



ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

TRABAJO FIN DE GRADO

**Extracción de cobre por plantas de  
mostaza parda (*Brassica juncea*)  
durante su desarrollo vegetativo, en un  
suelo contaminado artificialmente y  
efecto de la aplicación de ramnolípido.**

Marco A. Márquez Esteban.

Titulación: Grado en Ingeniería Agrícola.

Mención en Explotaciones Agropecuarias.

Sevilla, Septiembre de 2018.

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**Extracción de cobre por plantas de mostaza parda  
(*Brassica juncea*) durante su desarrollo vegetativo, en  
un suelo contaminado artificialmente y efecto de la  
aplicación de ramnolípido.**

**Autor:** D. Marco A. Márquez Esteban.

**Tutora:** Dña. María del Carmen Florido Fernández.  
Dra. en Ciencias Químicas.  
Dpto. de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola.  
Universidad de Sevilla

Sevilla, Septiembre 2018.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a varias personas y entidades la ayuda que me han prestado en la realización de este TFG.

A mi tutora M<sup>a</sup> del Carmen Florido Fernández, por su acompañamiento, su energía y su apoyo, por haber sido mi guía y mi estímulo durante todo el proceso de investigación y elaboración de este trabajo; es la persona que más desinteresadamente me ha ayudado y ha estado ahí en todo momento cuando la he necesitado. Gracias.

A las profesoras Carmen Ortega, Auxiliadora Moreno y Cristina Andrés, y al director y profesor de la ETSIA José Manuel Quintero, por su ayuda e interés en este trabajo y por resolver mis dudas de conocimiento, quiero expresar mi agradecimiento.

Al Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola y a su directora Rosario Vaz, al Centro de Investigación Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) y al personal de este centro, especialmente a Jesús y José María, y al Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), especialmente a Fernando Madrid. Gracias por permitirme utilizar vuestras instalaciones, por hacer posible la realización de los análisis necesarios en vuestros laboratorios, por los materiales y por vuestra ayuda.

A mis padres, gracias a quienes soy quien soy y a quienes sólo puedo expresar mi sincero agradecimiento por apoyarme, tanto en mi etapa académica como en toda mi vida, porque sin su ayuda nada de esto hubiera sido posible. Gracias por confiar en mí. Os quiero.

A mis hermanas, siempre han deseado que llegara este momento, me han hecho crecer siempre tanto en sabiduría como en lo personal, yo soy un trocito de vosotras dos.

A mis amigos, por aguantar todos mis agobios, por escucharme y aconsejarme, por hacer de cada momento una fiesta y alegrarme la vida; seguiremos celebrando todos los triunfos. Gracias.

## **RESUMEN DEL TFG**

La preocupación por fomentar la recuperación de suelos contaminados con metales potencialmente tóxicos y los serios problemas que estos pueden causar en el medio ambiente si se incorporan a la cadena trófica, hacen que se planteen diversos métodos para solucionarlos. Uno de estos métodos consiste en la fitoextracción, que es la capacidad que tienen algunas especies vegetales para extraer del suelo estos metales e incorporarlos a su masa vegetativa. La eficacia de la fitoextracción puede aumentar mediante la aplicación al suelo de agentes quelantes, lo que se conoce como fitoextracción asistida o inducida.

Los ramnolípidos son biosurfactantes biodegradables que han sido propuestos como agentes quelantes que favorecen la biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo y facilitan la fitoextracción de los mismos.

Estudios previos han demostrado que *Brassica juncea* puede resultar eficaz en la fitoextracción de cobre, en concentraciones menores de 1000 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo y que la aplicación de ramnolípido produjo un aumento en la fitoextracción de cobre sin resultar fitotóxico.

En el presente trabajo se estudia el efecto de la contaminación artificial de un suelo con diferentes dosis de sulfato de cobre, en la germinación y desarrollo de una planta fitoextractora (*Brassica juncea*). Además se evalúa el efecto que tiene la aplicación de un biosurfactante biodegradable (ramnolípido JBR-425).

Para ello se realizan ensayos de germinación en placas Petri, donde se estudia de manera previa, el efecto de la aplicación de diferentes dosis de cobre y ramnolípido (en suelo o en papel según proceda), en la germinación de semillas de *Brassica juncea*.

Con los resultados obtenidos en placa Petri, se diseña un ensayo en macetas dispuestas en bandejas que se colocan completamente al azar en invernadero, utilizando un suelo agrícola de textura franca y pH ligeramente ácido, al que se aplican tres dosis de cobre (control, 125, 250 y 500 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo). Por último se aplica una dosis de ramnolípido de 1000 mg kg<sup>-1</sup> de suelo, para estudiar el efecto de éste en la fitoextracción.

Se trata, además, de conocer el efecto de los tratamientos sobre el desarrollo y producción de biomasa de las plantas en tres estadios: -dos hojas verdaderas, -botón floral y -maduración de frutos, tanto en la parte aérea como en la raíz.

Además se analiza la parte aérea de las plantas, procedentes del ensayo en invernadero, en el momento de mayor extracción (botón floral), para determinar el cobre presente en el material vegetal por ICP óptico.

Finalmente se estudia la biodisponibilidad de Cu en los suelos, tanto en los ensayos de germinación en placa Petri como al final de los ensayos de fitoextracción en macetas, realizando extracción con AEDT y posterior determinación por espectrofotometría de absorción atómica.

En general, tanto en los ensayos de germinación en placa como en el ensayo de invernadero, pudo verse el efecto fitotóxico creciente del cobre y del ramnolípido, disminuyendo esta fitotoxicidad cuando eran envejecidos en el suelo, ya que el cobre es adsorbido por la arcilla, y el ramnolípido mejora la estructura del suelo debido a su carácter surfactante.

La biomasa creada por las plantas de *Brassica juncea*, se vio afectada por la contaminación de cobre en el suelo en los primeros estadios de su desarrollo pero no en los últimos, no viéndose afectada por la presencia de ramnolípido.

La presencia de cobre en el suelo, mejoró la tasa de crecimiento relativo (TCR) de las plantas que se obtuvieron en el período de 2 hojas verdaderas-botón floral, y no influyó en el período de botón floral-maduración de frutos. El ramnolípido, sin embargo, no afectó en el primer período, y en el segundo mejoró los valores de esta tasa.

La aplicación de cobre al suelo hizo aumentar tanto el cobre disponible, extraído con AEDT, como el acumulado en la parte aérea, determinado por ICP óptico.

El rendimiento de la técnica de fitoextracción resultó muy bajo, lo que exigiría un número muy alto de cosechas para reducir los niveles de contaminación hasta los niveles de referencia.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Problemática de la contaminación en suelos	3
1.1.1 Contaminación causada por metales pesados	3
1.1.2 Elementos potencialmente tóxicos	6
1.1.3 Umbrales de contaminación	8
1.1.4 Riesgo ambiental. Movilidad y biodisponibilidad de los elementos potencialmente tóxicos	9
1.1.5 Dinámica de los elementos potencialmente tóxicos	10
1.1.6 Factores del suelo que afectan a la movilidad de los elementos potencialmente tóxicos	10
1.1.7 Biodisponibilidad de los elementos potencialmente tóxicos	12
1.2 Recuperación de los suelos contaminados por elementos potencialmente tóxicos	13
1.2.1 Fitorrecuperación o fitorremediación	13
1.2.2 Fitoextracción inducida por agentes quelantes	16
1.3 Biosurfactantes	17
1.3.1 Composición y función de los biosurfactantes	18
1.3.2 Recuperación mediante biosurfactantes de suelos contaminados por elementos potencialmente tóxicos	18
1.4 Sulfato de cobre	19
1.4.1 Descripción de la molécula de sulfato de cobre	19
1.4.2 Propiedades químicas del cobre cobre	20
1.4.3 Uso del sulfato de cobre en la agricultura	21
1.5 <i>Brassica juncea</i>	23
1.5.1 Identificación y descripción botánica de la planta	23
1.5.2 Hábitat	24
1.5.3 Biología y ecología	24
1.5.4 Uso de <i>Brassica juncea</i> como planta fitoextractora	25
1.6 Ensayos de germinación	26
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>33</b>
3.1 Materiales	35
3.1.1 Material vegetal	35
3.1.2 Suelo	35
3.1.3 Reactivos	35
3.1.3.1 Sulfato de cobre	35
3.1.3.2 Ramnolípido JBR-425	36
3.1.4 Placas Petri	36
3.1.5 Macetas	37
3.2 Métodos	37
3.2.1 Medidas previas de pH y conductividad	37
3.2.2 Experimentos de germinación en placa	40
3.2.3 Ensayo en invernadero	44
3.2.3.1 Descripción del invernadero	44
3.2.3.2 Diseño del ensayo en invernadero	47
3.2.3.3 Manejo del suelo	48
3.2.3.4 Siembra	50
3.2.3.5 Aclareo de las plantas y recogida del material vegetal	52
3.2.3.6 Estudio del crecimiento (biomasa)	54
3.2.4 Extracción del cobre disponible con AEDT	55
3.2.5 Determinación del cobre por espectrofotometría de absorción atómica	56
3.2.6 Determinación de metales en material vegetal por ICP óptico	58
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>61</b>
4.1 Resultados de medidas de pH y conductividad eléctrica	63
4.1.1 pH y conductividad en los suelos de los tratamientos en placa Petri	63
4.1.2 pH del extracto con AEDT de los tratamientos utilizados en placa Petri y en invernadero	63
4.2 Resultados de germinación en placa Petri	64
4.3 Resultados de germinación en macetas (invernadero)	74
4.4 Cobre disponible en el suelo de las placas para los diferentes tratamientos a tiempo 0 y tiempo 15 días	76
4.5 Cobre disponible en el suelo cultivado en macetas una vez terminado el ensayo	78

4.6 Resultados de biomasa creada en el ensayo en macetas, a tres tiempos (estadío de 2 hojas verdaderas, estadío de botón floral y estadío de madurez de las plantas)	80
4.6.1 Biomasa obtenida en la primera recolección (estadío de 2 hojas verdaderas)	80
4.6.2 Biomasa obtenida en la segunda recolección (estadío de botón floral)	82
4.6.3 Biomasa obtenida en la tercera recolección (estadío de planta madura)	83
4.7 Tasa de crecimiento relativo (TCR)	86
4.8 Análisis foliar. Cobre extraído por ICP óptico	89
4.9 Rendimiento de la técnica de fitoextracción	93
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>95</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>101</b>



**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Aportes máximos anuales de metales pesados para suelos de diferente capacidad de intercambio (expresados en kg/ha), (Fuentes Yagüe JL., 1999).	4
<b>Tabla 2.</b> Propiedades químicas del cobre, (Wright J., 2003).	20
<b>Tabla 3.</b> Caracterización del suelo utilizado.	35
<b>Tabla 4.</b> Tratamientos para ensayo en invernadero (dosis de cobre y ramnolípido en mg kg <sup>-1</sup> de suelo).	47
<b>Tabla 5.</b> Distribución al azar de los tratamientos por triplicado en la mesa de trabajo y orientación de las bandejas.	47
<b>Tabla 6.</b> Medidas de pH y conductividad del suelo con los diferentes tratamientos.	63
<b>Tabla 7.</b> pH del sobrenadante con AEDT (suelo del ensayo en placas).	64
<b>Tabla 8.</b> pH del extracto AEDT (suelo del ensayo en invernadero).	64
<b>Tabla 9:</b> Rendimiento de la técnica de fitoextracción en el estadio de botón floral.	93
<b>Tabla 10:</b> Estimación del rendimiento de la técnica de fitoextracción. Cálculo según número de plantas viables obtenidas en el estadio de 2 hojas verdaderas (antes del aclareo).	94

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Representación molecular de mono-ramnolípidos y di ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	36
<b>Figura 2.</b> Macetas utilizadas para el ensayo en invernadero.	37
<b>Figura 3.</b> pHímetro utilizado para medidas de pH en pasta saturada.	38
<b>Figura 4.</b> Suspensiones suelo:agua (1:2,5) para la medida de pH en disolución acuosa.	39
<b>Figura 5.</b> Conductímetro utilizado para las medidas de conductividad eléctrica.	39
<b>Figura 6.</b> Resultado de germinación en placa (primer ensayo).	40
<b>Figura 7.</b> Resultado segundo ensayo de germinación en placa con los tratamientos: arena, suelo control, suelo + 250 mg Cu/kg suelo, suelo + 500 mg Cu/kg de suelo y suelo + 750 mg Cu/kg de suelo.	41
<b>Figura 8.</b> Resultado del tercer ensayo de germinación (25 placas), 5 placas por tratamiento. Con los tratamientos: arena, suelo control, suelo + 250 mg Cu/kg suelo, suelo + 500 mg Cu/kg de suelo y suelo + 750 mg Cu/kg de suelo.	42
<b>Figura 9.</b> Ensayo de germinación en placa con diferentes dosis de ramnolípidos (0 mg/l, 250 mg/l, 500 mg/l, 750 mg/l y 1000 mg/l).	42
<b>Figura 10.</b> Ensayo de germinación en placas con diferentes dosis de Cu y RL en suelo envejecido 15 días. Tratamientos de cobre: (arena, suelo control, suelo + 250 mg Cu/kg suelo, suelo + 500 mg Cu/kg de suelo y suelo + 750 mg Cu/kg de suelo) y tratamientos de ramnolípidos: (0 mg/kg y 1000 mg/kg).	43
<b>Figura 11.</b> 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.	45
<b>Figura 12.</b> Temperaturas diarias media, máxima y mínima.	46
<b>Figura 13.</b> Humedad diaria media, máxima y mínima.	46
<b>Figura 14.</b> Radiación diaria media, máxima y mínima.	46

<b>Figura 15.</b> Distribución al azar de los tratamientos en la mesa de trabajo.	48
<b>Figura 16.</b> Secado del suelo en bandejas antes de proceder a su tamizado.	49
<b>Figura 17.</b> Unificación del suelo por repetición y tratamiento.	50
<b>Figura 18.</b> Siembra.	51
<b>Figura 19.</b> Macetas tapadas con plástico para conservar la humedad en los primeros días tras la siembra.	51
<b>Figura 20.</b> Plántulas con dos hojas verdaderas, obtenidas en la primera recolección.	52
<b>Figura 21.</b> Plantas en estadio de botón floral, (segunda recolección).	53
<b>Figura 22.</b> Parte aérea de una planta madura con producción de semillas, (tercera recolección).	53
<b>Figura 23.</b> Raíces obtenidas en los diferentes tratamientos (tercera recolección).	54
<b>Figura 24.</b> Preparación de la disolución de AEDT, para extracción de cobre del suelo.	56
<b>Figura 25.</b> Preparación de las diluciones del sobrenadante para determinar el contenido de cobre disponible en los suelos.	56
<b>Figura 26.</b> Espectrofotómetro de absorción atómica utilizado para la determinación de cobre disponible en los suelos.	58
<b>Figura 27.</b> % de germinación de las semillas de <i>Brassica juncea</i> respecto al número de semillas por tratamiento.	65
<b>Figura 28.</b> Índice de germinación respecto a la arena (%) obtenido en el segundo ensayo de germinación.	66
<b>Figura 29.</b> Índice de germinación respecto al suelo control (%) obtenido en el segundo ensayo de germinación.	66
<b>Figura 30.</b> % de germinación de <i>Brassica juncea</i> tomando como control la arena, a los 3 y 7 días desde su siembra en placas Petri con los diferentes tratamientos de cobre.	67

<b>Figura 31.</b> % de germinación de <i>Brassica juncea</i> tomando como control la arena, a los 7 días desde su siembra en placas Petri con los diferentes tratamientos de cobre y % de la elongación radicular.	68
<b>Figura 32.</b> Índice de Germinación de Zucconi tomando como control la arena.	69
<b>Figura 33.</b> % de germinación de <i>Brassica juncea</i> tomando como control el suelo 0 Cu, a los 7 días desde su siembra en placas Petri con los diferentes tratamientos de cobre y % de la elongación radicular.	70
<b>Figura 34.</b> Índice de germinación de Zucconi tomando como control el suelo 0 mg Cu kg <sup>-1</sup> .	71
<b>Figura 35.</b> Índice de germinación de <i>Brassica juncea</i> con diferentes dosis de ramnolípido.	72
<b>Figura 36.</b> Efecto de la dosis de Cobre, tiempo de envejecimiento y aplicación de ramnolípido en la germinación de <i>Brassica juncea</i> .	73
<b>Figura 37.</b> % aproximado de germinación obtenido en las macetas del ensayo en invernadero.	75
<b>Figura 38.</b> Cobre disponible en los suelos de los tratamientos en placa, a tiempo 0 y tiempo 15 días.	77
<b>Figura 39.</b> Cobre disponible en las macetas una vez terminado el ensayo en invernadero.	79
<b>Figura 40.</b> Peso seco (g) de las plantas obtenidas en estadio de 2 hojas verdaderas (primera recolección).	81
<b>Figura 41.</b> Peso seco de las plantas obtenidas en el estadio de botón floral (segunda recolección).	82
<b>Figura 42.</b> Peso aéreo seco medio (g) obtenido en la tercera recolección (planta madura).	84
<b>Figura 43.</b> Peso radicular seco medio (g) obtenido en la tercera recolección (planta madura).	85
<b>Figura 44.</b> Tasa de crecimiento relativo desde el estadio de 2 hojas verdaderas hasta el estadio de botón floral (TCR1).	87

- Figura 45.** Tasa de crecimiento relativo desde el estadio de botón floral hasta el estadio de madurez (TCR2). 88
- Figura 46.** Valores medios de cobre ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) obtenidos mediante determinación por ICP óptico, en la parte aérea de las plantas en el estadio de botón floral. 89

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Problemática de la contaminación en suelos

#### 1.1.1 Contaminación causada por metales pesados

Según Fuentes Yagüe JL., (1999), el suelo contiene pequeñas cantidades de cationes pesados, algunos de ellos esenciales para la nutrición de las plantas. Cantidades excesivas de estos cationes pueden originar fitotoxicidad y una contaminación del suelo que puede durar varios años.

Este autor propuso que el contenido de metales pesados proviene de diversas fuentes:

- Aportes excesivos de estiércol de aves y porcino con porcentajes importantes de cobre y zinc contenidos en el pienso.
- Aplicaciones repetidas de lodos de depuradora y residuos sólidos urbanos.
- Algunos residuos industriales que se esparcen en el suelo.
- El plomo y otros metales pesados añadidos a los combustibles pasan a la atmósfera, ocasionando posteriormente la contaminación de los suelos próximos a las grandes vías de comunicación.
- Los pesticidas empleados antiguamente, a base de cobre, mercurio y otros metales pesados, ocasionaron una contaminación que, en ocasiones, perdura después de muchos años.

Además explica que los cationes pesados (Mn, Cu, Zn), generalmente polivalentes, son adsorbidos por el complejo de cambio con mucha energía, por lo que no son desplazables por otros cationes y no se eliminan por lixiviación, y valora que la concentración de metales pesados en el suelo no debe exceder de las siguientes cantidades en partes por millón (ppm).

Cadmio.....1-3 ppm.

Zinc.....150-300 ppm.

Cobre.....50-140 ppm.

Mercurio.....1-1.5 ppm.

Níquel.....30-75 ppm.

Plomo.....50-70 ppm.

Estas concentraciones se refieren a un pH comprendido entre 6 y 7. Para valores superiores del pH se pueden incrementar estas cifras.

**Tabla 1: Aportes máximos anuales de metales pesados para suelos de diferente capacidad de intercambio (expresados en kg/ha), (Fuentes Yagüe JL., 1999).**

<b>CIC meq/100 g</b>	<b>&lt;5</b>	<b>5-15</b>	<b>&gt;15</b>
<b>Cadmio</b>	5,5	11	22
<b>Zinc</b>	280	560	1.120
<b>Cobre</b>	140	280	560
<b>Níquel</b>	140	280	560
<b>Plomo</b>	560	1.120	2.240

## EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN

Los organismos que viven en el suelo descomponen, absorben o degradan, con mayor o menor eficacia, los contaminantes presentes. Fuentes Yagüe JL., (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, y por eso un mismo elemento químico no tiene siempre la misma disponibilidad, ya que depende de aquellas características del suelo que afectan a su concentración y a su movilidad.

También expone que la absorción de contaminantes por los organismos del suelo altera las funciones de esos organismos y, por tanto, produce un deterioro de la función depuradora del suelo. Sin embargo, la biodisponibilidad de un contaminante determinado no es la misma para los diferentes organismos, por lo que la función depuradora del suelo puede ser mantenida por aquellos organismos que no resultan afectados.

Explica que para evaluar la toxicidad de un contaminante se emplean dos procedimientos: análisis químico de suelos y plantas, que permite una evaluación cuantitativa, y ensayos con organismos de los distintos niveles de la



cadena trófica (microorganismos, lombrices, plantas), para obtener una evaluación cualitativa.

La contaminación de un suelo puede influir negativamente en su calidad y por tanto en su capacidad para sostener el crecimiento de la plantas y otros organismos. (Maqueda, 2003).

Hay que señalar que también se desarrollan diversos procesos bioquímicos que ayudan a la depuración de materiales tóxicos. Muchos son los microorganismos, en especial bacterias, que participan en estas reacciones bioquímicas. En realidad, el número de microorganismos presentes en un suelo determinado dependen de su historia, sobre todo en relación a los contaminantes que haya recibido con anterioridad. Por término medio, un suelo fértil que haya estado poco contaminado suele tener del orden de  $10^7$  a  $10^9$  microorganismos por gramo de suelo (Doménech, 1993).

Este autor clasifica la contaminación de los suelos en dos grandes tipos atendiendo al origen de la misma, endógena y exógena, según que los contaminantes provengan del mismo sistema edáfico o bien provengan del exterior:

En la contaminación endógena, el problema surge cuando alguno de los constituyentes normales del suelo está presente en una forma química no habitual que ocasione su acumulación en determinados puntos del medio, y lo haga particularmente nocivo para las especies cuyo crecimiento dependa de la composición química del suelo. En realidad, hay una estrecha relación entre la composición mineral de los horizontes superficiales del suelo y la roca subyacente a él. Esta relación depende de los distintos procesos químicos que ocurren en este medio, como son las reacciones ácido-base, oxidación-reducción, complejación, así como procesos de adsorción-desorción. En este sentido, una acción externa, ya sea provocada por el hombre o ya sea por condiciones meteorológicas anómalas, puede dar lugar a una descompensación del equilibrio existente entre dichas reacciones químicas en suelo, dando lugar a una acumulación extraña de alguna especie.

La contaminación exógena del suelo aparece cuando una sustancia está presente a concentración superior a sus niveles naturales debido a causas ajenas al suelo o la roca madre, y tiene un impacto negativo en alguno o todos los constituyentes del mismo. Un caso típico de contaminante exógeno es el petróleo o sus productos derivados, los cuales son vertidos directamente al suelo, intencionada o accidentalmente.

A nivel estatal los suelos contaminados se regulan en la Ley 22/2011, de 28 de julio, de Residuos y suelos contaminados, así como en el Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. Esta relación de actividades potencialmente contaminantes ha sido modificada por la **Orden PRA/1080/2017, de 2 de noviembre**.

En Andalucía, la Ley 7/2007, de 9 de julio, de Gestión Integrada de la Calidad Ambiental, incluye distintas disposiciones sobre suelos contaminados en el capítulo IV del Título IV.

Dicha ley ha sido desarrollada por el **Decreto 18/2015, de 27 de enero, por el que se aprueba el Reglamento que regula el régimen aplicable a los suelos contaminados** ( 287 kb), norma de referencia para la gestión de los suelos contaminados, así como a las actividades potencialmente contaminantes de los suelos, en Andalucía. (Junta de Andalucía, 1999).

### **1.1.2 Elementos potencialmente tóxicos**

De los 118 elementos conocidos por el hombre, 91 son metales, por lo que no es de extrañar que las posibilidades de contaminación metálica en el ambiente sean numerosas. Los metales son materias naturales que desde la edad de hierro han desempeñado un papel fundamental en el desarrollo de las civilizaciones. El problema surge cuando ha proliferado su uso industrial y su empleo creciente en la vida cotidiana, llegando en algunas zonas a concentraciones tóxicas, por lo que se conocen como elementos potencialmente tóxicos (EPTs).

Los EPTs son peligrosos porque no son química ni biológicamente degradables. Una vez emitidos, pueden permanecer en el ambiente indefinidamente. Así, la ingesta de plantas o animales contaminados puede provocar síntomas de intoxicación.

Se ha demostrado científicamente que los EPTs pueden causar graves problemas ambientales, y la exposición a metales pesados puede llegar a ser causa de la degradación y muerte de ecosistemas terrestres y acuáticos incluyendo daños directos en el ser humano.

Hay elementos en el suelo que son minoritarios, y ocurre, que concentraciones anormalmente altas de estos elementos se han vuelto tóxicas para los organismos. Dentro de este grupo de elementos potencialmente tóxicos son muy abundantes los denominados metales pesados.

Se considera metal pesado a aquel elemento que tiene una densidad igual o superior a  $5 \text{ g cm}^{-3}$  cuando está en forma elemental. (Breckle, 1991; Tiller, 1989). Comúnmente se extiende el uso del término a elementos de carácter metálico con número atómico superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalinotérreos). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1% y casi siempre menor del 0,01. Dentro de los elementos potencialmente tóxicos (EPTs) hay dos grupos:

- Oligoelementos o micronutrientes, que son los requeridos en pequeñas cantidades, o cantidades traza por plantas y animales, y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. Pasado cierto umbral se vuelven tóxicos. Dentro de este grupo están: As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn.
- Metales sin función biológica conocida, cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos lleva aparejadas disfunciones en el funcionamiento de sus organismos. Resultan altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos. Destacan, principalmente: Cd, Hg, Pb, Ni, Sb, Bi.

Las rocas ígneas ultrabásicas (como las peridotitas y las serpentinas) presentan los más altos contenidos en metales, seguidas de las ígneas básicas

(como los gabros y basaltos). Las menores concentraciones se encuentran en las rocas ígneas ácidas (como el granito) y en las sedimentarias (como las areniscas y las calizas).

En los suelos, los más abundantes son el Mn, Cr, Zn, Ni y Pb (1-1500 mg kg<sup>-1</sup>; el Mn puede llegar a 10000 mg kg<sup>-1</sup>). En menores concentraciones se encuentran el Co, Cu y As (0,1-250 mg kg<sup>-1</sup>) y con mínimas concentraciones el Cd y Hg (0,01-2 mg kg<sup>-1</sup>), según Bowen (1979).

### 1.1.3 Umbrales de contaminación

Según la Junta de Andalucía, 1999, para definir los umbrales de toxicidad para los distintos contaminantes, un primer paso, muy útil, es calcular los valores normales que presentan los suelos naturales, no contaminados. A partir de este fondo geoquímico se puede establecer los umbrales mínimos que pueden representar contaminación y definir los niveles de toxicidad. Estos niveles han de ser contrastados con estudios sobre las repercusiones en vegetales y animales. Para el reconocimiento de la contaminación se utilizan los "**niveles de referencia**" que conllevan sistemas de alerta, vigilancia y control. Por encima de estas guías se encuentran los "**niveles de intervención**" que obligan ya a tomar medidas correctoras. La toxicidad de un suelo debida a los metales pesados y elementos asociados es una consecuencia directa de sus concentraciones en las fases bioasimilables; es decir, la solución del suelo y las formas adsorbidas. Esta fracción asimilable se equipara a la extraída por DTPA o por AEDT y a ella se deberían referir los diferentes niveles de toxicidad. Pero las normativas prefieren evaluar la cantidad total de elemento tóxico presente.

Se supone que existe un equilibrio entre la fase soluble y la cantidad total presente (Lindsay, 1979, calcula que al menos el 10% del total se encuentra en fase soluble). Pero en esta correspondencia intervienen numerosos factores tanto del elemento tóxico en sí como de las características del propio suelo. Por ejemplo, para una misma concentración de elementos tóxicos en un suelo, la concentración de la fase asimilable será mucho más elevada para un suelo ácido que para uno neutro o alcalino.

Sería correcto indicar que la concentración en la fase asimilable es una medida directa de la peligrosidad real o presente, mientras que la concentración total es válida para evaluar la peligrosidad potencial o futura y solo representa de una manera indirecta y aproximada de la toxicidad actual de un suelo.

El nivel de referencia representa el máximo valor admisible para los suelos no contaminados. Normalmente se calcula por el percentil del 90 de los valores correspondientes a los suelos naturales, no contaminados. Indica que el 90% de los suelos presentan valores inferiores a él. Para este umbral se debe conocer el pH del suelo y el contenido total de As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, Se, Sn, Tl y Zn.

El nivel de investigación hace referencia a suelos contaminados y se proponen una serie de determinaciones para evaluar la posible toxicidad de la contaminación.

## **1.2. Riesgo ambiental. Movilidad y biodisponibilidad de los EPTs**

Es un hecho la contaminación que producen los ETPs en suelos y sedimentos en los países industrializados. En muchos casos, la presencia de dicha contaminación impone severas restricciones al uso del suelo, debido a los riesgos inherentes para la salud humana, o implica impactos medioambientales inaceptables, con graves efectos, para el funcionamiento de los ecosistemas o la calidad de las aguas (subterráneas y superficiales).

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 tienden a acumularse en la superficie del suelo quedando accesibles al consumo de las raíces de los cultivos (Baird, 1999). Las plantas cultivadas en suelos contaminados absorben en general más oligoelementos y la concentración de éstos en los tejidos vegetales está a menudo directamente relacionada con su abundancia en los suelos, y especialmente en la solución del suelo (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Gulson y col., (1996) mencionan que excesivas concentraciones de EPTs en el suelo podrían impactar en la calidad

de los alimentos, la seguridad de la producción de cultivos y la salud, ya que estos se pueden transmitir a través de la cadena alimenticia hasta los seres humanos.

### **1.2.1. Dinámica de los elementos potencialmente tóxicos**

Los EPTs incorporados al suelo pueden seguir cuatro diferentes vías:

- Pueden quedar retenidos en el suelo, ya sea disueltos en la solución del suelo o bien fijados por procesos de adsorción, complejación y precipitación.
- Pueden ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a la cadena trófica.
- Pueden pasar a la atmósfera por volatilización.
- Pueden movilizarse a las aguas superficiales o subterráneas.

### **1.2.2. Factores del suelo que afectan a la movilidad de los elementos potencialmente tóxicos**

El efecto tóxico que va a producir un agente contaminante en el suelo va a depender de una serie de características edáficas:

- pH.

Es un factor esencial. La mayoría de los metales tienden a estar más disponibles a pH ácido, excepto As, Mo, Se y Cr, los cuales tienden a estar más disponibles a pH alcalino. En general, en medios de pH moderadamente alto se produce la precipitación del metal como hidróxido. Sin embargo, en medios muy alcalinos, pueden nuevamente pasar a la solución como hidroxicomplejos.

- Textura.

Los suelos arcillosos tienden a adsorber los EPTs, debido a sus mayores capacidades de cambio que los suelos arenosos, en los que, al carecer de esa capacidad de fijación, los metales pueden pasar más rápidamente a capas inferiores del suelo y contaminar los niveles freáticos.

- Mineralogía

Cada especie mineral del suelo 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 solubilizan 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 responsable de que el elemento se encuentre en uno u otro estado de oxidación, con distintas propiedades en cada caso. Por ejemplo, en condiciones reductoras el  $\text{Fe}^{3+}$  se transforma en  $\text{Fe}^{2+}$ , siendo generalmente los iones reducidos más solubles.

Las condiciones redox pueden afectar también a metales que están asociados o adsorbidos a hidróxidos de Fe y Mn.

- Salinidad.

El aumento en salinidad puede incrementar la movilidad de metales pesados por dos mecanismos. Primeramente los cationes asociados con las sales (Na, K) pueden reemplazar a los metales en lugares de adsorción. En segundo lugar los aniones cloruro pueden formar complejos solubles estables con algunos metales tales como Cd, Zn y Hg. Tienden a dar suelos de pH básicos.

En definitiva, según la forma en la que se encuentre el metal retenido en el suelo, así será la disponibilidad relativa por las plantas y por tanto la incorporación en los organismos.

Otro factor a tener en cuenta es el tiempo, ya que la movilidad disminuye con el transcurso del tiempo, porque los metales se van fijando en las posiciones de adsorción más fuertes. Este proceso se conoce como atenuación natural de la disponibilidad de los metales o envejecimiento.

En general se considera que la movilidad de los EPTs es muy baja, quedando acumulados en los primeros centímetros del suelo, siendo lixiviados a los horizontes inferiores en pequeñas cantidades.

### **1.2.3. 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).

Las plantas son indicadores muy importantes de la fitodisponibilidad y biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo (Basta y Gradwohl, 2000); el estudio de la absorción de los mismos por parte de las plantas es muy importante



para poder establecer las rutas de exposición de los contaminantes presentes en el suelo, y aunque en la actualidad, existen numerosos procedimientos (Hund-Rinke y col., 2003) no existe una metodología estándar universalmente aceptada para realizar estos ensayos.

### **1.3. Recuperación de los suelos contaminados por EPTs**

Los metales no son sustancias degradables en el suelo, las tecnologías para el tratamiento de estos suelos deben basarse, en la extracción, o en la contención/ inmovilización de los contaminantes en la matriz edáfica.

Por esta razón diversas investigaciones se han enfocado en desarrollar técnicas que exploten de forma conjunta los procesos biológicos dependientes de plantas y microorganismos, así como procesos químicos, como el uso de agentes quelantes o secuestrantes para reducir el uso inherente asociado con los suelos contaminados con metales. (Maqueda, 2003).

#### **1.3.1. Fitorrecuperación o fitorremediación**

Es el uso de plantas para limpiar ambientes contaminados. Aunque se encuentra en desarrollo, constituye una estrategia muy interesante, debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos (PQB, 2003).

En las últimas décadas del siglo XX surgieron tecnologías basadas en el empleo de organismos vivos para descontaminar suelos o emplazamientos contaminados y recuperar los ecosistemas afectados. Cuando estas tecnologías se basan en el uso de plantas, globalmente reciben el nombre de fitorrecuperación.

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

la limpieza 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).

El potencial de las plantas para extraer, contener o inmovilizar los metales presentes en suelos/sedimentos contaminados se muestra en la actualidad como una alternativa ambientalmente atractiva frente a las prácticas más habituales basadas en la excavación y el depósito en vertederos, o el tratamiento físico-químico. Las plantas actúan a través de dos fenómenos distintos:

1) estabilización/fijación de los contaminantes en el suelo/sedimento.

2) absorción de los mismos por las raíces y su acumulación en la parte aérea de las plantas, lo que conlleva la descontaminación gradual de los suelos y sedimentos.

El gran interés despertado por las plantas hiperacumuladoras, especialmente para recuperar un ambiente contaminado, obliga también a resolver problemas relativos a otras disciplinas. Brooks, (1998) hace hincapié en ello y destaca la importancia para el avance de la fitorrecuperación, la integración de diversos campos científicos como botánica, fisiología, agronomía, química y genética.

Estas fitotecnologías se pueden aplicar tanto a contaminantes orgánicos como inorgánicos, presentes en sustratos sólidos, líquidos o en el aire. Se distinguen:

- **Fitoextracción**: uso de plantas acumuladoras de elementos tóxicos 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 en el entorno, mejorando las propiedades físicas y químicas del medio. Es una técnica de contención.

- **Fitovolatilización**: uso de plantas para eliminar los contaminantes del suelo mediante su volatilización.

- **Fitodegradación:** uso de plantas y microorganismos asociados para degradar contaminantes orgánicos.

La fitorrecuperación, por sí misma, muestra una serie de limitaciones, tales como:

- el contaminante tiene que estar cercano a la rizosfera.
- las condiciones físicas y químicas del suelo (tales como el pH, la salinidad y el contenido de nutrientes), que pueden limitar el crecimiento vegetal.
- la concentración del contaminante (que debe estar dentro de los límites tolerables para la planta).
- riesgos de lixiviación de los contaminantes más móviles.
- accesibilidad a la zona contaminada.
- El proceso se limita a la profundidad de penetración de las raíces o aguas poco profundas.
- Los tiempos del proceso pueden ser prolongados.

Por lo tanto, estas tecnologías son especialmente útiles para su aplicación en grandes superficies, con niveles de contaminación bajo, y deben considerarse procesos de recuperación a largo plazo.

Entre las ventajas que presentan estas técnicas, destaca:

- Se pueden realizar in situ, es decir sin necesidad de transportar el suelo o sustrato contaminado.
- Las plantas pueden ser utilizadas como entidades extractoras de bajo costo económico para depurar suelos y aguas contaminadas.
- Permiten su aplicación, tanto a suelos como a aguas.
- Sólo requieren prácticas agronómicas convencionales.

- Actúan positivamente sobre el suelo, mejorando sus propiedades físicas y químicas, y son medioambientalmente aceptables, debido a que se basan en la formación de una cubierta vegetal.
- Algunos procesos degradativos ocurren en forma más rápida con plantas que con microorganismos.

### 1.3.2. Fitoextracción inducida por agentes quelantes

.Con objeto de mejorar el proceso de fitoextracción, se puede facilitar la absorción de metales por las plantas mediante la aplicación de agentes quelantes. Estas sustancias ayudan a solubilizar los metales en el suelo y a translocarlos desde las raíces hasta la parte aérea de las plantas.

De acuerdo con lo anterior, existen dos estrategias básicas:

- **Fitoextracción continua**: se basa en el cultivo de especies hiperacumuladoras. La absorción de metales se produce durante toda la fase de crecimiento de la planta, presentando un comportamiento casi lineal hasta alcanzar el máximo crecimiento del cultivo, momento en el que debe producirse la cosecha.

- **Fitoextracción asistida o inducida**: consiste en el crecimiento de cultivos de elevada biomasa que son inducidos a acumular altas concentraciones de metales mediante la aplicación de enmiendas químicas al suelo, como los agentes quelantes.

La aplicación de agentes quelantes al suelo en la fitoextracción inducida se basa en que son capaces de formar complejos muy estables con los metales, aumentando así su solubilidad. De esta manera, son más fácilmente absorbidos por las plantas.

Según su poder complejante, los agentes se clasifican 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).

Cuanto más fuerte sea un quelatante, más estable es el complejo, más eficiencia de aplicación y mejor absorción a través de la cutícula.

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 ensayo de extracción de cobre con AEDT realizado por Carvajal S., (2016), se obtuvo que la disponibilidad de cobre en el suelo presentó una correlación significativa con la cantidad de cobre extraída por las plantas y se comprobó que en un suelo con mayor cantidad de arcillas el cobre quedaba más fuertemente retenido.

Sin embargo, el AEDT presenta una baja degradabilidad y su gran persistencia en el ambiente puede suponer la introducción de un contaminante adicional al medio. La excesiva solubilización de metales producida por el AEDT puede implicar un riesgo de lixiviación a las aguas subterráneas y además puede resultar tóxico para las plantas y los microorganismos, incluso a bajas concentraciones (Evangelou y col., 2006).

Por ello se han propuesto otros compuestos sustitutos del AEDT de mayor biodegradabilidad aunque de menor capacidad quelante, lo que puede limitar su utilización en la fitoextracción inducida. El éxito de esta técnica depende de alcanzar un compromiso entre la rápida degradación de estas sustancias en el medio y su capacidad para movilizar los metales de forma efectiva.

#### **1.4. Biosurfactantes**

Son compuestos naturales producidos principalmente por ciertos hongos y bacterias. Estas moléculas tienen propiedades emulsificantes y dispersantes. Los microorganismos sintetizan biosurfactantes cuando la fuente de carbono es poco soluble o insoluble en agua, de tal manera que sintetizan moléculas con

propiedades tensoactivas que favorezcan la biodegradación de los sustratos insolubles (Supaphol y col., 2011).

#### **1.4.1. Composición y función de los biosurfactantes**

Los biosurfactantes microbianos (BS) son moléculas anfipáticas compuestas por dos regiones, la región hidrofílica o polar compuesta de un carbohidrato (ramnosa, trehalosa, manosa) o un aminoácido y la región hidrofóbica o no polar constituida de una cadena hidrocarbonada de longitud variable (ácidos grasos saturados e insaturados); pueden ser aniónicos, catiónicos, no iónicos y switeriónicos (Desai & Banat, 1997). Los BS están agrupados en aquellos que son de alto peso molecular cuya composición bioquímica se basa en lipopolisacáridos y lipoproteínas y los que son de bajo peso molecular normalmente su composición son ácidos grasos, glucolípidos y lipopéptidos (Banat y col., 2000; Banat y col., 2010).

Los BS tienen propiedades emulsificantes, dispersantes, impermeabilizantes, suavizantes, lubricantes y humectantes. Los microorganismos producen BS para reducir la tensión superficial (TS) e interfacial entre fases líquido/líquido, gas/líquido, o sólido/líquido. Los BS producidos por *P. aeruginosa* y *R. erythropolis* disminuyen la TS a 25 y 36 mN/m respectivamente.

Los BS favorecen la biodisponibilidad de los contaminantes al establecer un equilibrio de desorción-solubilización, desplazan preferentemente el equilibrio hacia la fase acuosa y permiten que se lleven a cabo los diferentes procesos de transporte (difusivo y convectivo) y biodegradación del contaminante (Rosenberg & Ron, 1999; Kitamoto y col., 2002).

#### **1.4.2. Recuperación mediante biosurfactantes de suelos contaminados por EPTs**

La biorremediación se ha visto favorecida con la presencia de surfactantes y/o biosurfactantes, donde la biodisponibilidad se ha considerado como uno de

los factores más benéficos para la biorremediación y la posible inhibición y/o toxicidad.

La mayoría de los estudios publicados demuestran que la desorción y la movilidad del contaminante hidrófobo en el suelo pueden ser mejorados con la adición de surfactantes. Según Volkering y col., (1998) los mejores parámetros para la selección de un surfactante para la remediación biológica, es la tensión interfacial y la desorción del contaminante.

Los biosurfactantes más estudiados en biorremediación son los ramnolípidos (RL), sintetizados por *Pseudomona aeruginosa*, la surfactina (Olivera y col., 2000) los lipopéptidos (Tecon y Van der Meer, 2009) y los soforolípidos (Schippers, 2000). En estudios a escala de laboratorio Yin y col., (2008) demostraron que el uso de ramnolípidos resultaba más eficiente para la remediación de efluentes contaminados con petróleo que los surfactantes comerciales.

En ensayos tipo batch la adicción de disoluciones de ramnolípidos JBR-425 a un suelo contaminado con  $1000 \text{ mg Cu kg}^{-1}$  de suelo, en un estudio de fitoextracción, aumentó la extractabilidad de Cu del suelo, siendo la concentración de  $10000 \text{ mg RL kg}^{-1}$  de suelo la más efectiva (Carvajal S., 2016).

## **1.5 Sulfato de cobre**

### **1.5.1 Descripción de la molécula de sulfato de cobre**

Según Collings (1969), el sulfato de cobre en estado natural se presenta como un mineral llamado calcantita, usado como fertilizante y fungicida para árboles frutales.

El sulfato de cobre II es un compuesto químico derivado del cobre que forma cristales azules, solubles en agua y metanol y ligeramente solubles en alcohol y glicerina. Su forma anhídrica ( $\text{CuSO}_4$ ) es un polvo verde o gris-blanco pálido, mientras que la forma hidratada ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) es azul brillante.

### 1.5.2 Propiedades químicas del cobre

**Tabla 2: propiedades químicas del cobre (Wright J. 2003).**

Número atómico	29
Valencia	1,2
Estado de oxidación	+2
Electronegatividad	1,9
Radio covalente (Å)	1,38
Radio iónico (Å)	0,69
Radio atómico (Å)	1,28
Configuración electrónica	[Ar]3d <sup>10</sup> 4s <sup>1</sup>
Primer potencial de ionización (eV)	7,77
Masa atómica (g/mol)	63,54
Densidad (g/ml)	8,96
Punto de ebullición (°C)	2595
Punto de fusión (°C)	1083

Elemento químico, de símbolo Cu, con número atómico 29; uno de los metales de transición e importante metal no ferroso. Su utilidad se debe a la combinación de sus propiedades químicas, físicas y mecánicas, así como a sus propiedades eléctricas y su abundancia. El cobre fue uno de los primeros metales usados por los humanos.

El cobre es el primer elemento del subgrupo 11 de la tabla periódica y también incluye los otros metales de acuñación, plata y oro. Su átomo tiene la estructura electrónica  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4s^1$ . El bajo potencial de ionización del electrón  $4s^1$  da por resultado una remoción fácil del mismo para obtener cobre(I), o ion cuproso,  $Cu^+$ , y el cobre(II), o ion cúprico,  $Cu^{2+}$ , se forma sin dificultad por remoción de un electrón de la capa  $3d$ . El peso atómico del cobre es 63.546. tiene dos isótopos naturales estables  $^{63}Cu$  y  $^{65}Cu$ . También se conocen nueve isótopos inestables (radiactivos). El cobre se caracteriza por su baja actividad química. Se combina químicamente en alguno de sus posibles estados de valencia. La valencia más común es la de 2+ (cúprico), pero 1+ (cuproso) es



también frecuente; la valencia 3+ ocurre sólo en unos cuantos compuestos inestables.

De los cientos de compuestos de cobre, sólo unos cuantos son fabricados de manera industrial en gran escala. El más importante es el sulfato de cobre(II) pentahidratado o azul de vitriolo,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

### **1.5.3 Uso del sulfato de cobre en la agricultura**

El caldo bordelés o sulfato cupro-cálcico es considerado como el primer producto fitosanitario, desarrollado para controlar el mildiu de la vid a finales del siglo XIX. Desde entonces y hasta nuestros días, el cobre se ha venido usando ampliamente para controlar múltiples enfermedades causadas por hongos y por bacterias.

Su uso está ampliamente extendido en cultivos como olivo, viña, patata, árboles frutales y cultivos hortícolas. A pesar de que esté incluido como sustancia apta para agricultura ecológica, las autoridades europeas consideran que debe limitarse su uso para evitar riesgos a los operarios y al medio ambiente.

El efecto fungicida y bactericida del cobre se debe a que los iones  $\text{Cu}^{2+}$  se acumulan en el interior de las células del hongo o en las bacterias causando el mal funcionamiento de múltiples enzimas imprescindibles para su desarrollo.

Sólo una muy pequeña proporción del cobre aplicado (menos del 0.01%) puede ser liberado en forma de  $\text{Cu}^{2+}$ , pasar a la superficie foliar y ser absorbido por los hongos y las bacterias.

Para conseguir una mayor eficacia es importante que dicha proporción, o índice de biodisponibilidad, sea significativamente mayor.

Los hidróxidos de cobre tienen una estructura cristalina muy ramificada, que recuerda la forma de un copo de nieve. De esta forma hay mucha más superficie externa con iones de  $\text{Cu}^{2+}$  que pueden pasar fácilmente a la disolución acuosa presente en la superficie foliar y de ahí a las células del hongo.

El tamaño de partícula es también una forma de incrementar la superficie total, pero un tamaño excesivamente reducido puede hacer que no sea bien retenido por la hoja y pueda ser fácilmente lavado por la lluvia.

La Unión Europea está preocupada por los altos niveles de cobre usados en agricultura, ya que suponen graves problemas de acumulación en suelos y en aguas subterráneas.

El cobre es uno de los más importantes elementos para las plantas y los animales. El exceso de Cu puede producir deficiencia de Zn y viceversa. Las formas asimilables por las plantas son el  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$  para los suelos ácidos y como  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  en los neutros y alcalinos. El Cu es fuertemente fijado en los suelos y por tanto es un metal muy poco móvil (Baker y Senft, 1995) y muy poco sensible a los cambios de pH. La materia orgánica y los óxidos de Fe y Mn son los parámetros más importantes para la adsorción del Cu, jugando las arcillas y la capacidad de cambio acciones mucho menos decisivas. Los ácidos húmicos y fúlvicos se unen fuertemente al  $\text{Cu}^{2+}$  formando quelatos solubles. Son muy numerosos los minerales que por alteración liberan Cu, como son los sulfuros, sulfatos, sulfosales y carbonatos; principalmente: calcopirita  $\text{CuFeS}_2$ , cuprita  $\text{Cu}_2\text{O}$ , malaquita  $\text{Cu}_2(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2$  y azurita  $\text{Cu}_2(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_2$ .

En los suelos podemos encontrar el Cu como: iones solubles, complejos inorgánicos solubles, complejos orgánicos solubles, formando complejos orgánicos estables, adsorbido por los óxidos de Mn, Fe y Al, adsorbido por la materia orgánica y por las arcillas, y formando parte de las estructuras de los minerales. En general el Cu se encuentra unido al complejo de cambio más que formando minerales. Los suelos con altos contenidos en materia orgánica toleran altas concentraciones de Cu. En la corteza terrestre se presenta con una concentración media de 45-50 mg/kg (Alloway, 1995; Baize, 1997). En cuanto a las rocas, como ocurre con muchos de los metales pesados, los contenidos más bajos se presentan en las rocas ígneas ácidas y en las sedimentarias tipo calizas y areniscas, con valores desde los 5,5 mg/kg de las calizas, hasta los 30 mg/kg. Los contenidos de las rocas ígneas básicas, como los basaltos, los valores se suben hasta los 90 mg/kg de media (Baker y Senft, 1995). En los suelos naturales los valores más frecuentes son de 10-30 mg/kg. Los niveles de

referencia se sitúan entre 17-100 mg/kg y los de intervención oscilan entre 100-800, quedando los umbrales para los suelos agrícolas reducidos a 50 mg/kg para los suelos ácidos y de 100 para los neutros y alcalinos.

## 1.6 *Brassica juncea*

### 1.6.1 Identificación y descripción botánica de la planta

Se usa el nombre de mostaza parda para contrastar a esta especie con la mostaza blanca o amarilla (*Sinapsis alba*) y la mostaza negra (*Brassica nigra*).

Se parece al conocido nabo (*Brassica rapa*), pero tiene las hojas superiores con pecíolos. De otras especies de *Brassica* se puede distinguir por tener pétalos de más de 6 mm de largo y sólo 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 pegadas al raquis y de 3 o más cm de largo (diferencia a la mostaza negra, *Brassica nigra*).

Se puede confundir especialmente con las demás especies de *Brassica*. Posiblemente también se puede confundir con *Diplotaxis muralis* y con las especies de *Sisymbrium*.

#### Descripción técnica

Descripción basada en Marzocca, (1976) y Rollins, (1993).

**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 ovalado; 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 es 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, color café oscuro, con dibujo reticulado puntiforme.

**Plántulas:** Cotiledones con duplicados (Muenscher, 1955).

**Raíz:** Napiforme.

**Características especiales:** Huele a mostaza al estrujarse.

### 1.6.2 Hábitat

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.

### 1.6.3 Biología y ecología

**Propagación, dispersión y germinación:** Propagación por semillas.

**Ciclo de vida:** Planta anual.

**Fenología:** En Argentina florece en primavera, pero en México se ha observado también en verano. En España (clima mediterráneo) se dan las condiciones meteorológicas adecuadas para realizar su siembra en los meses de septiembre y octubre.

#### **1.6.4 Usos de *Brassica juncea* como planta fitoextractora.**

En estudios anteriores realizados con plantas de *Brassica juncea* en cámara de cultivo (Carvajal S., 2016), se obtuvo que la contaminación con Cu en los suelos tuvo efectos significativos en la producción de biomasa por parte de las plantas. Con dosis de 1000 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo, no se pudieron usar para los ensayos de fitoextracción de Cu debido a que la reducción de biomasa que produjo esta contaminación no permitió realizar los análisis. La presencia de Cu en el suelo provocó un incremento en el Cu absorbido por las plantas, sin embargo a dosis por encima de 500 mg Cu kg<sup>-1</sup> disminuyeron su capacidad de fitoextracción.

En un estudio de fitorremediación con *Brassica juncea*, llevado a cabo en Aznalcollar (Sevilla) sobre un suelo contaminado por un vertido de lodos ácidos de minería, con un contenido en cobre de 202 mg kg<sup>-1</sup>, Bernal y col., (2007) encontraron concentraciones mayores de cobre en la parte aérea de plantas que en raíz y tallo. Reportan valores medios de cobre en hojas de unos 37 mg kg<sup>-1</sup>, oscilando entre 20 y 60 mg kg<sup>-1</sup>, mientras que en raíces y tallos los valores medios son de unos 10 mg kg<sup>-1</sup>, no alcanzan en ningún caso los 20 mg kg<sup>-1</sup>. El ensayo de fitorremediación se combinó con la adición de materia orgánica (en forma de estiércol y compost) y enmiendas calizas para regular el pH. Los valores de extracción de cobre correspondieron a zonas con pH ácido debido a la oxidación lenta de los sulfuros polimetálicos. La adición de materia orgánica en forma de estiércol de vaca no influyó en la extracción de cobre, pero sí provocó una mayor biomasa, posiblemente debido al aporte de nutrientes, aunque como desventaja señalan que hizo que aumentara la aparición de plantas de otras especies debido a la presencia de semillas en el estiércol. Estos autores estimaron la eficacia de la extracción de cobre con *Brassica juncea*, para los 20 cm superficiales del suelo, considerando una producción de biomasa

máxima de 3.000 kg ha<sup>-1</sup>, una extracción de unos 150 mg kg<sup>-1</sup>, con el fin de reducir la contaminación del suelo a los niveles exigidos por la legislación, con una extracción de 3,1 g ha<sup>-1</sup>, en cada cultivo, serían necesarios 48.000 cultivos consecutivos para descontaminar el suelo.

Aunque no ven eficaz la fitorremediación con *Brassica juncea*, estos autores proponen que esta planta puede resultar útil para detectar cambios en la biodisponibilidad de Cu, Pb, y Zn en el suelo.

### 1.7 Ensayos de germinación

Desde el punto de vista agronómico, se considera que una semilla ha germinado cuando a partir de ella se origina una planta adulta capaz de alcanzar la fase reproductora; es decir, capaz de producir nuevas semillas (Durán y Pérez, 1984). La *International Seed Testing Association* (ISTA), asociación internacional de entidades relacionadas con el análisis de semillas, considera el proceso de germinación de una semilla como el establecimiento de un estado metabólicamente activo, manifestado fisiológicamente por la división celular y por la diferenciación (ISTA, 2003). La primera expresión de este proceso es la emergencia de la radícula (Rodríguez-Quilón y Adam, 2008).

Los ensayos de germinación, según Rodríguez-Quilón y Adam (2008) tienen como objetivo asegurar que la germinación, nascencia y evolución de la plántula sean correctas. Estos test de germinación realizados en laboratorio ofrecen una primera información respecto a la calidad de las semillas. Sin embargo, hay que señalar que, en muchos casos, los resultados que se obtienen en condiciones controladas de laboratorio difieren de los obtenidos en el campo.

El test de germinación estándar recoge el porcentaje de plántulas normales obtenido tras un análisis germinación. 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 período de tiempo, durante el cual se realizan conteos de germinación, observando el número de semillas que

han germinado. Se pueden evaluar también las plántulas obtenidas, identificando el número de plántulas normales y anormales.

Los ensayos de germinación pueden realizarse utilizando innumerables métodos y condiciones. Uno de los procedimientos más habituales a la hora de realizar un ensayo de germinación es colocar las semillas en el interior de una caja de vidrio o plástico transparente, sobre un soporte que permita una rápida y abundante retención de agua, como por ejemplo papel de filtro, arena o medios gelificados a base de agar. Se suele considerar que una semilla ha germinado cuando la radícula alcanza una longitud mayor de 3 mm (ISTA, 2005).

Para controlar las condiciones de humedad, temperatura e iluminación durante la incubación, las cajas de germinación se introducen en germinadores termostatzados, que permiten regular estos parámetros según las exigencias específicas de cada especie. Las temperaturas más corrientemente utilizadas oscilan entre 10 y 35 °C. Cuando se utilizan temperaturas alternas dentro del ciclo diario, se recomienda que la oscilación térmica no sea inferior a 10 °C, coincidiendo la temperatura más elevada con el período de luz en el caso de utilizar cámaras con iluminación.

La ISTA establece una serie de recomendaciones para cada especie sobre el sustrato a utilizar, la temperatura de germinación, los días de conteo y, en algunos casos, otras recomendaciones de tratamientos específicos para favorecer la germinación.

### **Curvas e índices de germinación:**

Frente a la sencillez que supone colocar a germinar un lote de semillas, la expresión de los resultados que se obtienen es mucho más complicada. Tras un ensayo de germinación, el analista puede encontrar semillas que germinan perfectamente, dando lugar a plántulas normales, otras que al desarrollarse presentan alguna anomalía y aquellas que al finalizar el ensayo no han sido capaces de germinar.

La representación del número total o más frecuentemente del porcentaje de semillas germinadas, frente al tiempo transcurrido desde la siembra, constituye una curva de germinación. Estas proporcionan toda la información

que es posible solicitar una vez realizado un ensayo de germinación. Sin embargo, para expresar los resultados obtenidos lo más frecuente es recurrir al cálculo de índices de germinación, que nos permiten estimar la calidad del lote y comparar cuantitativamente diferentes lotes de semillas o muestras sometidas a diferentes tratamientos.

Zucconi, (1981)., propuso una fórmula para calcular el índice de germinación (IG) cuantificando el número de semillas germinadas y la longitud alcanzada por las raíces por placa. Los resultados se obtienen al multiplicar el porcentaje de germinación (G) y el porcentaje de crecimiento de las raíces (L), ambos respecto al control, y dividir por cien:  $IG (\%) = (\%G \times \%L) / 100$ . Este método ha sido adoptado oficialmente para detectar toxicidad en sustratos y evalúa los efectos tóxicos sobre los estados iniciales del desarrollo vegetal (germinación y elongación radicular), siendo más recomendables que los ensayos de larga duración. Estos últimos, tienen mayores requerimientos de instalaciones y material. (Zucconi et al, 1985).

De cualquier modo, como indica Murillo y col., (1995), ambos tipos de test no tienen por qué ser excluyentes: los ensayos cortos de maceta pueden aportar información complementaria a la que proporcionan los test de germinación y/o elongación radicular.



## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

Este trabajo tiene como **objetivo principal** la posible recuperación de un suelo agrícola, contaminado artificialmente con sulfato de cobre, mediante la fitoextracción llevada a cabo por plantas de mostaza parda (*Brassica juncea*), y estudiar el efecto de la aplicación de un biosurfactante biodegradable (JBR-425).

Los **objetivos específicos** que se desarrollarán son los siguientes:

1. Estudiar la germinación de *Brassica juncea* en placa Petri, en suelo contaminado con diferentes dosis de cobre.
2. Estudiar la germinación de *Brassica juncea* en placa Petri, en disoluciones con diferentes dosis de ramnolípido.
3. Estudiar la germinación de *Brassica juncea* en placa Petri, en suelo contaminado con diferentes dosis de cobre y aplicación de ramnolípido conjuntamente.
4. Estudiar la germinación de *Brassica juncea* en placa Petri, en suelo contaminado y envejecido.
5. Estudiar la germinación de *Brassica juncea* en macetas dispuestas al azar en invernadero, en suelo agrícola contaminado con diferentes dosis de cobre y aplicación de ramnolípido.
6. Evaluar la producción de biomasa y calcular la tasa de crecimiento relativo (TCR) de *Brassica juncea*, en diferentes estadios de su desarrollo, tanto en parte aérea como radicular, en ensayo en macetas en invernadero, en suelo contaminado con diferentes dosis de cobre y presencia de ramnolípido.
7. Determinar el cobre extraído por las plantas de *Brassica juncea* del ensayo en macetas, tanto en el suelo control como con presencia de cobre y de ramnolípido.
8. Determinar el cobre biodisponible en el suelo utilizado con los diferentes tratamientos, una vez finalizados los ensayos, tanto en placas Petri como en macetas.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 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*), por ser considerada una planta con poder acumulador de diversos elementos potencialmente tóxicos (EPTs), entre ellos el Cobre. Es una planta muy utilizada en ensayos de fitoextracción, aunque presenta un limitado ritmo de crecimiento y producción de biomasa.

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

##### 3.1.2 Suelo

Se utiliza un suelo de la finca 'Bienvenida' de Constantina, municipio de la provincia de Sevilla situada en SE-7103 (Constantina-Puebla de los infantes) cuyas coordenadas geográficas son (37°51',N 5°36'W).

En la tabla 3 se presentan algunos parámetros fisicoquímicos de este suelo, caracterizado en 2016 por Carvajal S.

**Tabla 3: Caracterización del suelo utilizado. (Carvajal S., 2016).**

Textura	pH	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (%)	M.O. (%)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)
Franco	5,50	1,1	1,91	50,4	39,4	10,2

##### 3.1.3 Reactivos

###### 3.1.3.1 Sulfato de cobre

El sulfato de cobre es un compuesto químico constituido por un ion cobre (Cu<sup>2+</sup>) (58.93 g/mol) y un ion sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) (96 g/mol), que además está pentahidratado (5 moléculas de H<sub>2</sub>O) (90 g/mol), por tanto la fórmula molecular es CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O.

Se usa un sulfato de cobre pentahidratado de la marca ParReac AppliChem con un peso molecular de 249.68 g/mol.

### 3.1.3.2 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).

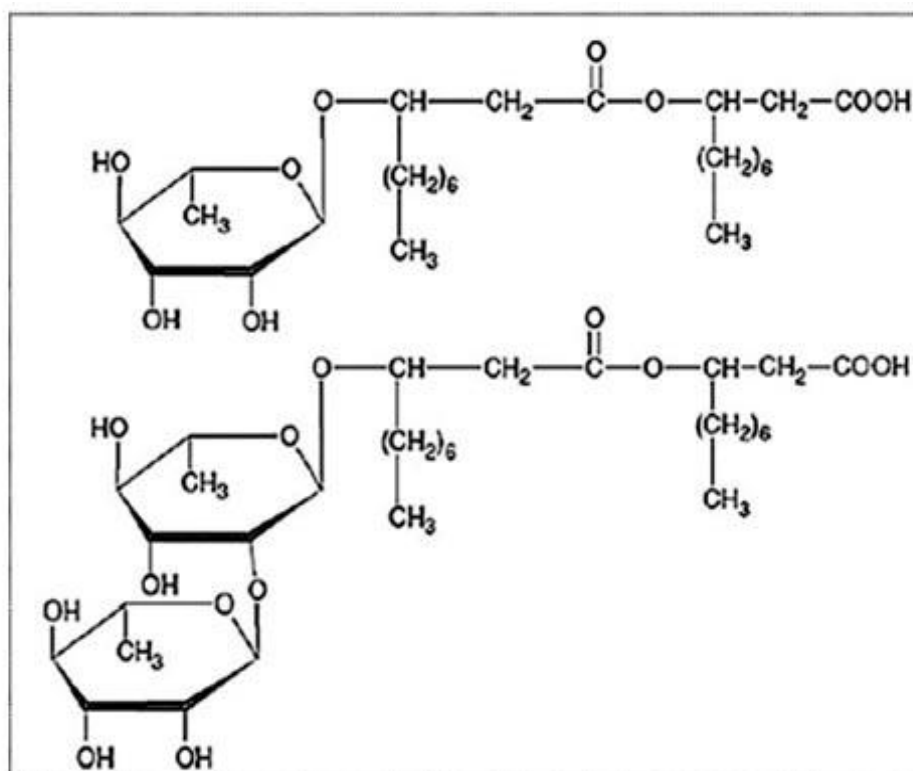


Figura 1: Representación molecular de mono-ramnolípido (parte superior) y di-ramnolípido (parte inferior) producidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Fuente: (Lovaglio y col., 2011).

### 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 cm<sup>3</sup>, con una capacidad de 500 gr 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

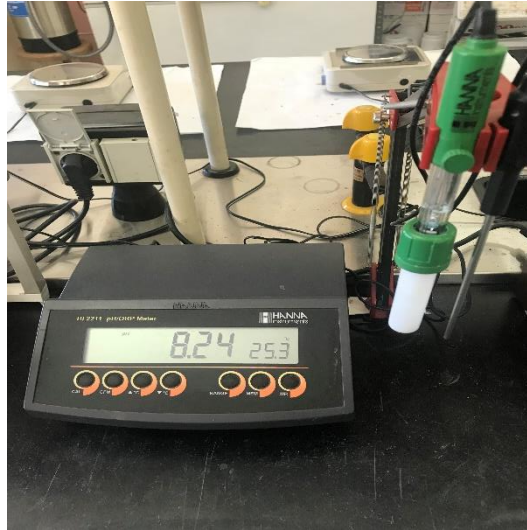
### 3.2.1 Medidas previas de pH y conductividad

- Se realiza la medida del **pH en pasta saturada** del suelo control y suelo con diversos tratamientos. Se utiliza un pHmetro de la marca Hanna.

1. Se coloca en un vaso de precipitados una cantidad de muestra de suelo de 25 g. secada al aire y tamizada a 2 mm, cuidando de molturar las estructuras.

2. Se añade, poco a poco, agua destilada hasta que se moje toda la masa, removiendo con una varilla hasta conseguir una pasta consistente y sin exceso de agua (la varilla se podrá hundir en la pasta sin tumbarse).

3. Se introduce el electrodo del pHmetro en la pasta saturada y se procede a la lectura, teniendo en cuenta la corrección de la temperatura de la pasta y una previa calibración del aparato.



**Figura 3: pHímetro utilizado para las medidas de pH en pasta saturada.**

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

1. Se colocan 20 g de tierra seca al aire y tamizada 2 mm en un vaso de 100 ml, añadiendo 50 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 pHmetro en la disolución sobrenadante, dejando transcurrir aproximadamente un minuto para tomar el resultado o hasta que se estabilice la lectura.



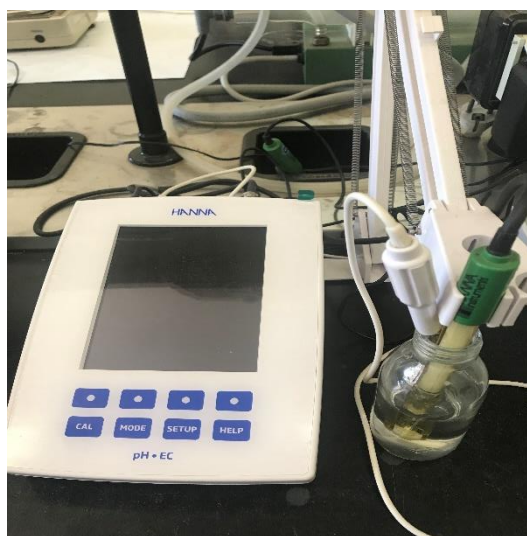


**Figura 4: Suspensiones suelo:agua (1:2,5) para la medida de pH en disolución acuosa.**

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

1. A las suspensiones suelo:agua para las medidas de pH se les añade 50 ml de agua destilada, en total quedan 100 ml 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 Hanna. (Métodos oficiales de análisis. Tomo 3. Ed Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid 1986).



**Figura 5: Conductímetro utilizado para las medidas de conductividad eléctrica.**

### 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* que se iban a utilizar para el experimento. Para ello se pusieron 20 semillas en la placa con papel humedecido con agua destilada y se mantuvieron durante 7 días en cámara de germinación a 20°C, tiempo después del cual, se hace recuento de las semillas germinadas para tener un primer resultado de la viabilidad de las semillas que se usarán en los próximos ensayos.



**Figura 6: Germinación en placa (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 y el suelo objeto del estudio en este trabajo. En este segundo ensayo se utilizan cinco placas en las que se añaden 25 gramos de suelo tamizado a 2mm a cada una, con los siguientes tratamientos: arena, suelo control, suelo + 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo, suelo + 500 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo y suelo + 750 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo, y se ponen 10 semillas por placa anotando como en el caso anterior las semillas germinadas en cada placa y sus longitudes radiculares, 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:

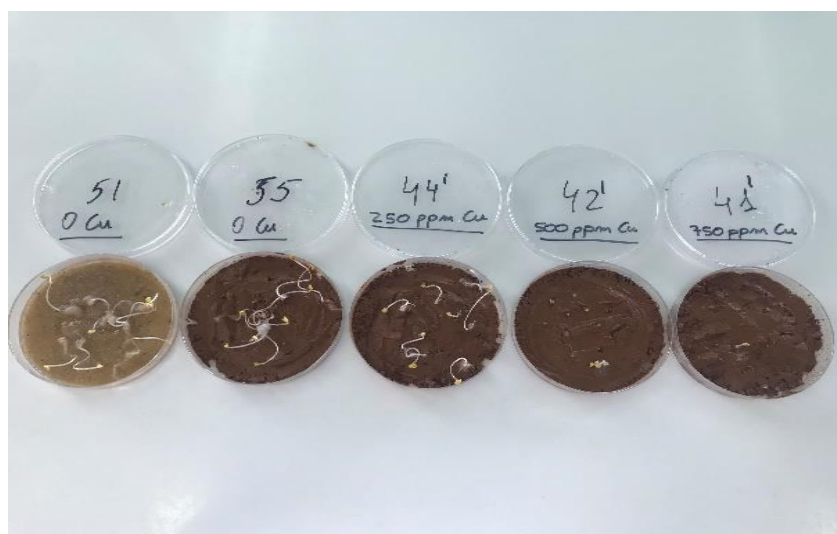
$$\text{Índice de germinación (IG)} = (G/G_0) \times (L/L_0) \times 100$$

Siendo: G: Semillas germinadas sobre el sustrato estudiado.

G<sub>0</sub>: Semillas germinadas en el control.

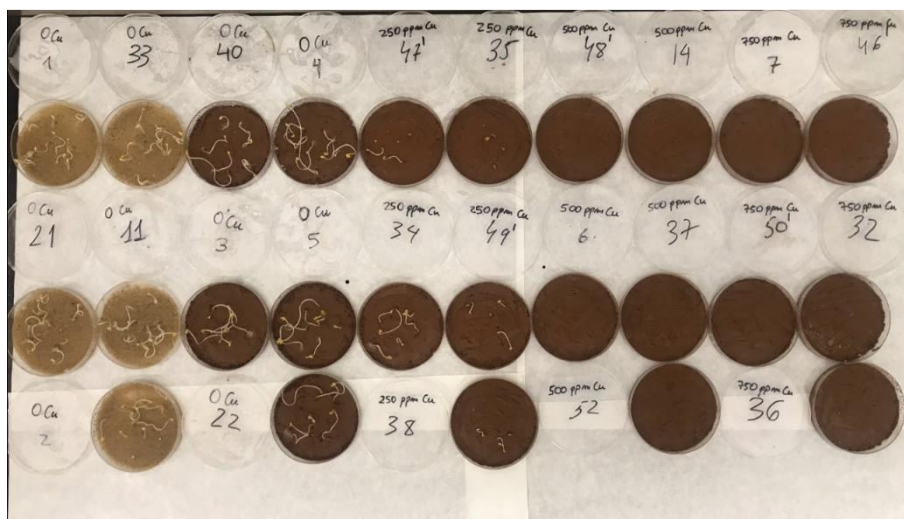
L: Longitud total de raíces en el sustrato estudiado.

L<sub>0</sub>: Longitud total de raíces en el control.



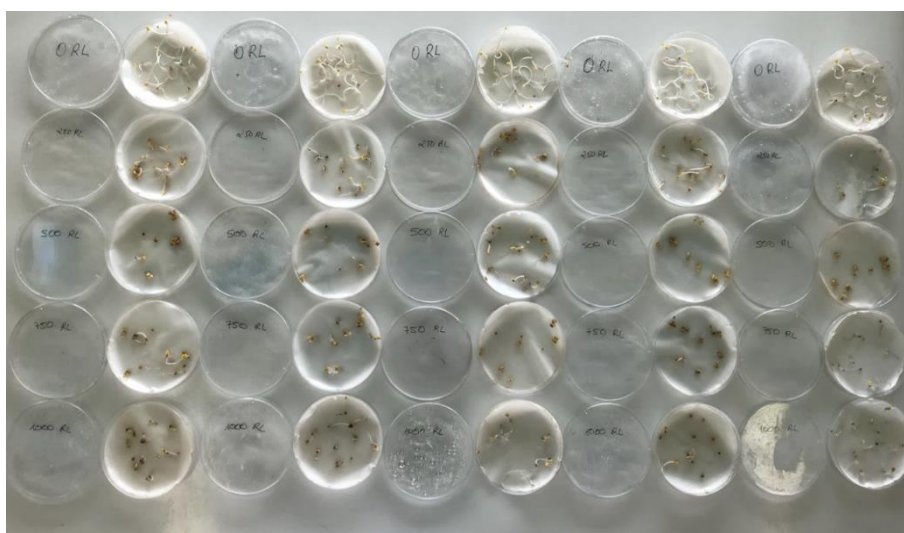
**Figura 7: Segundo ensayo de germinación en placa con los tratamientos: arena, suelo control, suelo + 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo, suelo + 500 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo y suelo + 750 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo.**

En un **tercer ensayo** y con el objeto de obtener resultados más representativos de la germinación en placa y las desviaciones estándar de cada tratamiento, se utilizaron 25 placas Petri en las cuales se vuelven a añadir arena, suelo control, suelo + 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo, suelo + 500 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo y suelo + 750 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo, y se ponen 10 semillas de *Brassica juncea* por placa, resultando cinco replicados por tratamiento.



**Figura 8: Tercer ensayo de germinación (25 placas), 5 placas por tratamiento. Con los tratamientos: arena, suelo control, suelo + 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo, suelo + 500 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo y suelo + 750 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo.**

En un **cuarto ensayo** se estudia en placas petri (9 cm de diámetro y 1,5 cm de altura) sobre papel, la germinación de las semillas de Brassica con diferentes dosis de ramnolípido, (0 mg l<sup>-1</sup>, 250 mg l<sup>-1</sup>, 500 mg l<sup>-1</sup>, 750 mg l<sup>-1</sup> y 1000 mg l<sup>-1</sup>), procediendo como en los casos anteriores, para calcular el índice de germinación. Con este ensayo se puede ver el efecto de la dosis de este biosurfactante en la germinación, por sí mismo, pudiendo estudiar si existe relación de fitotoxicidad en la dosis.



**Figura 9: Ensayo de germinación en placa con diferentes dosis de ramnolípido. (0 mg l<sup>-1</sup>, 250 mg l<sup>-1</sup>, 500 mg l<sup>-1</sup>, 750 mg l<sup>-1</sup> y 1000 mg l<sup>-1</sup>).**

Se hizo también un **quinto ensayo** con el mismo suelo del tercer ensayo y los mismos tratamientos (arena, suelo control, suelo + 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo, suelo + 500 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo y suelo + 750 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo), pero esta vez el suelo se había dejado envejecer durante 15 días con la finalidad de poder estudiar el efecto del envejecimiento sobre la toxicidad del cobre y se procede de la siguiente forma: se mezclan y se homogeneizan los suelos de cada tratamiento del ensayo anterior, y se disponen en placas con 10 gramos de suelo en cada una, resultando para cada tratamiento de cobre 10 placas. Con el objeto de estudiar el efecto del ramnolípido sobre la toxicidad del cobre, a la mitad de las placas se le añade la dosis de 1000 mg de ramnolípido kg<sup>-1</sup> de suelo, por lo que tenemos un total de 50 placas petri con los diferentes tratamientos de cobre y ramnolípido, anotando a los 7 días, como en los casos anteriores, cuál era el número de semillas germinadas por placa y sus longitudes radiculares, pudiendo realizar con los resultados de germinación obtenidos de estos tratamientos, un estudio estadístico del Índice de Germinación de Zucconi para las distintas dosis de cobre, para la presencia del ramnolípido y para ver el efecto del envejecimiento del cobre en el suelo, comparando los resultados obtenidos a tiempo 0 y tiempo 15 días tras la adicción del cobre al suelo.

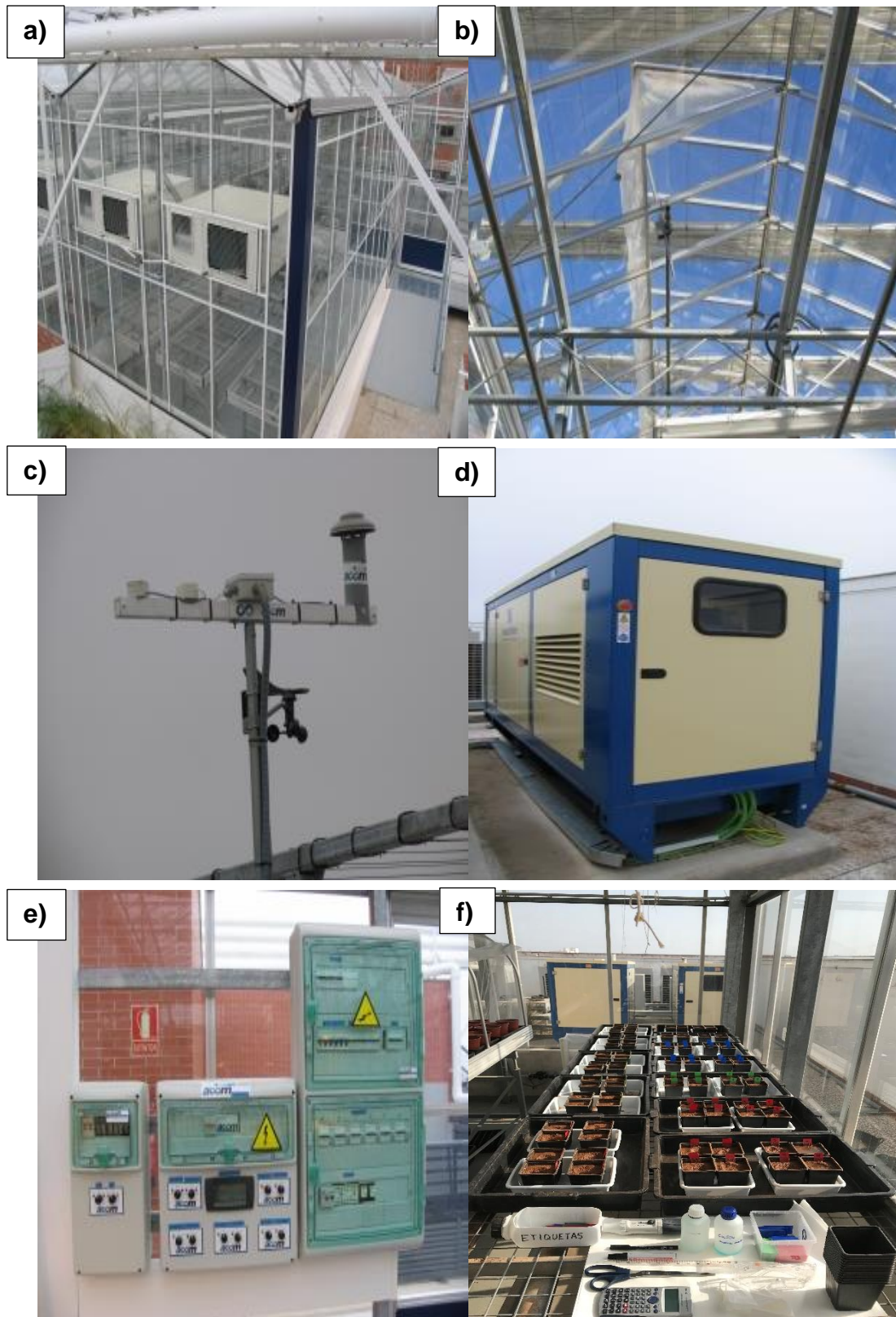


**Figura 10: Ensayo de germinación en placas con diferentes dosis de Cu y RL en suelo envejecido 15 días. Tratamientos de cobre: (arena, suelo control, suelo + 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo, suelo + 500 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo y suelo + 750 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo) y tratamientos de ramnolípido: (0 mg RL kg<sup>-1</sup> de suelo y 1000 mg RL kg<sup>-1</sup> de suelo).**

### 3.2.3 Ensayo en invernadero

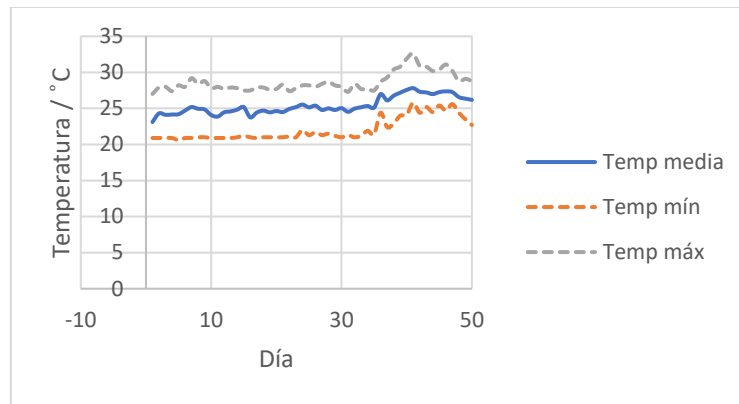
#### 3.2.3.1 Descripción del invernadero

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 m<sup>2</sup> 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 m<sup>2</sup>. 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/calefacción 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. 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).

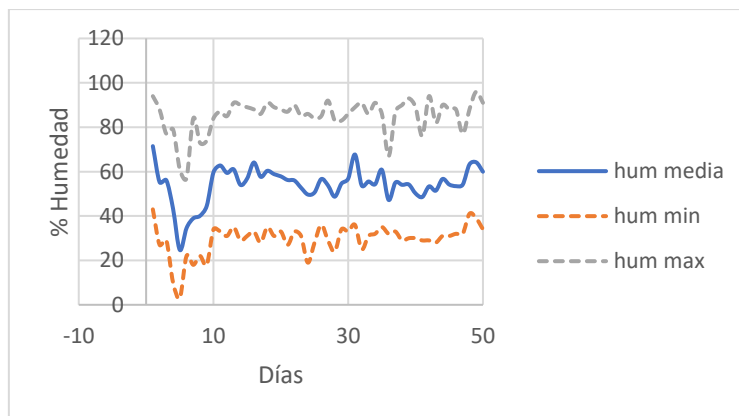


**Figura 11: Infraestructuras del invernadero (CITIUS,2018): a) sistema de refrigeración, b) sistema de sombreado, c) estación de parámetros meteorológicos, d) grupo electrógeno, e) controlador lógico, f) mesa rodante.**

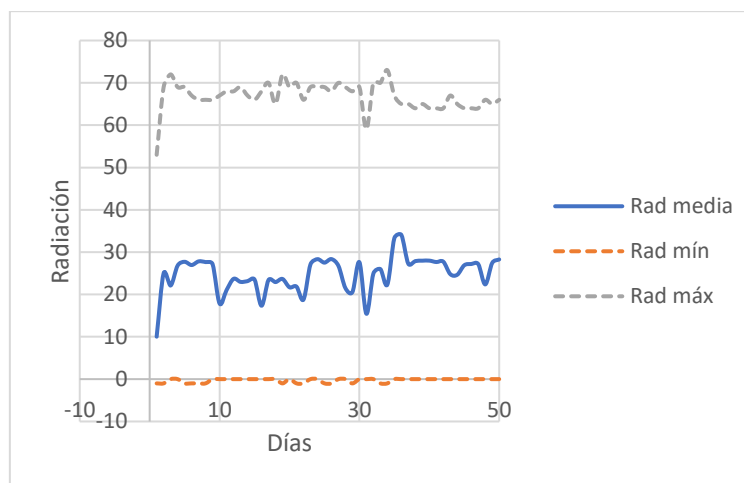
En las siguientes figuras se muestran la evolución de la temperatura, humedad y radiación, en el interior del invernadero, durante el período que duró el ensayo:



**Figura 12 : Temperaturas diarias media, máxima y mínima.**



**Figura 13: Humedad diaria media, máxima y mínima.**



**Figura 14: Radiación diaria media, máxima y mínima.**



### 3.2.3.2 Diseño del ensayo en invernadero

Se utilizan las macetas descritas en el apartado 3.1.6 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: cada tratamiento a estos suelos se hace por triplicado en bandejas separadas, las cuales se distribuyen en la mesa totalmente al azar. En cada una de estas bandejas se ponen 4 macetas etiquetadas que llevarán el mismo tratamiento y que se contabilizarán en lo sucesivo como una sola a efectos de las tomas de datos y medidas que se van a realizar, resultando un total de 24 bandejas con los siguientes tratamientos:

**Tabla 4: Tratamientos para ensayo en invernadero (dosis de cobre y ramnolípido en mg kg<sup>-1</sup> de suelo).**

0 mg kg <sup>-1</sup> Cu (0 Cu)	125 mg kg <sup>-1</sup> Cu <b>(125 Cu)</b>	250 mg kg <sup>-1</sup> Cu <b>(250 Cu)</b>	500 mg kg <sup>-1</sup> Cu <b>(500 Cu)</b>
0 mg kg <sup>-1</sup> Cu + 1000 mg kg <sup>-1</sup> RL (0 Cu + RL)	125 mg kg <sup>-1</sup> Cu + 1000 mg kg <sup>-1</sup> RL <b>(125 Cu + RL)</b>	250 mg kg <sup>-1</sup> Cu + 1000 mg kg <sup>-1</sup> RL <b>(250 Cu + RL)</b>	500 mg kg <sup>-1</sup> Cu + 1000 mg kg <sup>-1</sup> RL <b>(500 Cu + RL)</b>

Las bandejas distribuidas al azar quedan de la siguiente manera en la mesa de trabajo:

**Tabla 5: Distribución al azar de los tratamientos por triplicado en la mesa de trabajo y orientación de las bandejas.**

125 Cu + RL (1)	250 Cu + RL (2)	500 Cu (2)	125 Cu + RL (3)	500 Cu (3)	0 Cu (3)	250 Cu (3)			
250 Cu (1)	0 Cu + RL (2)	500 Cu (3)	500 Cu + RL (1)	500 Cu + RL (2)	500 Cu + RL (3)	125 Cu (3)			
0 Cu + RL (1)	250 Cu + RL (1)	0 Cu (1)	125 Cu (1)	125 Cu + RL (2)	0 Cu + RL (3)	0 Cu (2)	250 Cu (2)	125 Cu (2)	250 Cu + RL (3)



**Figura 15: 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  $490 \text{ cm}^3$  y calculado la densidad del suelo, resultando una densidad de  $1.008 \text{ kg/dm}^3$ , se decide que la cantidad de suelo que irá en cada maceta sea de aproximadamente 500 g. Se procede seguidamente a calcular la cantidad de suelo necesaria para todo el experimento, resultando 48 kg de suelo para las 96 macetas.

El suelo se deja secar repartido en bandejas dentro del invernadero durante 20 días; una vez seco se procede a tamizar todo el suelo con un tamiz de luz de malla de 2 mm, con el cual se separan los elementos más gruesos, obteniendo de esta forma el porcentaje de pedregosidad del mismo, resultando una pedregosidad del 18,25 %.



**Figura 16: Secado del suelo en bandejas antes de proceder a su tamizado.**

Una vez seco y tamizado se reparte en las macetas y se procede a calcular la cantidad de agua necesaria para llevar los 500 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 170 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 a un 60 % de su capacidad de campo, y por tanto el peso total de la maceta más el suelo húmedo debía ser de:  $8,2 \text{ g (maceta vacía)} + 500 \text{ g (suelo seco)} + 170 \text{ g (agua)} \times 0,6 = 610,2 \text{ g}$ .

A continuación, una vez calculada la cantidad de agua que se puede aplicar sin que haya lixiviación del suelo en las macetas, se procede a aplicar los diferentes tratamientos de cobre objetos de este estudio, y se deja envejecer en el suelo durante 15 días.

Pasado este tiempo se aplica el ramnolípido a la mitad de los tratamientos, de manera que los suelos que llevarán ramnolípido quedarán humedecidos con la dosis oportuna de este biosurfactante más agua, y los suelos que no lo llevan son humedecidos sólo con agua, con el objetivo de que queden todos uniformemente humedecidos para la siembra de las semillas.

El riego de los suelos durante el desarrollo de las plantas se hace con una manguera con grifo de lluvia fina para no alterar la estructura del suelo, con agua procedente de la red de emasesa y con una periodicidad diaria, 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 24 horas desde su humectación, cuidando de igual forma que al regar no se produjera lixiviación en las macetas.

Una vez terminado el experimento y retirado el material vegetal se unifican los suelos por repetición y tratamiento y se guardan en bolsas de plástico, para posteriores análisis.



**Figura 17: Unificación del suelo por repetición y tratamiento.**

#### **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 30 semillas por maceta como se muestra en la figura 18, 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.



**Figura 18: Siembra.**

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.

A continuación se riega y se tapan con plástico todas las macetas, para mantener la humedad requerida para la germinación de las semillas, hasta que se observa después de unos días que la mayoría las semillas han germinado. En este momento se retiran los plásticos y se mantiene la humedad solamente con los riegos diarios.



**Figura 19: Macetas tapadas con plástico para conservar la humedad en los primeros días tras la siembra.**

### 3.2.3.5 Aclareo de las plantas y recogida del material vegetal

Quince días después de la plantación la mayoría de las plantas se encontraban en estadio de 2 hojas verdaderas, y se hace una primera recogida de material vegetal (aclareo), dejando en la medida de lo posible cinco plantas por maceta, y pudiendo realizar con esta primera recolección un estudio estadístico del número de plantas germinadas por tratamiento y de biomasa.



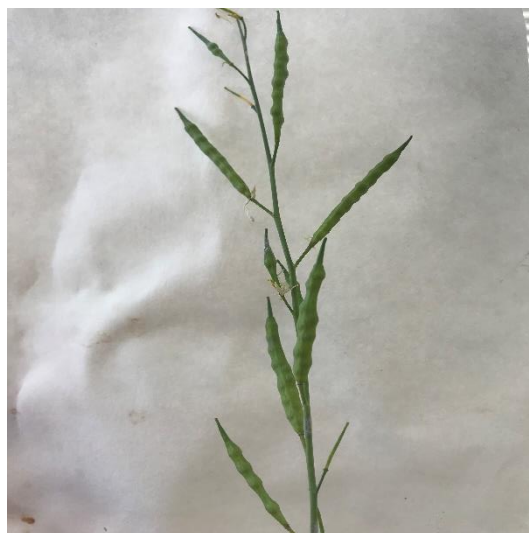
**Figura 20: Plántulas con dos hojas verdaderas, obtenidas en la primera recolección.**

A los cuarenta días desde la plantación el estadio de la mayoría de las plantas era de “botón floral”, y se hace una segunda recolección de plantas, dejando esta vez dos plantas por maceta. Con las plantas recolectadas se hace un estudio más detallado de biomasa, separando la parte aérea de la raíz. Además se determina la cantidad de Cu presente en la parte aérea de las plantas en este momento, en los tratamientos  $0 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ ,  $0 \text{ mg Cu kg}^{-1} + 1000 \text{ mg RL kg}^{-1}$ ,  $125 \text{ mg Cu kg}^{-1}$  y  $125 \text{ mg Cu kg}^{-1} + 1000 \text{ mg RL kg}^{-1}$ , por ICP óptico, tratando las muestras vegetales con una digestión ácida, y pudiendo realizar a continuación un estudio estadístico del efecto de los diferentes tratamientos del suelo en la extracción de Cu y de otros elementos por parte de la planta.



**Figura 21: Plantas en estadio de botón floral, (segunda recolección).**

Dos meses después de la plantación las plantas que quedan en las macetas se encuentran en estadio de madurez y han producido semillas, por lo que se decide realizar la tercera y última 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, para poder hacer el estudio de la biomasa en este último momento.



**Figura 22: Parte aérea de una planta madura con producción de semillas, (tercera recolección).**

### 3.2.3.6 Estudio del crecimiento (biomasa)

Una vez realizada las tres recolecciones, que se hacen en diferentes momentos del desarrollo de la planta (2 hojas verdaderas, botón floral y madurez), se estudia la biomasa creada por tratamiento y repetición, tomando datos de peso fresco y peso seco tanto de la parte aérea como de la parte radicular.

Las plantas fueron cosechadas cuando tenían 2 hojas verdaderas para obtener una estimación de la biomasa inicial, cuando estaban en estadio de botón floral se hace una segunda recolección para estimar la tasa de crecimiento relativo (TCR) en este periodo, además de relacionarlo con el análisis foliar, y una tercera cosecha en el estadio de madurez, con la finalidad de estudiar la TCR también en este periodo.

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

Dónde:

BS<sub>f</sub>: Biomasa seca final

BS<sub>i</sub>: Biomasa seca inicial

D: Número de días del experimento



**Figura 23: Raíces obtenidas en los diferentes tratamientos (tercera recolección).**



### 3.2.4 Extracción del cobre disponible con AEDT

Una vez terminados los ensayos de germinación en placa y el ensayo de invernadero, se extrae el cobre disponible 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 centrífuga 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 espectrofotometría de absorción atómica.



**Figura 24: Preparación de la disolución de AEDT, para extracción de cobre del suelo.**

### 3.2.5 Determinación del cobre por espectrofotometría de absorción atómica

Se usa esta técnica para determinar el cobre disponible en los suelos de los diferentes tratamientos, y extraído previamente con AEDT.



**Figura 25: Preparación de las diluciones del sobrenadante para determinar el contenido de cobre disponible en los suelos.**

El cobre que queda en estos suelos será el resultado de lo que el suelo tuviese por naturaleza propia más lo que se ha añadido en los diferentes tratamientos, a lo que habría que restar el que han extraído las plantas, el que haya quedado fuertemente retenido en las arcillas, el que esté formando

hidróxido de cobre y el que quede retenido por óxido e hidróxidos de hierro y manganeso. El cobre que se extrae con este método será el que está unido a la materia orgánica del suelo.

En química analítica, la espectrofotometría de absorción atómica es una técnica para determinar la concentración de un elemento metálico determinado en una muestra. Puede utilizarse para analizar la concentración de más de 62 metales diferentes en una solución.

La absorción de la disolución se mide en un espectrofotómetro de absorción atómica y se interpola en una curva de calibración preparada con una serie de patrones de cobre, conteniendo AEDT, con el objeto de que la matriz de los patrones fuera similar a la de los extractos. Los patrones usados en este estudio tienen las siguientes concentraciones de cobre en partes por millón: 0 ppm, 1 ppm, 2 ppm y 4 ppm.

El sobrenadante utilizado por tanto debe ir diluido para que sus concentraciones entren en el rango apropiado para su medida, por lo que se hacen las siguientes diluciones:

- Tratamiento control: 0 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo: No se diluye, dilución 1:1
- Tratamiento 125 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo: Dilución 1:5
- Tratamiento 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo: Dilución 1:10
- Tratamiento 500 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo: Dilución: 1:10

El espectrofotómetro utilizado tiene una potencia de 25 mA y se utiliza una lámpara multielemento, capaz de medir Cu, Fe, Mn y Zn, a una longitud de onda de 324,8 nm.

Se calibra con los patrones de cobre descritos anteriormente para elaborar la recta de calibrado del aparato y a continuación se toman las medidas de las muestras.



**Figura 26: espectrofotómetro de absorción atómica utilizado para la determinación de cobre disponible en los suelos.**

### **3.2.6 Determinación de metales en material vegetal por ICP óptico**

Se realiza la determinación de Cu por ICP óptico en las muestras vegetales procedentes de los distintos tratamientos en el estadio de botón floral. Para ello se toman muestras de la parte aérea seca de las plantas y se muelen e introducen en tubos Eppendorf de 2 ml, la cantidad de 0.25 g de material vegetal.

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 ácidos, enrasando finalmente a un volumen concreto. Los resultados se expresan en  $\text{mg l}^{-1}$ , ya que se mide sobre la digestión realizada a la muestra. Para conocer los  $\text{mg kg}^{-1}$  del elemento Cu en la muestra inicial, sólo habrá que multiplicar los  $\text{mg l}^{-1}$  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 del Cobre en las muestras por ICP óptico se han realizado en el Servicio de Microanálisis del CITIUS de la Universidad de Sevilla.

El método está basado en la medición de la emisión atómica por medio de una técnica de espectroscopía óptica. Las muestras se nebulizan y el aerosol formado se transporta hasta la antorcha de plasma en donde tiene lugar la

excitación electrónica. Un plasma de radiofrecuencia acoplado inductivamente (ICP), genera los correspondientes espectros de líneas de emisión atómicas. Los haces de luz son dispersados por un espectrómetro de red de difracción y los detectores se encargan de medir las intensidades de las líneas. Las señales originadas en los detectores se procesan y controlan mediante un sistema informático. (CEBAS.,2018).



## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Resultados de medidas de pH y conductividad eléctrica

#### 4.1.1 pH y conductividad en los suelos de los tratamientos en placa Petri

En la tabla 6 se muestran los datos de pH en disolución acuosa 1:2,5 y de salinidad en disolución acuosa 1:5 que se obtienen en las medidas realizadas a los suelos de los distintos tratamientos con sulfato de cobre.

**Tabla 6: medidas de pH y conductividad del suelo con los diferentes tratamientos.**

Tratamiento	pH en disolución acuosa 1:2,5	Conductividad eléctrica en disolución acuosa 1:5 ( $\mu\text{S m}^{-1}$ )
Agua destilada	6,6	
Arena	8,7	73,6
Suelo (0 mg Cu kg <sup>-1</sup> )	5,67	120,3
Suelo (250 mg Cu kg <sup>-1</sup> )	5,29	309,6
Suelo (500 mg Cu kg <sup>-1</sup> )	5,04	443,2
Suelo (750 mg Cu kg <sup>-1</sup> )	4,8	506,1

La adicción al suelo de disoluciones más concentradas de sulfato de cobre hacen que el pH disminuya y que la salinidad aumente, como se puede ver en los resultados obtenidos.

#### 4.1.2 pH del extracto con AEDT de los tratamientos utilizados en placa Petri y en invernadero

Así mismo, se midió el pH del sobrenadante con AEDT que se utilizó para la determinación de cobre disponible en el suelo por espectrofotometría de absorción atómica, obteniéndose los valores medios de pH en el sobrenadante que se muestran en la tabla 7:



**Tabla 7: pH del sobrenadante con AEDT (suelo del ensayo en placas).**

Tto.	T0 0 Cu	T0 250 Cu	T0 500 Cu	T0 750 Cu	0 Cu	0 Cu + RL	250 Cu	250 Cu + RL	500 Cu	500 Cu + RL	750 Cu	750 Cu + RL
pH	6,88	6,87	6,83	6,80	6,9	6,89	6,86	6,88	6,84	6,86	6,79	6,82

Los resultados obtenidos muestran que el pH del sobrenadante baja ligeramente cuando la concentración de Cobre es mayor.

Las medidas de pH del extracto AEDT del suelo cultivado en macetas, se muestran en la tabla 8:

**Tabla 8: pH del extracto AEDT (suelo del ensayo en invernadero).**

Tto	0 Cu	0 Cu + RL	125 Cu	125 Cu + RL	250 Cu	250 Cu + RL	500 Cu	500 Cu + RL
pH	6.9	6.94	6.88	6.88	6.85	6.86	6.85	6.83

El pH baja ligeramente a medida que aumenta la concentración de Cobre.

## 4.2 Resultados de germinación en placas Petri

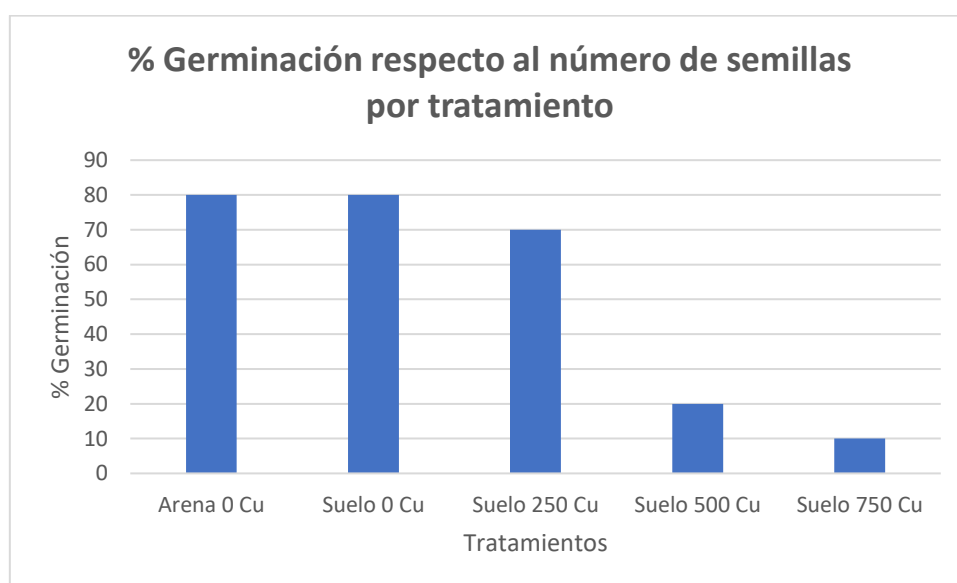
### Ensayo previo de germinación en placa Petri (primer ensayo).

En un primer ensayo de germinación en placa Petri, donde se utiliza una placa con papel humedecido con agua destilada y 20 semillas de *Brassica juncea*, y se dejan 7 días en cámara de germinación a 20°C, se obtiene un **90 % de germinación** de las semillas que se van a utilizar en este trabajo, por lo que se comprueba que son aptas para llevar a cabo el estudio que se va a realizar.

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

En este segundo ensayo de germinación en placa Petri, se utilizan cinco placas con los siguientes tratamientos: arena 0 mg Cu kg<sup>-1</sup>, suelo 0 mg Cu kg<sup>-1</sup>, suelo 250 mg Cu kg<sup>-1</sup>, suelo 500 mg Cu kg<sup>-1</sup> y suelo 750 mg Cu kg<sup>-1</sup>, obteniendo

los resultados del % de germinación representados en el gráfico de la figura 27. En este caso, se obtienen el mismo porcentaje de germinación en arena y en suelo control, por lo que se representa el % de germinación respecto a las semillas que se siembran por tratamiento, para tener una idea representativa del número de semillas que germinan en los diferentes tratamientos. Se aprecia el efecto de la toxicidad del cobre cuando se aumenta la dosis de este metal en el suelo, resultando muy fitotóxico en concentraciones superiores a 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo.

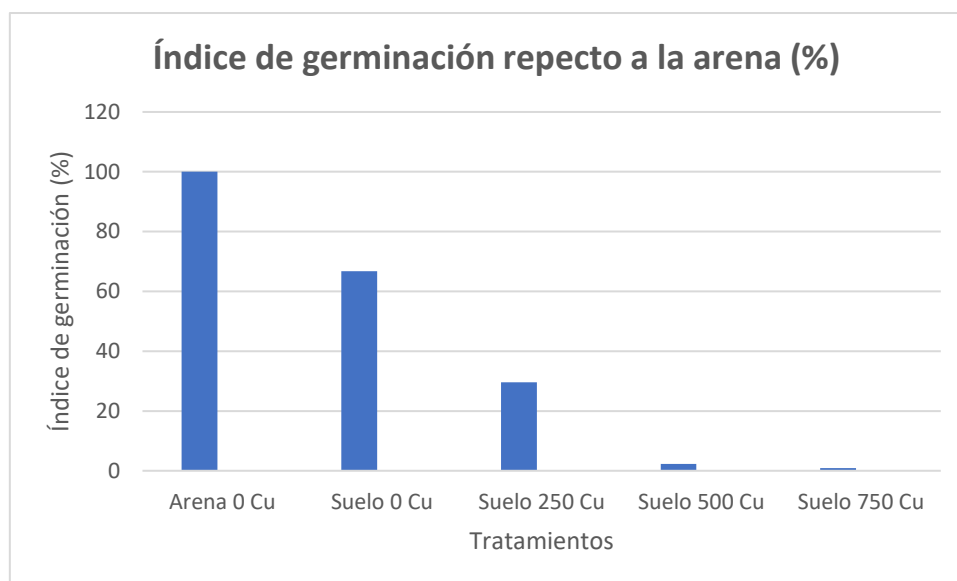


**Figura 27: % de germinación de las semillas de *Brassica juncea* respecto al número de semillas por tratamiento. (N=1).**

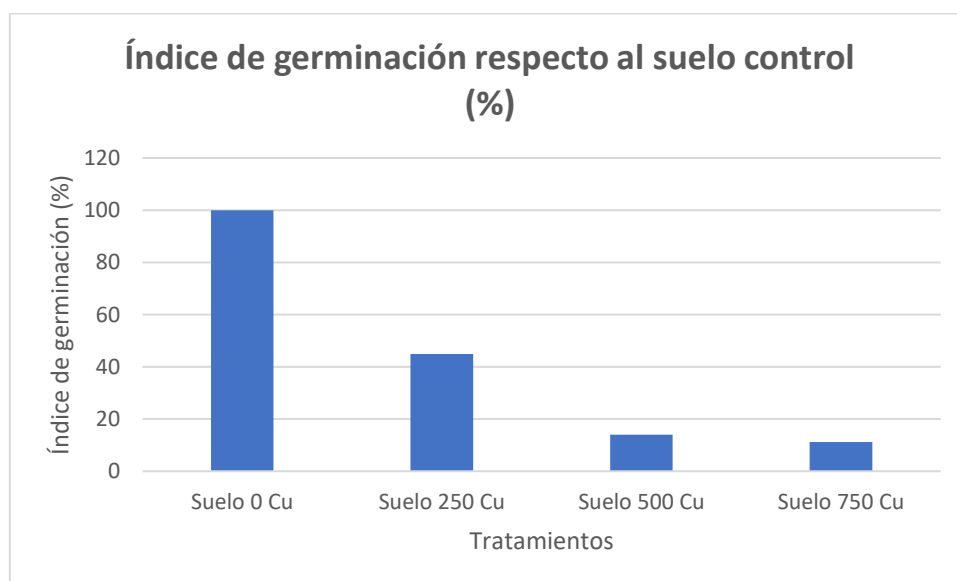
Se miden además las longitudes radiculares de las semillas germinadas, por los que se puede introducir y aplicar el concepto de Índice de Germinación de Zucconi, (Zucconi y col.,1981) cuya fórmula es:

$$IG = (\% \text{ Germinación} \times \% \text{ Elongación radicular}) / 100$$

que se representa en las figuras 28 (respecto a la arena), y en la figura 29 (respecto al suelo control).



**Figura 28: Índice de germinación respecto a la arena (%) obtenido en el segundo ensayo de germinación. (N=1).**



**Figura 29: Índice de germinación respecto al suelo control (%) obtenido en el segundo ensayo de germinación. (N=1)**

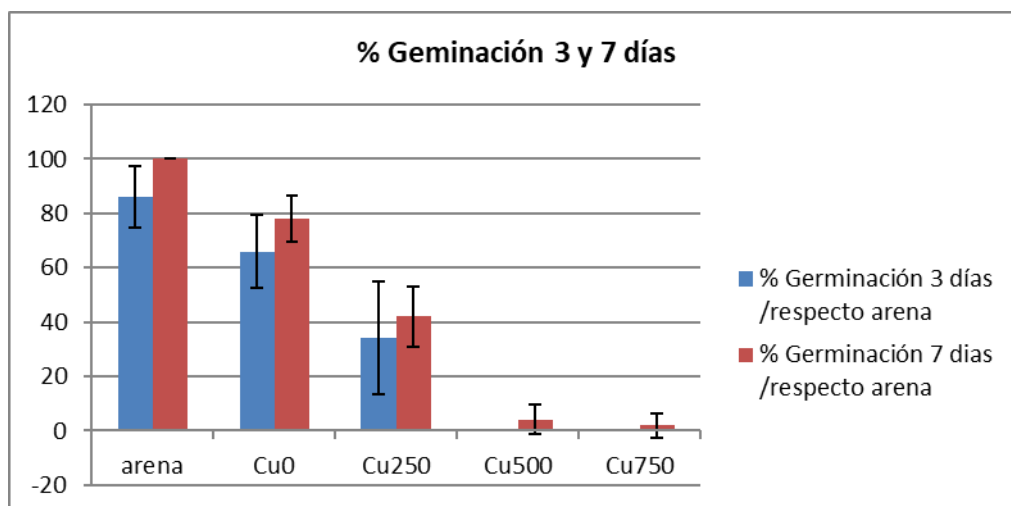
En los resultados obtenidos, referidos al Índice de Germinación, tanto si se toma como referencia la arena o el suelo control (tratamiento 0 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo) queda denotado el efecto tóxico del cobre añadido al suelo, con valores de este índice inferiores al 20 % cuando las concentraciones de cobre son iguales o superiores a 500 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo. Este resultado establece que para obtener plantas a estos niveles de contaminación, habría que plantar un

número de semillas cinco veces superior al número de plantas que se desean obtener.

### **Ensayo de germinación en placa Petri (tercer ensayo).**

Se utilizan en este caso 25 placas Petri, en las cuales se disponen los diferentes tratamientos de Cobre como en los casos anteriores, pero esta vez se realiza el experimento por quintuplicado, anotando el número de semillas germinadas en cada tratamiento y las longitudes radiculares, y se calcula la desviación estándar de cada tratamiento tanto para % de germinación como para el Índice de germinación de las semillas de *Brassica juncea*.

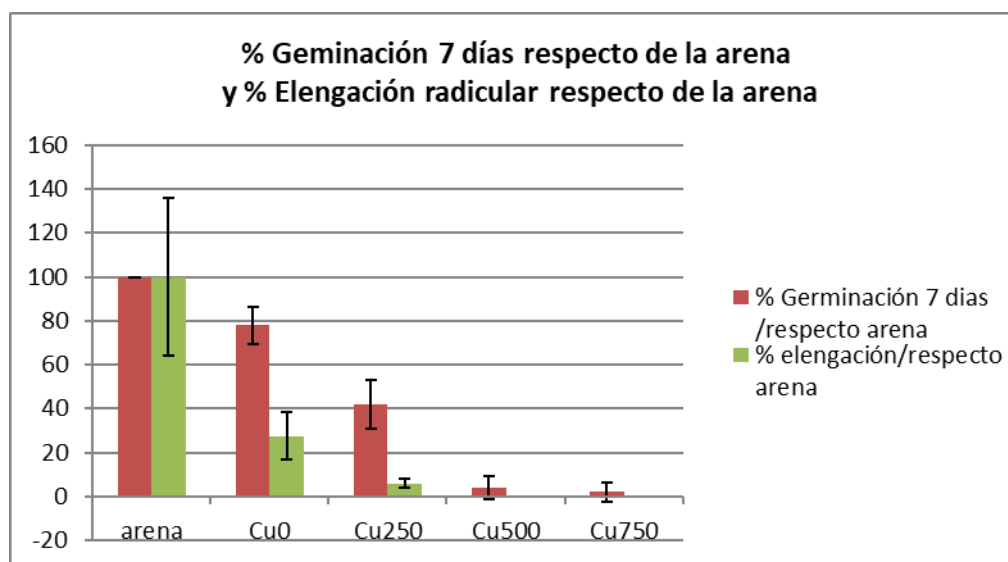
En el gráfico de la figura 30 está representado el % de germinación de las semillas, tomando como referencia la arena a los 3 y 7 días desde su siembra, donde se puede apreciar el efecto fitotóxico del cobre, obteniendo respecto a la arena, una germinación a los 7 días entorno al 80 % en el suelo control (sin adicción de cobre) en contraste con aproximadamente el 40 % de germinación con la dosis de 250 mg kg<sup>-1</sup> e inferiores al 5 % de germinación con las dosis de 500 y 750 mg kg<sup>-1</sup>.



**Figura 30: % de germinación de *Brassica juncea* tomando como control la arena, a los 3 y 7 días desde su siembra en placas Petri con los diferentes tratamientos de cobre. N=5. Las barras de error muestran las Desviaciones Estándar.**

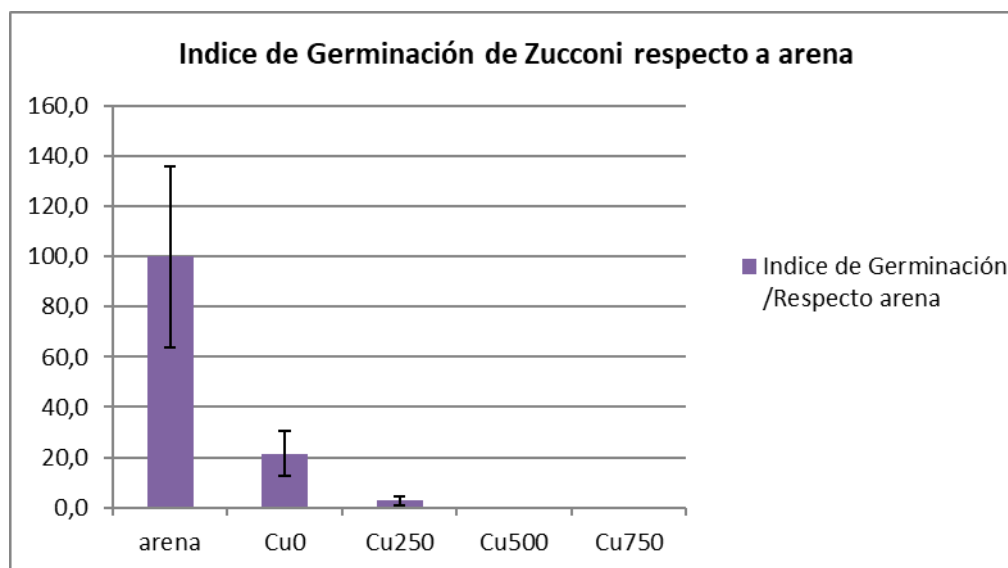
En el gráfico de la figura 31 se representan los resultados obtenidos de % de germinación a los 7 días desde la siembra y % de elongación radicular de las semillas de *Brassica juncea*, tomando como referencia la germinación y la elongación radicular en la arena, en los distintos tratamientos de cobre que se aplican al suelo. En los resultados que se obtienen se aprecia, a simple vista, una diferencia importante en la elongación radicular que se obtiene en arena y en suelo control, resultando un % de elongación en suelo sin adicción de cobre de un 25 % respecto de la arena; esto puede ser debido a que la presencia de nutrientes en el suelo hacen que las semillas no gasten toda su energía en elongar sus raíces para buscar esos nutrientes. Además podría influir la textura del sustrato, de manera que la presencia de arcillas en el suelo y la compactación que éstas pueden provocar, hagan que las raíces se desarrollen menos o de forma más lenta.

En cuanto a la elongación radicular obtenida en los suelos contaminados con las diferentes concentraciones de cobre, están en concordancia con el % de germinación, notándose igualmente el efecto fitotóxico de este elemento.



**Figura 31: % de germinación de *Brassica juncea* tomando como control la arena, a los 7 días desde su siembra en placas Petri con los diferentes tratamientos de cobre y % de la elongación radicular. N=5. Las barras de error muestran las Desviaciones Estándar.**

El índice de germinación de Zucchini para los diferentes tratamientos, tomando como referencia la arena, está representado en el gráfico de la figura 32, donde se aprecia una diferencia en torno al 80 % del valor de este índice en arena y en suelo control. Esta diferencia es debida, como se ha comentado anteriormente, a las diferencias en las elongaciones radiculares que se obtienen en las semillas de ambos tratamientos, y que repercuten por tanto en el valor de este índice.

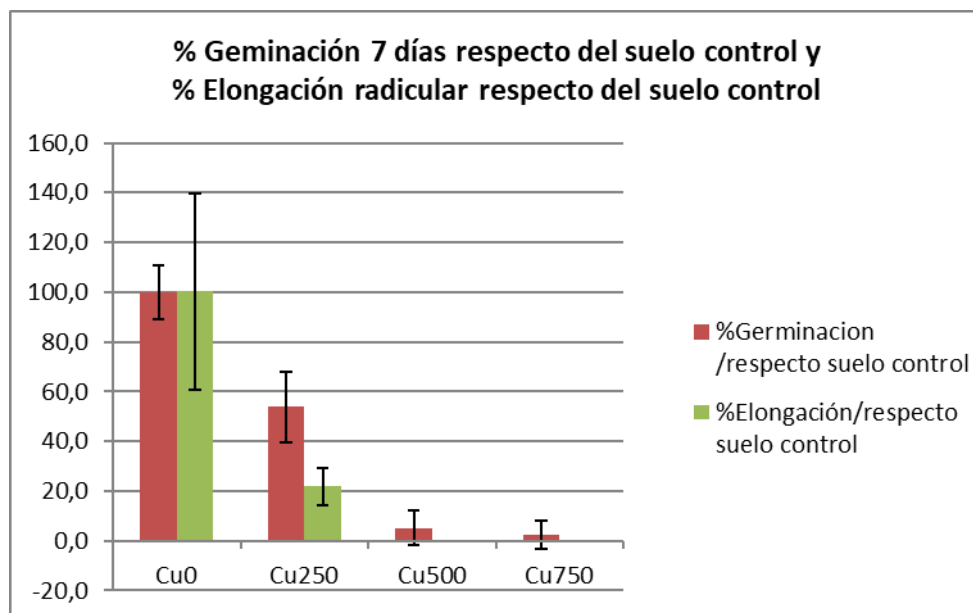


**Figura 32: Índice de Germinación de Zucchini tomando como control la arena. N=5. Las barras de error muestran las Desviaciones Estándar.**

Tomando como control la arena puede observarse el nefasto efecto de la adición de cobre en el suelo para el valor de este índice, por lo que para ver de forma más significativa las diferencias entre tratamientos en el suelo propiamente dicho, se procede al cálculo de este índice tomando como referencia el suelo control (tratamiento con 0 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo).

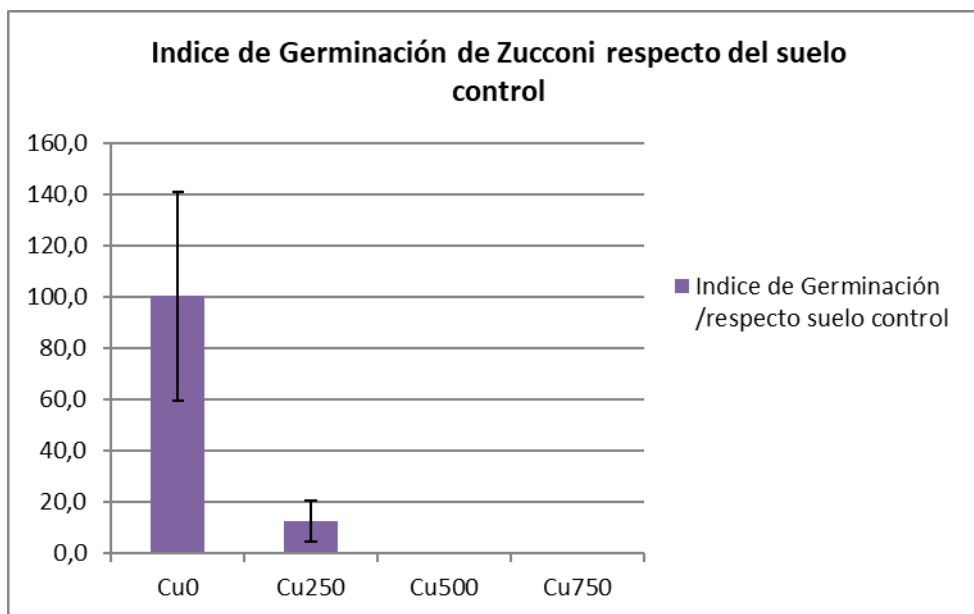
En el gráfico de la figura 33 se muestran los resultados obtenidos en el % de germinación y % de elongación radicular, a los 7 días desde la siembra en placas Petri, tomando como referencia el suelo control con 0 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo. El resultado de la adición al suelo de 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo, hace que el % de germinación de las semillas *Brassica juncea* sea en torno a un 45 % más bajo que en el suelo control, y el % de elongación radicular en torno a un 80 % más bajo, notándose el efecto fitotóxico de este elemento para ambos parámetros

medidos. Con las dosis de 500 y 750 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo se obtienen valores de % de germinación menores del 5 %, debido igualmente a que al aumentar la dosis de Cu, aumenta la toxicidad y por tanto los valores de estos parámetros que se obtienen son aún menores.



**Figura 33: % de germinación de *Brassica juncea* tomando como control el suelo 0 Cu, a los 7 días desde su siembra en placas Petri con los diferentes tratamientos de cobre y % de la elongación radicular. N=5. Las barras de error muestran las Desviaciones Estándar.**

El índice de germinación que se obtiene tomando como control el suelo con 0 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo está representado en la figura 34, notándose ya a una dosis de 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo, un valor de este índice por debajo del 15 % respecto al suelo control, y valores nulos para las dosis de 500 y 750 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo.



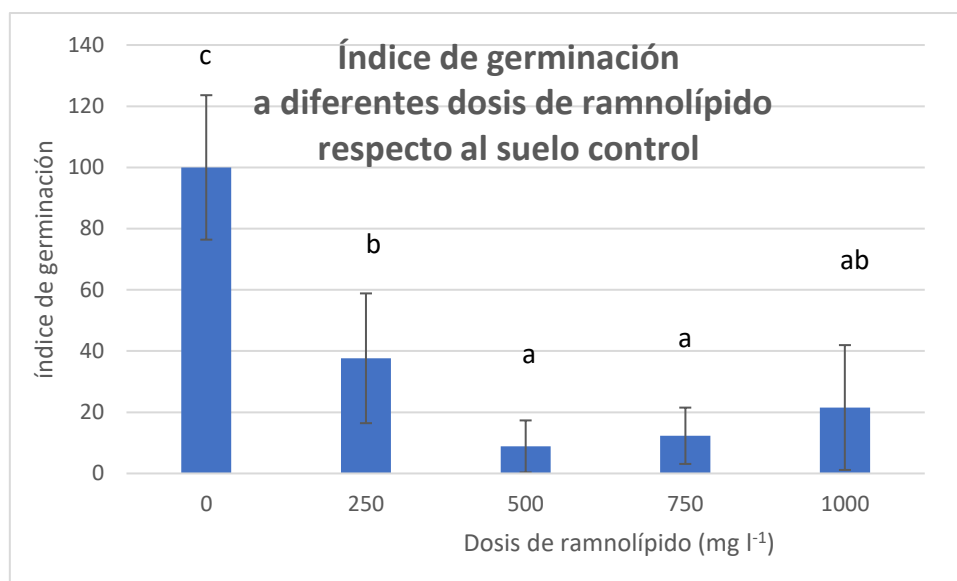
**Figura 34: Índice de germinación de Zucchini tomando como control el suelo 0 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo. N=5. Las barras de error muestran las Desviaciones Estándar.**

Los resultados obtenidos anteriormente denotan que el cobre recién añadido al suelo, provoca un efecto fitotóxico que imposibilita la germinación de *Brassica juncea*, cuando la dosis de este elemento es igual o superior a 500 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo.

#### **Ensayo de germinación con diferentes dosis de ramnolípido (cuarto ensayo).**

En este ensayo se preparan 25 placas Petri con papel humedecido, en las cuales se aplican las diferentes dosis de ramnolípido con un total de 5 placas por tratamiento y se determina, al igual que en los ensayos anteriores el Índice de Germinación de las semillas de *Brassica Juncea*, obteniendo los resultados que se muestran en la figura 35.





**Figura 35: Índice de germinación de *Brassica juncea* con diferentes dosis de ramnolípido. N=5. Las barras de error muestran las Desviaciones Estándar. Letras minúsculas diferentes indican medias estadísticamente diferentes ( $P < 0,05$ ).**

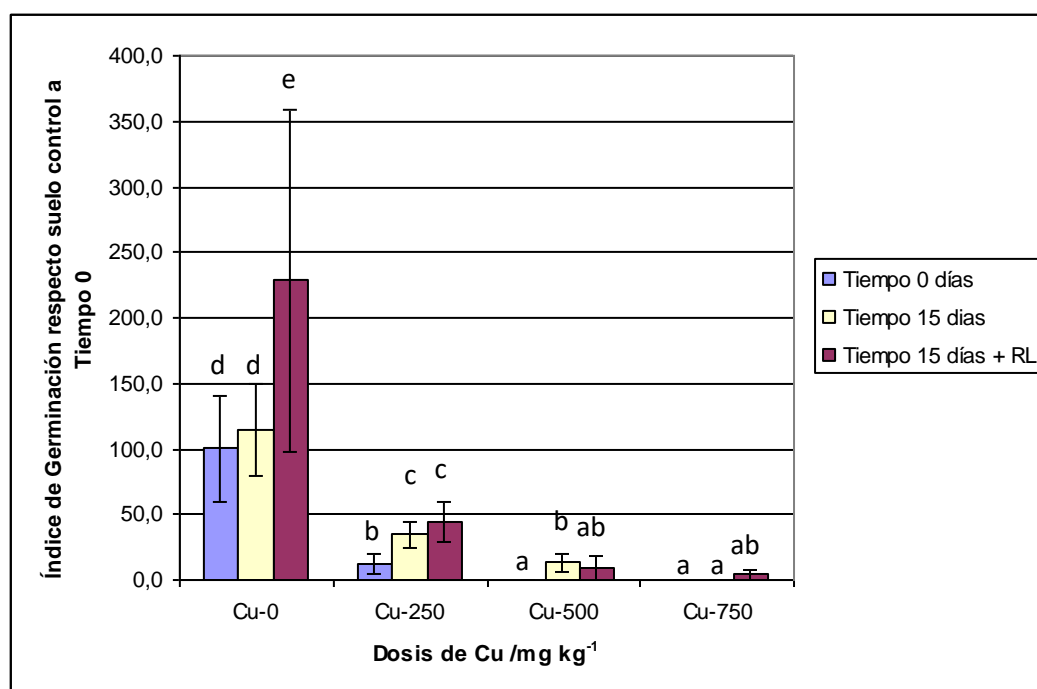
A la vista de los resultados obtenidos y una vez realizado el estudio estadístico, se obtienen tres grupos que definen la toxicidad de este biosurfactante dependiendo de la dosis que se aplica. Nótese que el ramnolípido por sí mismo produce toxicidad, obteniéndose un índice de germinación por debajo del 40 % respecto al control a la dosis de 250 mg/l, entorno a un 10 % en las dosis de 500 y 750 mg/l, y algo superior al 20 % en la dosis de 1000 mg/l.

Con los resultados obtenidos sólo se puede definir el efecto fitotóxico del ramnolípido en la germinación por sí mismo, ya que es aplicado en papel humedecido con las diferentes concentraciones de este producto.

Estudios anteriores demostraron que en suelo el ramnolípido podía quedar retenido y no mostrar efectos fitotóxicos a la dosis de 1000 mg/l, (Carvajal S., 2016), por lo que se opta por esta dosis para los posteriores ensayos que se realizan en este trabajo.

**Ensayo de germinación de *Brassica juncea* en placas Petri a tiempo 0 y tiempo 15 días (suelo envejecido), con diferentes dosis de cobre y ramnolípido, (quinto ensayo).**

El efecto de la dosis de cobre, del tiempo de envejecimiento y de la aplicación de RL tras el envejecimiento en el Índice de Germinación de Zucchini de *Brassica juncea* en un suelo franco contaminado artificialmente con sulfato de cobre, se representa en la figura 36.



**Figura 36: Efecto de la dosis de Cobre, tiempo de envejecimiento y aplicación de ramnolípido en la germinación de *Brassica juncea*. N=5. Las barras de error muestran las Desviaciones Estándar. Análisis de la varianza mediante transformación de variable (raíz cuadrada): Letras minúsculas diferentes indican que existen diferencias de medias estadísticamente significativas (método (LSD) de Fisher P < 0,05).**

El análisis estadístico muestra que las varianzas en los tratamientos no son homogéneas, por ello, para reducir la dispersión se ha realizado una transformación de la variable IG mediante la raíz cuadrada. El análisis de la varianza factorial indica que tanto la dosis de Cu (p-valor = 0,0000) como el tiempo de envejecimiento, sin y con ramnolípido, (p-valor = 0,0000) afectan a la

raíz cuadrada del Índice de Germinación, además se ha encontrado interacción entre ambos factores ( $p$ -valor = 0,0364), por lo que se lleva a cabo el análisis de la varianza de rangos múltiples sobre los tratamientos.

La dosis de cobre aplicada afecta negativamente al Índice de Germinación haciendo que disminuya drásticamente a las dosis de 250 mg  $\text{kg}^{-1}$  de suelo. El envejecimiento del suelo (15 días) tanto en ausencia como en presencia de RL afecta significativamente al Índice de Germinación, con un efecto positivo, aunque este efecto depende de la dosis de cobre aplicada. El envejecimiento no tiene efecto en el suelo control (Cu-0 mg  $\text{kg}^{-1}$  de suelo) como era de esperar, pero a las dosis de 250 y 500 mg Cu  $\text{kg}^{-1}$  de suelo el tiempo de envejecimiento hace aumentar el índice de germinación significativamente, un 22,1% en el caso de la dosis de 250 mg Cu  $\text{kg}^{-1}$  y un 13% en la dosis de 500 mg Cu  $\text{kg}^{-1}$ . Cuando tras el envejecimiento se aplica el RL no se observa ningún efecto sobre el Índice de Germinación, salvo en el suelo control, en el que el IG aumenta al doble, este efecto puede deberse al carácter surfactante del RL que podría mejorar la humectación de las semillas y la retención de agua por parte del suelo.

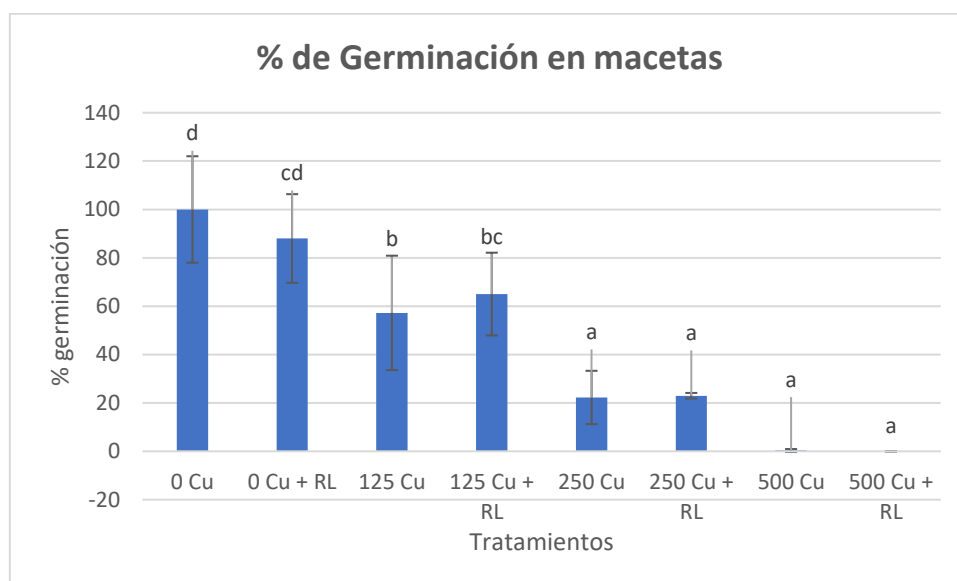
A la vista de los resultados obtenidos en este ensayo, se decide no seguir adelante con la dosis de 750 mg Cu  $\text{kg}^{-1}$  de suelo para los próximos ensayos que se van a realizar, ya que tanto los datos de % de germinación como de Índice de germinación obtenidos, demuestran que las semillas no germinarán a dosis de Cobre superiores a 500 mg Cu  $\text{kg}^{-1}$  de suelo. Se decide entonces, para realizar los próximos ensayos, introducir una dosis intermedia de 125 mg Cu  $\text{kg}^{-1}$  de suelo y utilizar las dosis de 0 mg Cu  $\text{kg}^{-1}$ , 125 mg Cu  $\text{kg}^{-1}$ , 250 mg Cu  $\text{kg}^{-1}$  y 500 mg Cu  $\text{kg}^{-1}$ .

### **4.3 Resultados de germinación en macetas (invernadero)**

Cuando las plantas del ensayo en invernadero habían alcanzado el estadio de 2 hojas verdaderas, se hace la primera recolección, como se ha explicado en el apartado de métodos utilizados en este trabajo. En este momento se hace recuento de las plantas que habían germinado por tratamiento y

repetición, pudiendo así hacer un estudio del porcentaje de germinación obtenido.

En el gráfico de la figura 37, se representa el % de germinación que se obtiene en macetas en los tratamientos al suelo: 0 mg Cu kg<sup>-1</sup>, 0 mg Cu kg<sup>-1</sup> + 1000 mg RL kg<sup>-1</sup>, 125 mg Cu kg<sup>-1</sup>, 125 mg Cu kg<sup>-1</sup> + 1000 mg RL kg<sup>-1</sup>, 250 mg Cu kg<sup>-1</sup>, 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> + 1000 mg RL kg<sup>-1</sup>, 500 mg Cu kg<sup>-1</sup>, y 500 mg Cu kg<sup>-1</sup> + 1000 mg RL kg<sup>-1</sup>.



**Figura 37: % de germinación obtenido en las macetas del ensayo en invernadero. N=3. Barras de error muestran las Desviaciones Estándar. Letras minúsculas diferentes indican medias estadísticamente diferentes (P<0,05).**

El análisis de la varianza factorial para los valores obtenidos de germinación, muestra que la dosis de cobre afecta al % de germinación, con un p-valor = 0,000, sin embargo la presencia de ramnolípido no afecta al porcentaje de germinación, con un p-valor = 0,8773, con un 95 % de confianza. Además se ha encontrado que no hay interacción entre los dos factores, con un p-valor = 0,7590.

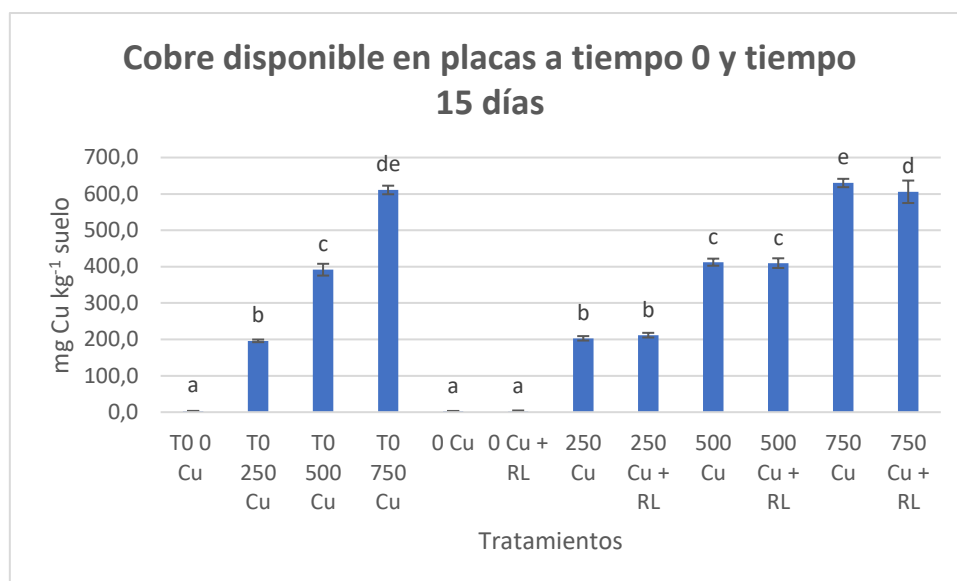
Según el análisis de la varianza de rangos múltiples, se obtienen los grupos homogéneos indicados con las letras que aparecen encima de las barras de medias del gráfico (Fig.37). Letras diferentes indican que hay diferencia significativa entre los tratamientos.

Se obtiene un descenso del % de germinación respecto al suelo control del 10% cuando se aplica ramnolípido, en torno al 40% cuando se aplica 125 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo, del 80% cuando se aplica la dosis de 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo y del 100 % en la dosis de 500 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo.

El efecto fitotóxico del cobre en la germinación de *Brassica juncea* en invernadero es, según los datos obtenidos, aún mayor que en los ensayos realizados en placa, con una reducción del 58% en la dosis de 250 Mg Cu kg<sup>-1</sup> y una reducción del 100% en la dosis de 500 mg Cu kg<sup>-1</sup>, puesto que no se obtuvieron plantas a esta dosis; esto puede ser debido a que las condiciones climáticas del invernadero (temperatura, aireación, humedad, etc) no son tan apropiadas para la germinación como el protocolo que se sigue en los ensayos de placa Petri, con uso de cámara de germinación y placas cerradas para conservar la humedad.

#### **4.4 Cobre disponible en el suelo de las placas para los diferentes tratamientos, a tiempo 0 y tiempo 15 días.**

En el gráfico de la figura 38, se muestra la media de los mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo que se extraen de las placas con AEDT, y posterior medida de disponibilidad mediante espectrofotometría de absorción atómica.



**Figura 38: Cobre disponible en los suelos de los tratamientos en placa, a tiempo 0 y tiempo 15 días. N=3. Barras de error muestran la Desviación Estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas ( $P < 0,05$ ).**

El análisis de la varianza factorial para los factores dosis de cobre y envejecimiento con ausencia y presencia de ramnolípido, sobre la disponibilidad de cobre, muestra que la dosis de cobre, con un  $p$ -valor = 0,000, influye en el cobre disponible extraído con AEDT, sin embargo, el envejecimiento del suelo, tanto con ramnolípido como sin ramnolípido, no influye en el cobre extraído, con un  $p$ -valor = 0,1011, para un nivel de confianza del 95%.

El análisis del contraste de rangos múltiples diferencia entre los grupos homogéneos señalados con letra minúscula. Letras diferentes exponen que hay diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Al aumentar la dosis de Cobre aplicada al suelo aumenta la concentración de Cobre disponible. Sin embargo, una parte del Cobre aplicado en los tratamientos queda retenida en el suelo. Las concentraciones medias de Cobre retenidas calculadas por diferencia, son también crecientes, aproximadamente de 50, 100 y 150 mg de Cu kg<sup>-1</sup> de suelo, lo que indica que el suelo tiene una cierta capacidad de retención de los iones Cu<sup>2+</sup>, que posiblemente quedan adsorbidos en la materia orgánica, minerales de la arcilla y/o óxidos e hidróxidos de Hierro. Por otra parte hay que tener en cuenta que la disolución de AEDT está

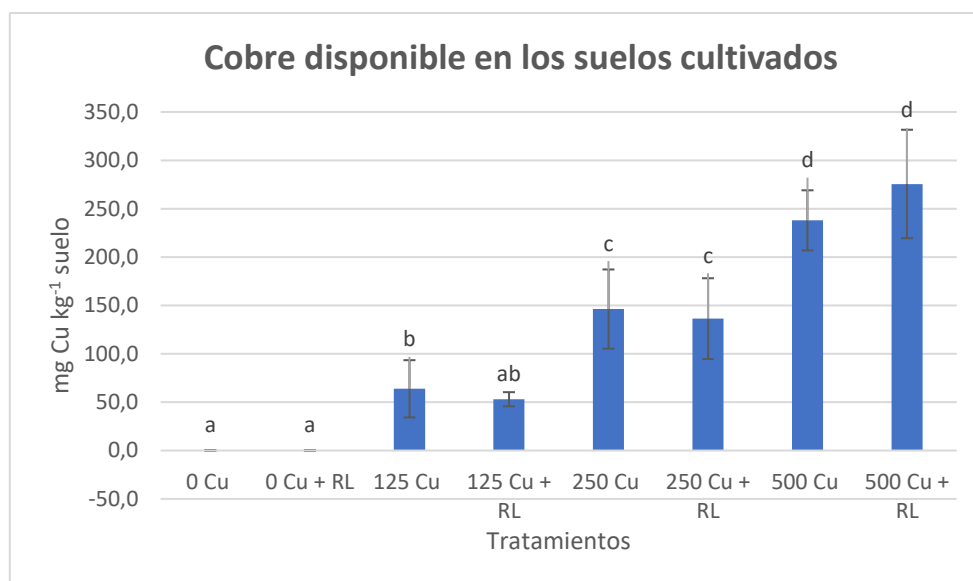
tamponada a pH 7,0 y al entrar en contacto con las muestras de suelo sufre sólo ligeros descensos de pH (entre 6,80 y 6,90) (Tabla 8).

Los ramnolípidos, debido a su naturaleza aniónica, pueden formar complejos y extraer metales del suelo, como por ejemplo el Cu (Mulligan, 2009). La constante de estabilidad del complejo calculada por Ochoa-Loza y col., (2001) es  $pK = 9,27$ . Según este autor es probable también la formación de complejos tipo 1:2 (metal:ligando). El orden de estabilidad de los complejos metal-ramnolípido encontrado por Ochoa-Loza y col. (2001) es  $Al > Cu > Ca$ . Estos autores indican que en suelos ácidos ( $pH < 5$ ) en donde predomina el ión  $Al^{3+}$  el ramnolípido tendría preferencias por este catión, aunque el ramnolípido tendería a precipitar, ya que su  $pK_a$  es de 5,6. En suelos básicos el ion  $Al^{3+}$  no estaría en disolución, pero la presencia de otros iones abundantes en la solución del suelo como el ion calcio podrían interferir sólo en el caso de que sus concentraciones fueran mucho más altas que la del ion  $Cu^{2+}$ .

El suelo que se utiliza en este ensayo tiene un pH ligeramente ácido ( $pH = 5,5$ ), el motivo por el que el ramnolípido no influye significativamente en la extracción de cobre puede deberse a esto, según explican estos autores.

#### **4.5 Cobre disponible en el suelo cultivado en macetas, una vez terminado el ensayo.**

En el gráfico de la figura 39 se muestra el Cobre disponible en el suelo en  $mg\ Cu\ kg^{-1}$  de suelo de los diferentes tratamientos del ensayo en macetas. Una vez terminado el ensayo en invernadero, se procede a homogeneizar el suelo de cada repetición y tratamiento, y se realiza extracción del cobre con AEDT, como se ha explicado en el apartado 3.2.4 de este trabajo, y posterior determinación por espectrofotometría de absorción atómica, explicado en el apartado 3.2.5.



**Figura 39: Cobre disponible en las macetas una vez terminado el ensayo en invernadero. N=3. Barras de error muestran la Desviación Estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas ( $P < 0,05$ ).**

El análisis de la varianza factorial para la variable dependiente (Cobre disponible en  $\text{mg kg}^{-1}$ ) y las variables independientes (dosis de cobre y presencia de ramnolípido), muestra que la dosis de cobre afecta a la disponibilidad de Cobre en el suelo, con un  $p$ -valor = 0,000, mientras que la presencia de ramnolípido no influye, con un  $p$ -valor = 0,7490, para un 95 % de confianza. No hay interacción entre ambos factores, resultando un  $p$ -valor = 0,5463.

El contraste múltiple de rangos diferencia entre los tratamientos que se muestran con letra minúscula, indicando diferencias significativas cuando las letras son diferentes.

Los ramnolípidos forman complejos con un amplio grupo de metales (Ochoa-Loza y col., 2001), contribuyendo a la descontaminación de los suelos (Juwarkar y col., 2007; Stacey y col., 2008), sin embargo algunos autores, en contraste con los citados anteriormente, no han encontrado una liberación significativa de metales de suelos contaminados (Franzetti y col., 2008). El efecto del pH ligeramente ácido de este suelo, puede haber influido en que no haya efecto significativo del ramnolípido en la extracción del cobre.

El método de extracción con una disolución de AEDT podría simular la extracción de metal por la raíz vegetal y su reemplazamiento a partir de la fase



sólida del suelo. Sin embargo, algunos factores como el contenido de materia orgánica del suelo, el contenido de óxidos e hidróxidos de metales, pH, etc, pueden afectar a la capacidad complejante del AEDT (Sims & Johnson, 1991).

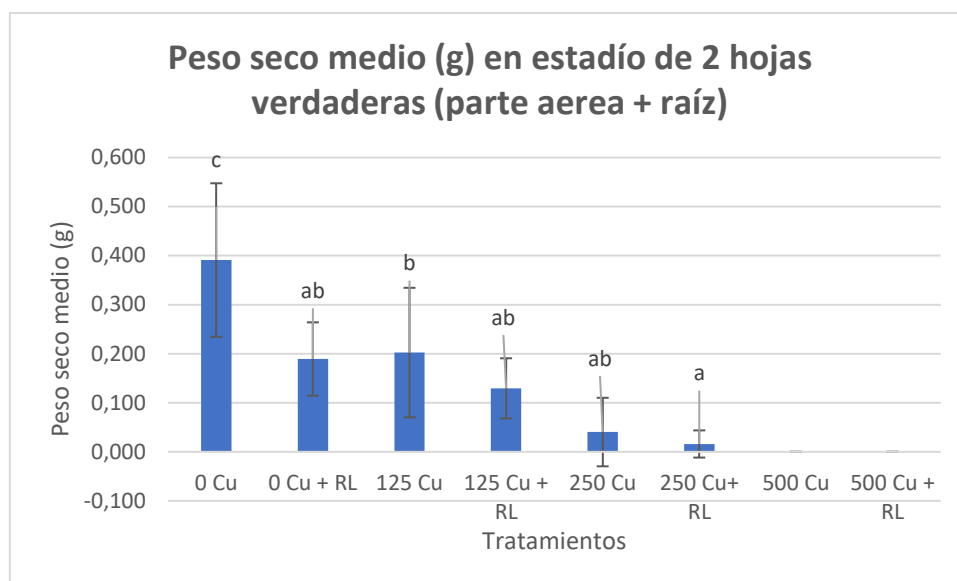
En general la disponibilidad de cobre en los suelos de los diferentes tratamientos son acordes al cobre que se añadió, obteniendo, como es lógico, por este método, una cantidad menor por la capacidad de adsorción que tienen las arcillas, (Giusti, 2001), dónde parte de ese cobre ha quedado fuertemente retenido. Por otra parte, el alto contenido de materia orgánica de este suelo ha sido un factor predominante para determinar la biodisponibilidad del Cobre (del Castillo y col., 1993), haciendo que quede más disponible para la extracción por AEDT.

Los resultados obtenidos, respecto a los que se obtuvieron en placas, muestran una reducción del cobre disponible del 28,5% para la dosis de 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> y del 42,5% para la dosis de 500 mg Cu kg<sup>-1</sup>, esta importante reducción, además de lo comentado anteriormente, podría deberse a la fijación del cobre en el suelo después de ciclos continuados de humectación-deseccación diarios.

#### **4.6 Resultados de Biomasa creada en el ensayo en macetas, a tres tiempos (estadio de 2 hojas verdaderas, estadio de botón floral y estadio de madurez de las plantas)**

##### **4.6.1 Biomasa obtenida en la primera recolección (estadio de 2 hojas verdaderas)**

En el gráfico de la figura 40 se muestran los datos obtenidos de biomasa seca en la primera recolección de plantas del ensayo en macetas, las cuales tenían 2 hojas verdaderas en el momento de la recolección, y se hacen pesadas de las plantas obtenidas en cada repetición, obteniendo las medias que se muestran en el gráfico.



**Figura 40: Peso seco (g) de las plantas obtenidas en estadio de 2 hojas verdaderas (primera recolección). N=3. Las barras de error muestran la Desviación Estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,5$ ).**

El análisis de la varianza factorial de las variable dependiente (peso seco) y las variables independientes (dosis de cobre y presencia de ramnolípido), muestra que la dosis de cobre influye en la biomasa obtenida, con  $p$ -valor = 0,0017, sin embargo la presencia de ramnolípido no influye, con  $p$ -valor = 0,0523, para un 95 % de confianza. No hay interacción entre ambos factores, obteniéndose un  $p$ -valor = 0,3017; esto indica que el efecto del ramnolípido no depende del nivel de cobre en el suelo.

El contraste de rangos múltiples da como resultado los grupos homogéneos representados en el gráfico con letras minúsculas, existiendo diferencias significativas entre los tratamientos con letras diferentes.

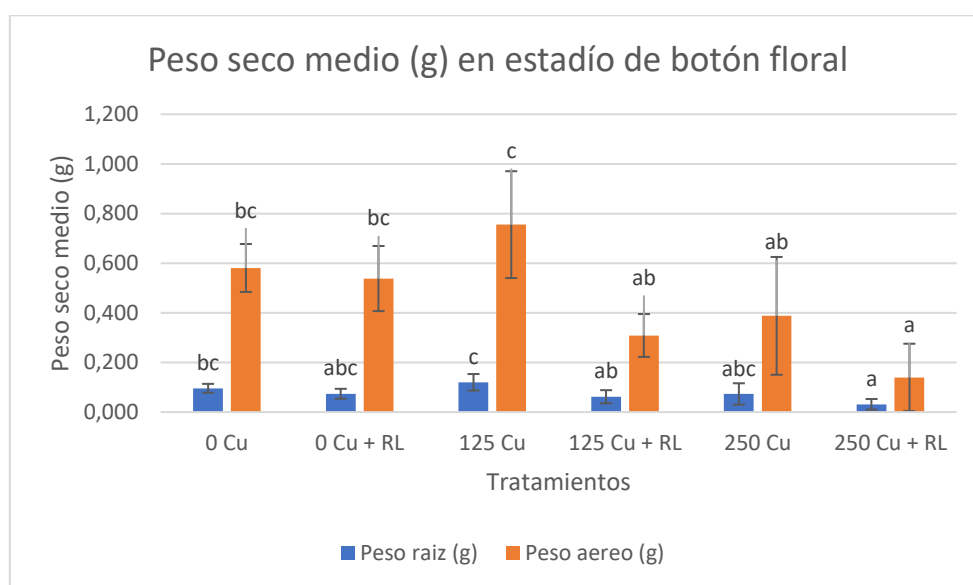
El aumento en la dosis de cobre tiene un efecto fitotóxico en la producción de biomasa en este primer estadio del desarrollo de las plantas de *Bassica juncea*.

En contraste con estudios anteriores donde se aplicó la dosis de 500 mg Cu kg<sup>-1</sup> en cámara de cultivo (Carvajal S., 2016), donde se obtuvieron resultados de germinación y producción de biomasa a esta dosis, los resultados que se obtienen en este ensayo, en macetas en invernadero, para esa dosis son nulos,

por tanto, las condiciones de cultivo influyen en el rendimiento que se obtiene en la producción de biomasa en suelos contaminados.

#### 4.6.2 Biomasa obtenida en la segunda recolección (estadío de botón floral)

Se hace una segunda recolección de material vegetal cuando las plantas han alcanzado el estadío de botón floral y se separan la parte aérea de la parte radicular de las plantas, que se pesan por repetición y tratamiento, obteniéndose los datos de peso medio (g) tanto de la parte aérea como de la parte radicular, representados en el gráfico de la figura 41.



**Figura 41: Peso seco de las plantas obtenidas en el estadío de botón floral (segunda recolección). N=3. Para cada serie las barras de error muestran la Desviación Estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,5$ ).**

Realizado el análisis de la varianza (anova factorial) de la variable peso seco aéreo, respecto a la dosis de cobre y presencia de ramnolípido, las dos variables independientes son influyentes en el peso seco aéreo obtenido en los tratamientos, ya que se obtiene un p-valor = 0,0207 para la dosis de Cobre, y un p-valor = 0,0102 para la presencia de ramnolípido, ambos valores menores de 0,05. No hay interacción entre los dos factores para el resultado obtenido de peso seco aéreo, con un p-valor = 0,1358.

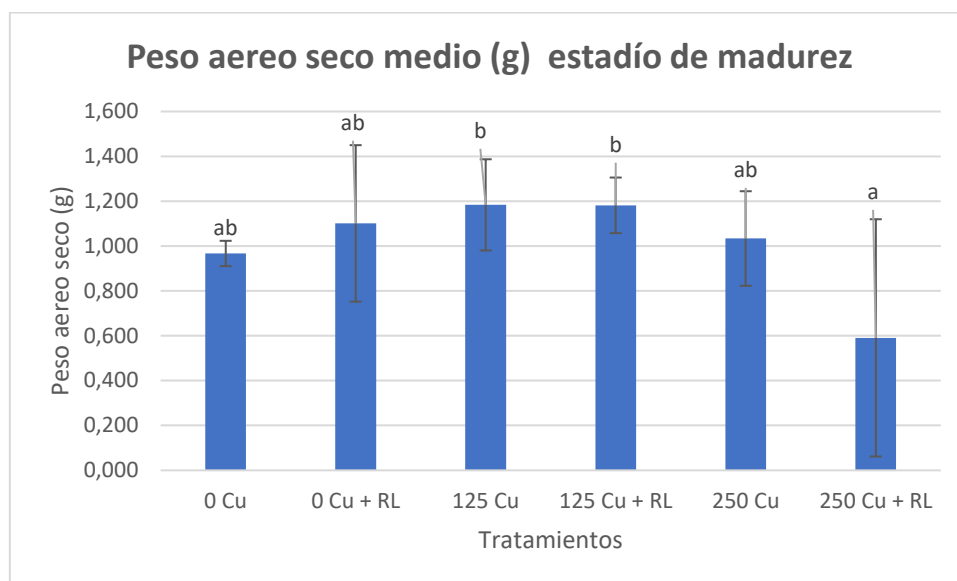
En la variable peso seco radicular no influye la dosis de cobre pero sí la presencia de ramnolípido, obteniéndose para ambas variables un p-valor = 0,0630 para la dosis de Cobre y un p-valor = 0,0075 para la presencia de ramnolípido. No hay interacción entre los dos factores para los resultados de peso radicular seco, con un p-valor = 0,5575, con un nivel de confianza del 95%.

El contraste de rangos múltiples tanto para peso seco aéreo como para peso seco radicular, teniendo en cuenta la conjunción de los dos factores (dosis de Cobre y presencia de ramnolípido), dan como resultado los grupos homogéneos señalados en el gráfico con letras minúsculas, de manera que letras diferentes representan grupos con diferencias significativas.

El tiempo que transcurre desde el estadio de 2 hojas verdaderas hasta el estadio de botón floral son 25 días. En este tiempo, el efecto fitotóxico tanto del cobre como del ramnolípido parecen haber disminuido, como demuestran los datos estadísticos mencionados. Esto puede deberse a la adsorción del cobre por parte del suelo (para los resultados obtenidos en dosis de cobre) y a la “maduración” de la molécula orgánica que es el ramnolípido (para los datos obtenidos en presencia de este biosurfactante). Quizás también la planta puede tener una cierta influencia a través de los exudados radiculares, de forma que los tratamientos con 125 y 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> no presentan reducción significativa de biomasa. Sin embargo el efecto combinado del tratamiento 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo + ramnolípido hace que disminuya la biomasa aérea y radicular de forma significativa.

#### **4.6.3 Biomasa obtenida en la tercera recolección (estadio de planta madura)**

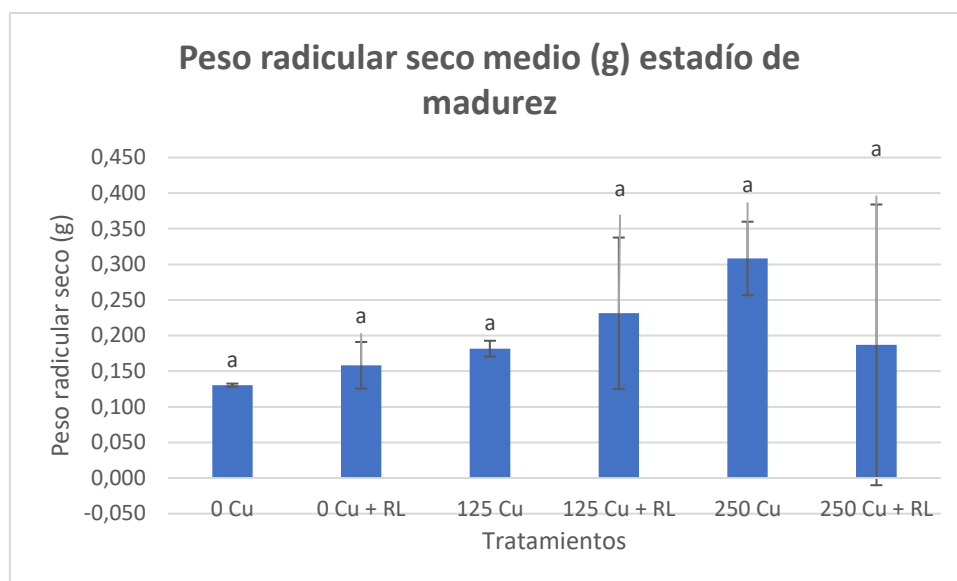
Una vez completado el ciclo biológico de las plantas de *Brassica juncea* del ensayo en macetas, éstas habían llegado a su estadio de madurez y habían producido semillas. En este momento se hace la tercera y última recolección de las plantas que quedan en las macetas, y se vuelve a realizar un estudio estadístico de la biomasa producida por repetición y tratamiento, obteniéndose los pesos secos medios tanto de la parte aérea como de la parte radicular del material vegetal, representados en la figura 42 y en la figura 43.



**Figura 42: Peso aéreo seco medio (g) obtenido en la tercera recolección (planta madura). N=3. Las barras de error muestran la Desviación Estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,5$ ).**

Se realiza estudio estadístico mediante un análisis de la varianza (anova factorial), para ver si las dosis de cobre y la presencia de ramnolípido aplicados en los diferentes tratamientos al suelo influyen en la biomasa aérea obtenida, y resultan un p-valor = 0,1397 para la dosis de Cobre y un p-valor = 0,4799 para la presencia de ramnolípido, por lo que ninguna de las dos variables influyen en la biomasa seca obtenida. No hay interacción entre ambos factores, ya que resulta un p-valor = 0,2386, siguiendo el criterio del 95% de confianza.

El contraste de rangos múltiples de ambas variables conjuntamente, da como resultado los grupos homogéneos descritos en la gráfica con letras minúsculas (letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos).



**Figura 43: Peso radicular seco medio (g) obtenido en la tercera recolección (planta madura). N=3. Las barras de error muestran la Desviación Estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,5$ ).**

Los valores medios de peso radicular obtenido en los diferentes tratamientos quedan indicados con las barras del gráfico de la figura 43, se hace análisis estadístico para ver si la dosis de cobre y la presencia de ramnolípido influyen en el peso radicular seco que se obtiene, resultando que ninguna de las dos variables influyen en el peso radicular:  $p$ -valor = 0,2473 para la dosis de cobre y  $p$ -valor = 0,7068 para la presencia de ramnolípido, ambos valores superiores a 0,05. No hay interacción entre ambos factores, resultando un  $p$ -valor = 0.2895.

El contraste de rangos múltiples para la variable dependiente (peso radicular seco) y la conjunción de ambos factores (dosis de cobre y presencia de ramnolípido) indica que sólo hay un grupo homogéneo, señalado en la gráfica con letra minúscula, esto puede ser debido a que hay una alta dispersión de los datos en los replicados de cada tratamiento, por esto no son significativos los efectos de los factores experimentales.

La obtención de mayor cantidad de biomasa tanto en los suelos contaminados con cobre como en presencia de ramnolípido, una vez las plantas han completado su ciclo biológico, puede ser debido a que parte del cobre se ha estabilizado en el suelo, siendo adsorbido por éste, y su fitotoxicidad por tanto

es menor. En cuanto al ramnolípido, que es una molécula orgánica, se observa que ha mejorado la estructura del suelo que lo contiene, obteniéndose plantas más vigorosas al final del ciclo en los tratamientos control + RL y 125 Cu + RL. Hasta la dosis de 125 mg Cu kg<sup>-1</sup>, la presencia de ramnolípido parece mejorar el desarrollo de las plantas en esta fase final del crecimiento. Para la dosis de 250 mg Cu kg<sup>-1</sup>, el ramnolípido hace que el cobre esté más disponible para la absorción por parte de las plantas, y a esta dosis, produce un efecto más fitotóxico que en el tratamiento sin ramnolípido.

#### 4.7 Tasa de crecimiento relativo (TCR)

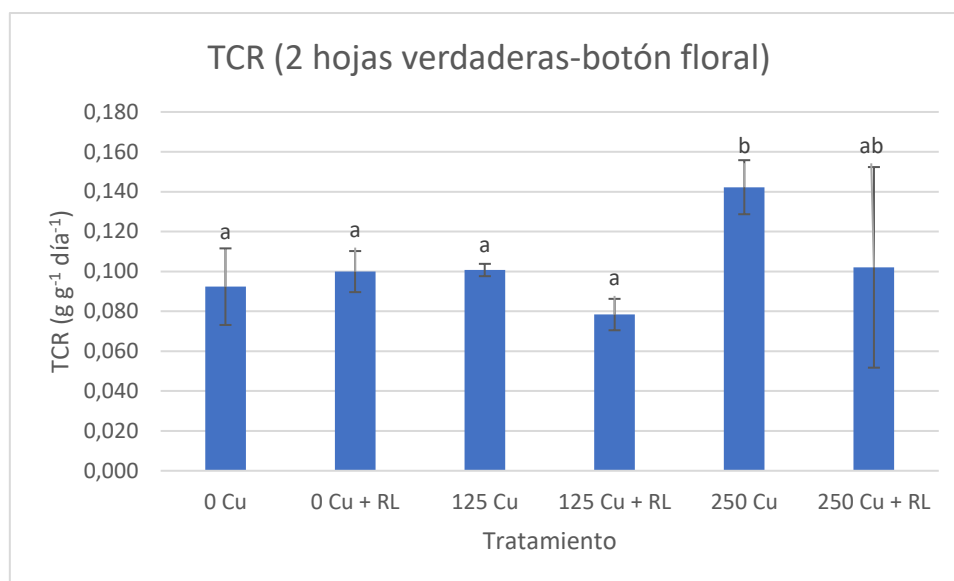
Las plantas obtenidas en las tres recolecciones que se hacen durante el ensayo en macetas, fueron secadas en estufa a 60 °C durante 48 horas hasta obtener un peso seco constante.

Se calcula la Tasa de crecimiento relativo en los periodos desde la primera a la segunda recolección y desde la segunda a la tercera: (2 hojas verdaderas-botón floral y botón floral-madurez), con la siguiente fórmula:

$$\text{TCR} = (\ln \text{BSf} - \ln \text{BSi}) D^{-1} (\text{g g}^{-1}\text{día}^{-1}).$$

Donde: BSf es la biomasa seca al final del periodo, BSi es la biomasa seca al inicio del periodo y D son los días que dura el periodo.

Los resultados obtenidos de TCR para los diferentes tratamientos están representados en los gráficos de la figura 44 (TCR 2 hojas verdaderas-botón floral) y de la figura 45 (TCR botón floral-madurez)



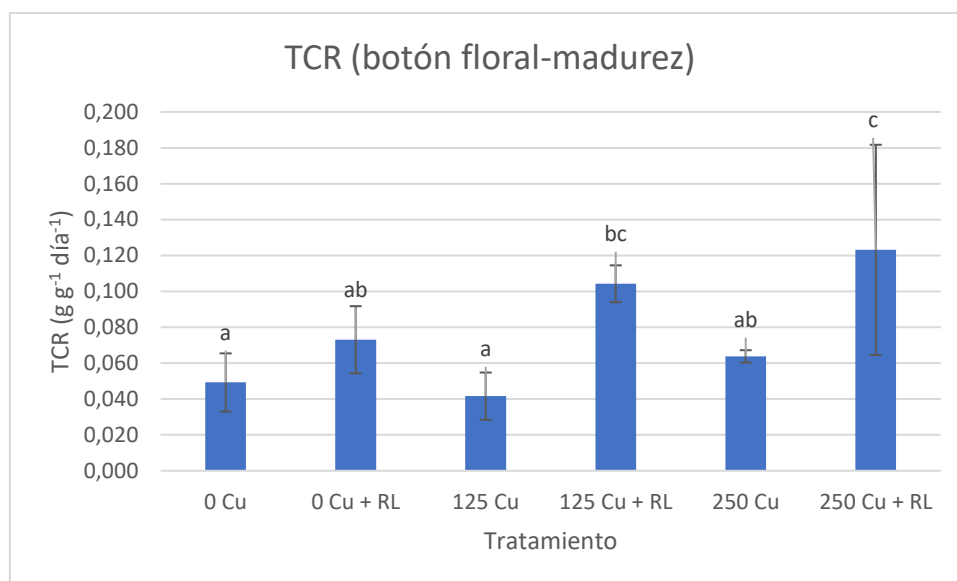
**Figura 44: Tasa de crecimiento relativo desde el estadio de 2 hojas verdaderas hasta el estadio de botón floral (TCR1). N=3. Las barras de error muestran las Desviaciones Estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,5$ ).**

El análisis de la varianza para los efectos principales (dosis de cobre y presencia de ramnolípido), muestra que tanto la dosis de cobre como la presencia de ramnolípido no influyen en la TCR1, para un nivel de confianza del 95 %, con un p-valor = 0,0790 para la dosis de cobre y con un p-valor = 0,1334 para la presencia de ramnolípido. Además se encuentra que no hay interacción entre los dos factores: p-valor = 0,2364.

El análisis de rangos múltiples distingue entre los grupos señalados con letra minúscula, resultando diferencia significativa entre grupos cuando las letras son diferentes.

A pesar de que se obtiene mayor germinación de las plantas en los suelos control y 125 mg Cu kg<sup>-1</sup>, se observa, que la TCR en la dosis de 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> es mayor. Este dato, pone de manifiesto, que el efecto fitotóxico a estas dosis afecta a la germinación en gran medida, pero una vez alcanzado el estadio de plántula con 2 hojas verdaderas, la producción de biomasa llega a ser incluso más rápida en los suelos contaminados con 250 mg Cu kg<sup>-1</sup>.





**Figura 45: Tasa de crecimiento relativo desde el estadio de botón floral hasta el estadio de madurez (TCR2). N=3. Las barras de error muestran las Desviaciones Estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,5$ ).**

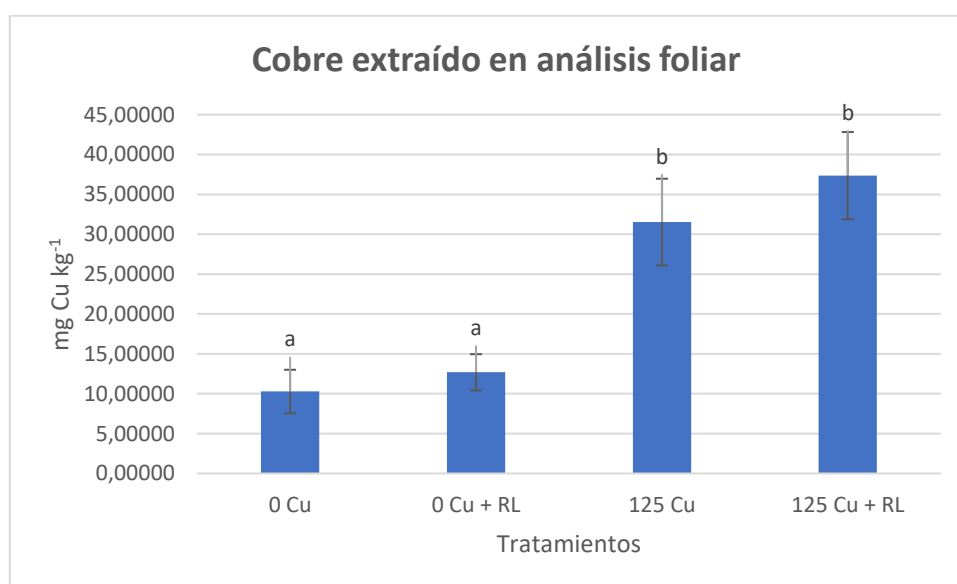
Una vez realizado análisis de la varianza, para ver la influencia de los factores dosis de cobre y presencia de ramnolípido en la tasa de crecimiento relativo que se obtiene en los distintos tratamientos, desde el estadio de botón floral hasta el estadio de madurez, se observa que la dosis de cobre no afecta a los valores de TCR obtenidos, con un  $p$ -valor = 0,1437, sin embargo la presencia del ramnolípido sí afecta, con un  $p$ -valor = 0,0018. No hay interacción entre ambos factores:  $p$ -valor = 0,4053.

El análisis de rangos múltiples indica las diferencias significativas entre los grupos señalados con letras minúsculas diferentes.

En este intervalo de estadios del desarrollo, se observa en la gráfica un aumento significativo de esta tasa en los tratamientos que contienen ramnolípido. Se pudo apreciar, que las plantas que crecían en suelo con ramnolípido, se desarrollaron más tarde que las que no contenían ramnolípido, y llegaron a producir más biomasa al final del ciclo. Los suelos que contenían ramnolípido conservaban una mejor estructura y capacidad de mantener la humedad, por lo que las plantas en la última fase de su desarrollo denotaban mayor vigorosidad en los suelos tratados con JBR-425.

#### 4.8 Análisis foliar. Concentración de cobre en la parte aérea determinado por ICP óptico.

Se hace una determinación del cobre presente en la parte aérea de las plantas en el momento de mayor extracción (botón floral), mediante el método: ICP óptico. El material vegetal en el que se realiza este análisis, es el procedente de los tratamientos: control (0 mg Cu kg<sup>-1</sup>), 0 mg Cu kg<sup>-1</sup> + 1000 mg RL kg<sup>-1</sup>, 125 mg Cu kg<sup>-1</sup> y 125 mg Cu kg<sup>-1</sup> + 1000 mg RL kg<sup>-1</sup>. De esta manera puede estudiarse si la presencia de cobre y de ramnolípido influyen en el cobre extraído por las plantas desarrolladas en macetas con dichos tratamientos, obteniéndose unos valores medios de cobre en el material vegetal aéreo representados en el gráfico de la figura 46. No se realiza el análisis de los tratamientos 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> y 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> + 1000 mg RL kg<sup>-1</sup>, debido a que no se obtuvo la cantidad de biomasa aérea suficiente (250 mg de peso seco aéreo), que exigía este análisis, en todos los replicados.



**Figura 46: Valores medios de cobre (mg kg<sup>-1</sup>) obtenidos mediante determinación por ICP óptico, en la parte aérea de las plantas en el estadio de botón floral. N=3. Las barras de error muestran las Desviaciones Estándar. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas (p<0,5).**

El análisis estadístico muestra que la dosis de cobre es significativa respecto al resultado de determinación de cobre en el análisis foliar, con un 95 % de confianza, obteniéndose un p-valor = 0,000 en el análisis factorial de la

varianza, sin embargo la presencia de ramnolípido no influye en el cobre extraído por las plantas, con un p-valor = 0,1173, a pesar de que en la gráfica se aprecia un ligero aumento del cobre determinado en el análisis foliar de las plantas que estuvieron con presencia de este biosurfactante. No hay interacción entre ambos factores: p-valor = 0,5055.

El análisis de rangos múltiples da como resultado la presencia de los dos grupos señalados en la gráfica con letras minúsculas, los cuales presentan diferencias significativas respecto a la variable medida (concentración de cobre en la parte aérea de la planta).

La concentración de cobre en la solución del suelo afectó significativamente a la concentración de cobre en los tejidos vegetales aéreos, de manera que los suelos más contaminados produjeron plantas con mayor concentración de cobre en sus tejidos. Las plantas de *Brassica juncea* poseen la capacidad de acumular varios metales (Bernal y col., 2007; Delgadillo-López y col., 2011).

Según Covarrubias y Peña Cabriales (2017), las plantas al ser expuestas a metales pesados pueden presentar diferentes respuestas fisiológicas, las cuales varían dependiendo de la especie de la planta, el metal específico al que es expuesta y la concentración en el suelo del mismo. Con base en dichas respuestas las plantas pueden clasificarse en tres tipos: excluyentes, indicadoras y acumuladoras de metales pesados.

a) Excluyentes: son aquellas plantas donde la acumulación de metales en la parte aérea es mucho menor respecto a la concentración de metales en el suelo.

b) Indicadoras: aquellas plantas donde la acumulación de metales en el tejido aéreo guarda una relación lineal respecto a la concentración del suelo.

c) Acumuladoras: plantas donde la acumulación de metales en su parte aérea es mucho mayor que la concentración de metales en el suelo.

Para estos mismos autores, la fitorremediación de suelos contaminados por metales pesados presenta dos vertientes: la fitoestabilización y la fitoextracción. En la fitoestabilización se buscan especies del tipo excluyente, que acumulen gran cantidad de metales en la raíz, evitando que estos puedan

transferirse a la parte aérea y así estar disponibles para otros seres vivos. En cambio, en la fitoextracción se buscan especies del tipo acumuladoras, donde el contaminante sea transportado desde la raíz hasta los brotes aéreos, para que después pueda ser cosechado y confinado.

La adecuación de una especie vegetal a un tratamiento de fitorremediación, deberá tener en consideración los siguientes parámetros: el factor de bioconcentración (FBC) y el factor de traslocación (FT) (Olguín y Sánchez-Galván 2012; Ali y col. 2013).

El FBC refleja la eficiencia de la planta para acumular el metal que proviene del suelo en su tejido.

$$\text{FBC} = \frac{\text{concentración de metal en tejido}}{\text{concentración de metal en el suelo}}$$

Mientras que el FT indica la eficiencia para transportar el metal de la raíz a su parte aérea, se calcula de la siguiente manera:

$$\text{FT} = \frac{\text{concentración de metal en la parte aérea}}{\text{concentración de metal en la raíz}}$$

Una planta puede considerarse acumuladora si su FT es igual o mayor a 1, mientras aquellas que tienen la capacidad de acumular desde 5 hasta 500 veces más que el promedio se les denomina “hiperacumuladoras”.

Los resultados obtenidos permiten calcular un FBC en torno a 0,3 para las plantas que han crecido en el suelo tratado con 125 mg Cu kg<sup>-1</sup>, lo que supone una capacidad de bioconcentración de Cobre media según Kabata-Pendia (2000). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Bernal y col. (2007) en un estudio de fitorremediación con mostaza parda, llevado a cabo en Aznalcollar sobre un suelo contaminado por un vertido de lodos ácidos de minería, con un contenido de 202 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo. Estos autores encontraron concentraciones mayores de cobre en la parte aérea de plantas que en raíz y tallo. Reportan valores medios de cobre en hojas de unos 37 mg kg<sup>-1</sup>, oscilando entre 20 y 60 mg kg<sup>-1</sup>, mientras que en raíces y tallos los valores medios son de unos 10 mg kg<sup>-1</sup>, no alcanzan en ningún caso los 20 mg kg<sup>-1</sup>. De forma que se podría calcular un FBC = 0,2, variando en un rango entre 0,1 y 0,3.

También podría calcularse el FT de 3,7, valor que podría oscilar entre 2 y 6, lo que situaría a la mostaza parda en el grupo de plantas acumuladoras.

Teniendo en cuenta que el Cobre tiene una movilidad relativamente baja respecto a otros elementos en las plantas, ya que permanece en los tejidos de las raíces y hojas hasta su senescencia, los tejidos jóvenes son los que primero presentan síntomas de deficiencia de Cobre. El exceso de cobre suele presentarse con valores de  $300 \text{ mg Cu kg}^{-1}$  de suelo, con alteraciones que se manifiestan en las raíces, que tienden a perder vigor, adquirir color oscuro y a engrosarse, sin desarrollo (Navarro, 2000). Este autor señala que junto a estas alteraciones suelen presentarse síntomas de deficiencia de hierro, debido a que el cobre en exceso actúa en reacciones que afectan al estado de oxidación del hierro limitando su absorción y translocación en la planta. También señala que altos niveles de cobre reducen notablemente la captación de fósforo por la planta.

En este ensayo no se apreciaron síntomas de deficiencia de hierro ni de fósforo en ninguno de los tratamientos, esto puede tener relación con el pH de este suelo, que es ligeramente ácido, y la baja cantidad de carbonatos, que no impidieron que el hierro y el fósforo estuvieran disponibles para la planta.

Según Liao y col., (2000) en la savia xilemática de las plantas el Cobre se encuentra casi un 100% ligado a aminoácidos, aún bajo condiciones de suplemento excesivo de Cu. Esto sugiere que aún bajo condiciones de toxicidad de Cu, las plantas lo complejan, minimizando el daño potencial de altas concentraciones de iones libres de Cobre (Welch, 1995).

En cuanto al rendimiento general obtenido de la técnica de fitoremediación y con los resultados obtenidos, se puede señalar que la proporción de Cobre extraído en planta está en torno a  $31,5 \text{ mg Cu kg}^{-1}$  de parte aérea, en el suelo contaminado con  $125 \text{ mg Cu kg}^{-1}$  de suelo, estos resultados coinciden con los obtenidos por Bernal y col., (2007), quienes encontraron concentraciones de cobre en hojas de unos  $37 \text{ mg kg}^{-1}$ , oscilando entre 20 y  $60 \text{ mg kg}^{-1}$ , en plantas desarrolladas sobre suelos con  $202 \text{ mg kg}^{-1}$  de suelo.

#### 4.9 Rendimiento de la técnica de fitoextracción.

Con los resultados obtenidos de germinación, biomasa aérea creada y cobre extraído por las plantas de *Brassica juncea* en los tratamientos: 125 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo y 125 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo + 1000 mg RL kg<sup>-1</sup> de suelo, puede hacerse una estimación del rendimiento de la técnica de fitoextracción y fitoextracción asistida (Tabla 9).

**Tabla 9: Rendimiento de la técnica de fitoextracción en el estadio de botón floral.**

Tratamiento	% Germinación	Biomasa seca aérea planta en macetas (g kg <sup>-1</sup> suelo)	Cu extraído por ICP óptico (mg kg <sup>-1</sup> )	Rendimiento de la técnica de fitoextracción Por cosecha %	Nº de cosechas necesarias para 100 % de extracción
125 Cu	57,24	0,38	31,53	0,016	6250
125 Cu + RL	65,02	0,16	37,36	0,008	12500

Se calcula el rendimiento de la fitoextracción proponiendo el objetivo de extraer Cu hasta alcanzar el nivel de referencia de los suelos en Andalucía (Junta de Andalucía, 1999). Este nivel de referencia para suelos de pH < 7 es de 50 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo. Para los tratamientos con 125 mg kg<sup>-1</sup> supone un objetivo de extracción de 75 mg Cu kg<sup>-1</sup>.

En una cosecha se extraería el 0,016 % del requerido para alcanzar el objetivo de descontaminación. La presencia de RL hace que este % sea mucho menor, debido a que el incremento en Cu acumulado en la parte aérea no compensa la pérdida de biomasa seca.

La fitorremediación es una técnica de bajo costo, sin embargo, la eficacia en las condiciones de este ensayo es muy baja, ya que para lograr el objetivo del nivel de referencia serían necesarias más de 6000 cosechas, y más de 12000 en el caso de añadir RL, lo que hace inviable esta técnica en el tiempo. Esto está de acuerdo con Bernal, y col., (2007) que en condiciones de campo calcularon un número de 48000 cosechas necesarias para su objetivo de extracción de 149 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo.

En el momento de botón floral, la biomasa recogida es el 60% de la producida en ese momento, ya que se dejó un 40% hasta que completaran su

ciclo (estadío de maduración de frutos). Considerando el 100% de la biomasa producida en el estadío de botón floral, los rendimientos anteriores estarían multiplicados por 1,67, resultando 0,027% para el tratamiento de 125 mg Cu kg<sup>-1</sup> y de 0,013% para el tratamiento 125 mg Cu kg<sup>-1</sup> + 1000 mg RL kg<sup>-1</sup>. El número de cosechas necesarias se reducirían en un 60%.

Teniendo en cuenta que se había hecho una primera recolección cuando las plantas tenían dos hojas verdaderas, y realizando una estimación del rendimiento de la técnica de fitoextracción sobre el total de plantas obtenidas antes del aclareo, se obtienen los resultados de rendimiento expresados en la tabla 10.

**Tabla 10: Estimación del rendimiento de la técnica de fitoextracción. Cálculo según número de plantas viables obtenidas en el estadío de 2 hojas verdaderas (antes del aclareo).**

Tratamiento	% Germinación	Biomasa seca aérea estimada planta en macetas (g kg <sup>-1</sup> suelo)	Cu extraído por ICP óptico (mg kg <sup>-1</sup> )	Rendimiento estimado de la técnica de fitoextracción Por cosecha %	Nº de cosechas necesarias para 100 % de extracción
125 Cu	57,24	1,72	31,53	0,072	1389
125 Cu + RL	65,02	1,63	37,36	0,068	1470

En las condiciones de este ensayo, incluso en las mejores previsiones de producción de biomasa, los resultados obtenidos de rendimiento, tanto en presencia como en ausencia de ramnolípido, indican rendimientos bajos (inferiores a 0,1) y un alto número de cosechas necesarias para conseguir reducir la contaminación hasta el nivel de referencia de los suelos andaluces (50 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo), por tanto esta técnica estaría recomendada para suelos con menor grado de contaminación que los utilizados en este estudio.

*Brassica juncea* podría estar recomendada como planta indicadora para el seguimiento de los procesos de atenuación natural de la contaminación.

## **5. CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

- El índice de germinación de *Brassica juncea* en placa Petri está por debajo del 15% respecto al suelo control cuando la dosis de cobre en el suelo es de 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo y en torno al 0% con las dosis de 500 y 750 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo, concluyendo con estos datos el efecto fitotóxico del cobre en la germinación.
- La elongación radicular que se obtiene durante la germinación de las semillas de *Brassica juncea* en placa Petri, depende de la textura del suelo y la presencia de nutrientes, obteniéndose raíces un 75% más pequeñas en el suelo control que en la arena, afectando esto a los valores comparativos del índice de germinación.
- El envejecimiento del Cobre en el suelo, tanto en ausencia como en presencia de ramnolípido, afecta al índice de germinación en placa Petri, con un efecto positivo, aunque este efecto depende de la dosis de Cobre aplicada, con incrementos del 22,1% y 13,0% en las dosis de 250 y 500 mg Cu kg<sup>-1</sup> respectivamente.
- El ramnolípido por sí mismo afecta al índice de germinación de *Brassica juncea* obteniéndose un índice de germinación por debajo del 40% respecto al control a la dosis de 250 mg/l, entorno a un 10% en las dosis de 500 y 750 mg/l, y algo superior al 20% en la dosis de 1000 mg/l.
- La aplicación de ramnolípido a los suelos contaminados en placa Petri no afecta al índice de germinación, pero lo aumenta al doble en el suelo control, debido a su capacidad surfactante-humectante.
- La germinación de *Brassica juncea* en invernadero se ve más afectada por el efecto fitotóxico del cobre que en los ensayos en placa Petri, debido a las condiciones climáticas diferentes, con una reducción del 58% en la dosis de 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> y del 100% en la de 500 mg Cu kg<sup>-1</sup>, ya que no se obtuvieron plantas a esta dosis.

- Las dosis de cobre añadidas a los suelos influyen en la extracción y determinación de Cobre del suelo tanto en placas como en macetas, sin embargo, el ramnolípido no afecta, debido posiblemente al pH ligeramente ácido de este suelo, y la preferencia del ramnolípido por otros cationes como el  $Al^{3+}$ .
- El cobre disponible, extraído con AEDT, en los suelos del ensayo en macetas, es menor que en las placas Petri a cualquiera de las dosis de cobre aplicadas, debido a un proceso de envejecimiento de este suelo durante el desarrollo del cultivo, obteniéndose una reducción del 28,5% en la dosis de 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> y del 42,5% en la dosis de 500, por lo que se concluye, que ha tenido lugar un proceso natural de atenuación de la contaminación.
- La biomasa de *Brassica juncea* que se obtiene en el estadio de 2 hojas verdaderas, se ve afectada por la fitotoxicidad que produce la dosis de cobre pero no es afectada por la presencia de ramnolípido. La biomasa que se obtiene en el estadio de botón floral está afectada por la fitotoxicidad de ambos factores en la biomasa aérea, y sólo por la dosis de cobre en la biomasa radicular. En la biomasa de la planta madura no afecta ninguno de los dos factores. Por lo que se concluye que el cobre y el ramnolípido tienen efectos fitotóxicos para la germinación y primeros estadios de la planta, pero no para el ciclo final del desarrollo.
- La tasa de crecimiento relativo que se mide en el período: 2 hojas verdaderas-botón floral, es mayor en el suelo contaminado con 250 mg Cu kg<sup>-1</sup> de suelo que en el suelo control, por tanto, esta dosis de cobre afecta negativamente a la germinación pero no al crecimiento de las plantas de *Brassica juncea*. La presencia de ramnolípido no afecta a la TCR en este período. En el periodo: botón floral-madurez, la dosis de cobre no afecta a los valores obtenidos de TCR, sin embargo la presencia de ramnolípido si afecta a estos valores, obteniéndose valores de TCR mayores en los suelos con presencia de ramnolípido, por lo que se concluye, que el ramnolípido mejora las condiciones de cultivo una vez envejecido en el suelo.

- La concentración de cobre en la parte aérea de las plantas (31,5 mg Cu kg<sup>-1</sup> de planta) crecidas en el suelo contaminado con 125 mg Cu kg<sup>-1</sup>, triplica la concentración presente en las plantas crecidas en el suelo control, por lo que se pone de manifiesto la capacidad acumuladora de metales de *Brassica juncea*; la presencia de ramnolípido aumenta la extracción por parte de la planta en un 20% de media, aunque no se pudo estimar el efecto debido a la dispersión de los datos.
- El rendimiento general de la técnica de fitoremediación pone de manifiesto la capacidad de fitoextracción y acumulación de metales de *Brassica juncea*, pero a su vez, la necesidad de utilizar esta técnica a concentraciones del contaminante tolerable para la planta y de producir una gran cantidad de biomasa vegetal para que la técnica resulte efectiva. El número de cosechas necesarios para recuperar un suelo con los niveles de cobre utilizados en este trabajo, haría que la técnica resulte inviable por el tiempo que requiere. *Brassica juncea* podría estar recomendada como planta indicadora para el seguimiento de los procesos de atenuación natural de la contaminación.



## **6. BIBLIOGRAFÍA**

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Ali H., Khan E. y Sjad M.A. (2013).** Phytoremediation of heavy metals-concepts and applications. *Chemosphere* 91, 869-881.
- Alloway B.J. (ed). (1995).** Heavy Metals in soils. Blackie Academic and Profesional. Londres.
- Baird, C. (1999).** Environmental Chemistry. 2nd Ed. W.H. Freeman & Company.
- Baize D. (1997).** Teneur totales en elements traces metalliques dans les sols (France). INRA editions. Paris. Francia.
- Baker DE y Senft JP. (1995).** Heavy Metals in soils. Alloway B.J. (ed). Capítulo 8. Blackie Academic and Profesional. Londres.
- Banat, I., Makkar, R., Cameotra, S. (2000).** Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbial. 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. Microbial. 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.

- Bernal M.P., Clemente R., Vazquez S., Walker D.J. (2007).** Aplicación de la fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar . Ecosistemas. 2007/2 68-82  
URL:[http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=483&Id\\_Categoría=2&tipo=portada](http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=483&Id_Categoría=2&tipo=portada) ; [Fecha de consulta 20/8/2018]
- 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.
- Bowen, H.J.M. (1979).** Environmental chemistry of the elements. Academic Press, London.
- Brecke, S. (1991).** "Growth under stress: heavy metals". En: Waisel, Y., Eshel, A., Kafkaffi, V., (eds.) "Plant roots: the hidden half", pp. 351-373. Marcel Dekker, Inc., New York.
- 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.
- Carvajal S. (2016).** TFG: Efecto de la aplicación de ramnolípido en la fitoextracción de cobre por plantas de *Hordeum vulgare* y *Brassica juncea* en suelos contaminados artificialmente, p. 65.
- CEBAS.(2018).**URL:[www.cebas.csic.es/documentos/documentos\\_ionomica/MET-ICP%20Rev%201.doc](http://www.cebas.csic.es/documentos/documentos_ionomica/MET-ICP%20Rev%201.doc) [Fecha de consulta: 28/07/2018]
- 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.
- CITIUS. (2018).** URL:<https://investigacion.us.es/scisi/sgi/servicios/invernadero>  
[Fecha de consulta: 3/08/2018]

- Collings G.H. (1969).** Fertilizantes comerciales. Sus fuentes y usos. Edición Cubana. Revolución. La Habana: Instituto del libro. Cuba.
- Colombo, L.D., Mangione, S.B., Figlioglia. (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.
- Covarrubias, S. A. y Peña Cabriales, J. J. (2017).** Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 33 (Especial Biotecnología e ingeniería ambiental) 7-21, 2017 DOI: 10.20937/RICA.2017.33.esp01.01
- 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.
- Del Castilho, P., Chardon, W.J. and Salomons, W. (1993).** Influence of cattlemanure slurry application on the solubility of cadmium, copper, and zinc in a manured acidic, loamy-sand soil. *Environ. Qual.* 22: 689-697.
- Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R. y Acevedo-Sandoval, O. (2011).** Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and subtropical agroecosystems*,14(2),597-612.  
URL:[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-04622011000200002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-04622011000200002&lng=es&tlng=es) ; [Fecha de consulta 1/09/2018]
- Desai, J., Banat, I. (1997).** Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(1): 47–64.
- Domenech, X. (1993).** Química ambiental. El impacto ambiental de los residuos. Ed. Miraguano Ediciones. Madrid.



- Duran-Altisent, J.M. & F. Perez-García. (1984).**- Aspectos fisiológicos de la germinación de las semillas. E.T.S.I.A. Universidad Politécnica de Madrid, 245 pp.
- 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.
- Franzetti, A., Betetti, G., Caredda, P., La Colla, P. (2008).** Washing of hydrocarbon and metal contaminated soils with emulsifiers from *Gordonia* sp. strain BS29. *Consoil 2008: Theme E – Remed. Concepts & Techn.* Vols 1-3, 559-568.
- Fuentes Yagüe JL. (1999).** El suelo y los fertilizantes, José Luis Fuentes Yagüe, 5ª edición revisada y ampliada. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Ediciones Mundiprensa, Madrid, 1999.
- Giusti, L. (2001).** Heavy metal contamination of brown seaweed and sediments from the UK coastline between the Wear River and the Tees River. *Environ. Int.* 26:275- 286.
- Gulson, B.L., Mizon, K.J., Korsch, M.J., Howarth, D. (1996).** Non-orebody sources are significant contributors to blood lead of some children with low to moderate lead exposure in a mayor mining community. *Sci. Tot. Environ.* 181: 223-230.
- Hund-Rinke, K., Kördel, W. (2003).** Underlying issues in bioaccessibility and bioavailability: experimental methods. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56: 52-62.
- International Seed Testing Association (ISTA). (2005).** International Rules for Seed Testing. Bassersdorf, CH–Switzerland.

**International Seed Testing Association (ISTA). (2003).** International Rules for Seed Testing. Edition 2003.

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

**Junta de Andalucía (1999).** “Los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado en Andalucía y la metodología y técnicas de toma de muestra y análisis para su investigación”. Revisión de Normativa y Umbrales de contaminación. Pg.136. URL:<http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/porta/web/menuitem.7e1cf46ddf59bb227a9ebe205510e1ca?vgnextoid=47dbbb45c8bab010VgnVCM1000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=2896a7aaaf4f4310VgnVCM2000000624e50aRCRD>. [fecha de consulta 20/08/2018].

**Juwarkar, A.A., Nair, A., Dubey, K.V., Singh, S.K., Devotta, S., (2007).** Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. Chemosphere 68, 1996-2002.

**Kabata-Pendias. (2000).** Trace elements in soils and plants. CRC Inc. Boca Raton. USA. Pg 305-413.

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

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

**Kitamoto, D., Isoda, H., Nakahara, T. (2002).** Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers. J. Biosci. Bioeng. 94(3): 187-201.

- Liao, M.T., Hedley, M.J., Woolley, D.J., Brooks, R.R. and Nichols, M.A. (2000a).** Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Rondy) plants grown in NGT system. I. Copper uptake and distribution in plants. *Plant and Soil*. 221: 135-142.
- Liao, M.T., Hedley, M.J., Woolley, D.J., Brooks, R.R. and Nichols, M.A. (2000b).** Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Rondy) plants grown in NGT system. II. The role of nicotianamine and histidine in xylem sap copper transport. *Plant and Soil*. 223: 243-252.
- Lindsay, W.L., (1979).** *Chemical Equilibria in Soils*. J. Willey and Sons.
- Lovaglio, R., Dos Santos, F., Jafelicci, M., y Contiero, J.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011. 85: 301-305. 8.
- 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*, 3ª ed. Edit. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.
- Métodos oficiales de análisis. Tomo 3. Ed Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. (1986).**
- Muenschler, W.C. (1995).** *Weeds*, 2ª ed. Macmillan. Nueva York, E.U.A.
- Mulligan, C. (2009).** Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Colloids & Interface Science*, 14: 372-378.

**Murillo y col. (1995).** Actas de Horticultura, Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Diputación de Sevilla. EUITA "Corjijo de Cuarto".

**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.

**Navarro García, G. y Navarro Blaya, S. (2000).** Química Agrícola: El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 488 pp.

**Ochoa-Loza, F.J., Artiola, J.F., Maier, R.M., (2001).** Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. *J. Environ. Qual.* 30, 479-485.

**Olguín E. y Sánchez-Galván G. (2012).** Heavy metal removal in phytofiltration and phytoremediation: the need to differentiate between bioadsorption and bioaccumulation. *N. Biotechnol.* 30, 3-8. DOI: 10.1016/j.nbt.2012.05.020.

**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.

**PBQ.(2003).** URL:<http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuadero&opt=5&tipo=1&note=36> [fecha de consulta 12/08/2018]

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

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

- Rodríguez Romero, A. J., Robles Salazar, C. A., Ruíz Picos, R. A., López López, E., Sedeño Díaz, J. E. y Rodríguez Dorantes, A. (2014).** Índices de germinación y elongación radical de *Lactuca sativa* en el biomonitorio de la calidad del agua del río Chalma. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 30(3), 307-316. Recuperado en 01 de septiembre de 2018, de URL:[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-49992014000300007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992014000300007&lng=es&tlng=es). [fecha de consulta 1/9/2018]
- Rollins, R.C. (1993).** *The Cruciferae of Continental North America*, Stanford University Press Stanford, California.
- Rosenberg, E., Ron, E. (1999).** High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:154-162.
- 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 ed.
- Stacey, S.P., McLaughlin, M.J., Çakmak, I., Hettiarachchi, G.M., Scheckel, K.G., Karkkainen, M., (2008).** Root uptake of lipophilic zinc-rhamnolipid complexes. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2112-2117.
- 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.
- Tiller, K.G. (1991).** “Heavy metals in soils and their environmental significance. *Advances in soil Science*, 9: 113-141.
- Ure, A.M., Quevauvillier, Ph., Muntau, H., Griepink, K.B. (1993).** Speciation 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.
- Welch, R.M. (1995).** Micronutrient nutrition of plants. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 14: 49-82.
- Wright J. (2003).** *Química medioambiental (Environmental Chemistry)* Routledge; 1st edition. P 432.
- 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.
- Zucconi, F.; Forte, M.; M, A.; Mónaco Bertoli, M. (1985).** Phytotoxins during the stabilization of organic matter. p.73-86. In: J. Gasser (Ed.). *Composting of agricultural and other wastes.* Elsevier Applied Science Publishing. London, England.