayor extracción tanto de Cobre como de Zinc. Así mismo, el Suelo 3 es en el que menos metal se ha conseguido extraer.

El efecto del RL parece realiza un efecto contrario al que se pretendía, ya que cuando se aplica, este consigue extraer menos metal debido principalmente a la menor producción de biomasa.

5. CONCLUSIONES

El ramnolípido utilizado a la dosis de 1 g/kg de suelo ejerció un efecto fitotóxico sobre el cultivo de *Brassica juncea*.

Este efecto se ha mostrado en:

- Retraso de la floración.
- Menor altura de planta.
- Menor número de hojas.
- Menor fructificación.
- Menor producción de biomasa.

La adición de ramnolípido al suelo, sobre todo en el caso del suelo más contaminado, favoreció la disponibilidad de metales pesados en el suelo, y produjo plantas con contenidos mayores de EPTs en la parte aérea,

La caída en la producción de biomasa dió lugar a menores extracciones de metales respecto al suelo sin ramnolípido.

Por tanto, el proceso de biorrecuperación con *Brassica* y ramnolípido no ha sido efectivo.

Debe estudiarse en mayor detalle el efecto de la concentración de ramnolípido utilizada y el estado de crecimiento de la planta en el momento de aplicación con objeto de limitar la fitotoxicidad del mismo.

6. BIBLIOGRAFIA

Baird, C. (1999). Environmental Chemistry. 2nd Ed. W.H. Freeman & Company.

Banat, I., Makkar, R., Cameotra, S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 495-508.

Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T., Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:427– 444.

Basta, N. T., Gradwohl, R. (2000). Estimation of Cd, Pb, and Zn Bioavailability in Smelter-Contaminated Soils by a Sequential Extraction Procedure. *J. Soil Contamin.* 9 (2): 149-164.

Batelle, Exponent. (2000). Guide for Incorporating Bioavailability Adjustments into Human Health and Ecological Risk Assessments at U.S. Navy and Marine Corps Facilities. Part 1: Overview of Metals Bioavailability. Ed. Port Hueneme, CA: Naval Facilities Engineering Command.

Bertsch, F. (1995). La fertilidad de los suelos y su manejo. 1 ed. San José, Costa Rica. Asociación Costarricense de la ciencia del suelo. 157 p.

Brooks, R. R. (1998). Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals. Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archeology, Mineral Exploration and Phytomining. CAB International, New York, NY. United States of America.

Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., Baker, A.J.M. (1997). Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 279-284.

Colombo, L.D., Mangione, S.B., Figlioglia, A. (1998). Soil profile distribution of heavy metals in soil attended with sewage sludge for eight years. *Agr. Med. Inter. J. of Agric. Sci.* 128: 273-283.

Conder, J. M., Lanno, R. P. (2000). Evaluation of surrogate measures of cadmium, lead, and zinc bioavailability to *Eisenia fetida*. *Chemosphere*. 41: 1659-1668.

Conder, J. M., Lanno, R. P., Basta, N. T. (2001). Assessment of Metal Availability in Smelter Soil Using Earthworms and Chemical Extractions. *J. Environ. Qual.* 30: 1231-1237.

Cort, T., Song, M., Bielefeldt, A. (2002). Nonionic surfactant effects on pentachlorophenol biodegradation. *W. Res.* 36: 1253–1261.

Cunningham, S.D. , Berti, W.R., Huang, J.W. (1995). Phytoremediation of contaminated soils and sediments. En: *Bioremediation: Science and Applications* (eds. Skipper, H.D. y Turco, R.F.), pp. 145-56, *Soil Sci. Soc. Am.*, Madison, .

Doménech, X. (1993). Química ambiental. El impacto ambiental de los residuos. Ed. Miraguano Ediciones. Madrid.

Evangelou, M.W.H., Ebel, M., Schaeffer, A. (2006). “Evaluation of the effect of small organic acids on phytoextraction of Cu and Pb from soil with tobacco *Nicotiana tabacum*”. *Chemosphere*, 63: 996-1004.

Fuentes Yagüe JL. (1999). El suelo y los fertilizantes, José Luis Fuentes Yagüe, 5º edición revisada y ampliada. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ediciones Mundiprensa, Madrid, 1999.

Gardea-Torresdey, J., Hejazi, M., Tiemann, K., Parson, J. G., Duarte- Gardea, M., Henning, J. (2002). Use of hop (*Humulus lupulus*) agricultural by- products for the reduction of aqueous lead (II) environmental health hazards. *J. Hazard. Mat.* B91: 95-112.

Guo, Y., Mulligan, C. (2006). Combined treatment of Styrene contaminated soil by rhamnolipid washing followed by anaerobic treatment. Chapter 1. *In: RC. Hudson* (Ed.), *Hazardous Materials in Soil and Atmosphere*, Nova Science Publisher, New York. 1-38 pp.

Hund-Rinke, K., Kördel, W. (2003). Underlying issues in bioaccessibility and bioavailability: experimental methods. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56: 52-62.

Ivshina, I., Kuyukina, M., Philp, J., Christo, N. (1998). Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 711-717.

James A. Duke (1983). Handbook of energy crops. Purdue University, Center for New Crops & Plants Products.

Johnson, A., Gunawardana, B., Singhal, N. (2009). Amendments for enhancing copper uptake by *Brassica juncea* and *Lolium perenne* from solution. *Int. J. Phytorem.* 11:215–23

Judith Prieto Méndez, César A González Ramírez, Alma D Román Gutiérrez, Francisco Prieto García. (2009). Tropical and Subtropical Agroecosystems. Vol 10, Nº1, p:29-44.

Kabata-Pendias, A. (2000). Trace elements in soils and plants. Third Edition. CRC Press,-Boca Raton, EEUU. 413 p.

Kabata-Pendias A., Pendias, H. (2001). Trace elements in soils and plants CRC. Press, Florida. EEUU.

Kabata-Pendias, A.; Pendias, H. (2011). Trace Elements in Soils and Plants, 4 ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA; pp. 432.

Karant, N., Deo, P., Veenanadig, N. (1999). Microbial production of biosurfactants and their importance. *Current Sci.* 77:116-126.

Kärenlampi, S., Schat, H., Vangronsveld, J. A. C., Verkleij, D, Van Der L., Mergeay, M., Tervahauta, A. I. (2000). Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Environ. Pollut.* 107: 225 – 231.

Kelley, M. E., Brauning, S. E., Schoof, R. A., Ruby, M. V. (2002). Assessing oral bioavailability of metals in soil. Ed. Battelle Press. Columbia, Ohio.

Lacerda, L.D., Carvalho, C.E.V., Tanizaki, K.F., Ovalle, A.R.C., Rezende, C.E. (1993). The biogeochemistry and trace metals distribution of mangrove rhizosphere. *Biotropica* 25:252-257.

Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Braham, K., Basta, N. (2004). The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotox. Environ. Safety.* 57 (1): 39-47.

Lovaglio, R., Dos Santos, F., Jafelicci, M., y Contiero, J.. 2011. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 85: 301-305. 8.

López, R., Hallat J., Castro A., Miras A., & Burgos, P. (2019). Heavy metal pollution in soils and urban-grown organic vegetables in the province of Sevilla, Spain, *Biological Agriculture & Horticulture*, DOI:10.1080/01448765.2019.1590234

Maqueda, A. P. (2003). Fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados. Tesis de Opción a Maestría en Biotecnología. Departamento de Química y Biología, Universidad de las Américas, Cholula, Puebla. México.

Marzocca, A. (1976). Manual de malezas, 3^o ed. Edit. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.

Mulligan, C. (2009). Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Colloids & Interface Science*, 14: 372-378.

Nascimento, C.W.A.; Amarasiriwardena, D.; Xing, B. (2006). Comparison of natural organic acids synthetic chelantes at enhancing phytoextraction of metal from a multi-metal contaminated soil. *Environmental Pollution*, v.140, p.114-123. 2006.

Olivera, N., Commendatore, M., Moran, A., Esteves, J. (2000). Biosurfactant enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 25:70–73.

Schippers, C., Gebner, K., Muller, T., Scheper, T. (2000). Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. *J. Biotechnol.* 83:189–198.

Sims, J.T. & Johnson, G.V., (1991). Micronutrients soil tests. En: Mortvedt, J.J., Cox, F.R., Shuman, L.M., Welch, R.M., (eds.), *Micronutrients in Agriculture*, vol. 4, pp. 427–476. Soil Science Society of America Inc., Madison, Wisconsin, United States, second edition

Supaphol, S., Jenkins, S.N., Intomo, P., Waite, I.S., O'Donnell, A.G. (2011). Microbial community dynamics in mesophilic anaerobic co-digestion of mixed waste. *Bioresour. Technol.* 102: 4021–4027.

Tecon, R., Van der Meer, J. (2000). Effect of two types of biosurfactants on phenanthrene availability to the bacterial bioreporter *Burkholderia sartisoli* strain RP037. *App. Microbiol. Biotech.* 85:1131–1139.

Ure, A.M., Quevauvillier, Ph., Muntau, H., Griepink, K.B. (1993). Specification of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 51, 135-151.

Volkering, F., Breure, A.M., Rulkens, W.H. (1998). Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 8, 401–417.

Peretti, A., (1994). Manual de Análisis de semillas. Ed. Hemisferio Sur S.A., 281

Pena-Pérez, X., Calvo, L., Gonzalez Suárez, C., Lomba Martínez, X., Macías Vázquez, F., Calvo de Anta, R., Pérez Llaguno, C., Matilla Mosquera, N., Rodríguez-Lado, L. (2016). NIVELES GENÉRICOS DE REFERENCIA DE METALES PESADOS Y OTROS ELEMENTOS TRAZA EN SUELOS DE GALICIA

Rodríguez Quilón, Isabel: Adam, Giles y Duran Altisent, Jose María (2008). Ensayos de germinación y análisis de viabilidad y vigor en semillas. "Agricultura Revista Agropecuaria" (n.912); pp. 836-842.

Yin, J., Qiang, Y., Jia, Y., Pen, H., Qin, H., Zhang, N., He, B. (2008). Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas Aeruginosa* S6 from oil containing wastewater. *Proc. Biochem.* 44:302-308.

Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., De Bertoli, M. (1981). Evaluating toxicity in immature compost. *En: Biocycle* 22: 54-57.

