



**ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA**



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

**CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS**

**Efecto de la aplicación de ramnolípido en la
fitoextracción de cobre por plantas de *Hordeum
vulgare L.* y *Brassica juncea L.* en suelos contaminados
artificialmente**

Trabajo Fin de Grado presentado por: **Sheila Carvajal de la Haza**

Titulación: Grado en Ingeniería Agrícola. Mención en Explotaciones Agropecuarias.

Sevilla, Mayo 2016.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA

Efecto de la aplicación de ramnolípido en la fitoextracción de cobre por plantas de *Hordeum vulgare L.* y *Brassica juncea L.* en suelos contaminados artificialmente.

Trabajo fin de grado llevado a cabo en:

- Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola (Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica. Universidad de Sevilla).
- Departamento de Agroquímica, Microbiología Ambiental y Conservación de suelos del IRNAS-CSIC.

Presentado por Dña. Sheila Carvajal de la Haza

Tutores:

D. Fernando Madrid Díaz
Dr. en Ciencias Químicas.
Técnico Superior
Especializado (CSIC).

Dña. Esmeralda Morillo
González
Dra. en Ciencias Químicas.
Investigador Científico. (CSIC).

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

Sevilla, Mayo 2016

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a las personas y organismos que han permitido la realización de este trabajo de fin de grado en ingeniería agronómica entre los que se encuentran:

Mi tutora María del Carmen Florido por acoger la tutoría de este trabajo, por su preocupación e interés en este trabajo y por todas las facilidades prestadas.

El Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS), especialmente a Fernando Madrid y Esmeralda Morillo por la oportunidad recibida al poder realizar mi trabajo de fin de grado en sus laboratorios, facilitar la realización de este trabajo y por su preocupación.

Mi familia por estar ahí en todo momento sin las cuales la realización de este trabajo hubiera sido imposible.

RESUMEN DEL TFG

El presente trabajo tiene como objetivo principal evaluar el efecto del biosurfactante biodegradable (JBR-425) en la fitoextracción de cobre en dos especies de plantas, concretamente cebada (*Ordeum Vulgare*) y Mostaza (*Brassica Juncea*), en dos suelos agrícolas de distintos orígenes (Coria del Río y Constantina), contaminados artificialmente con dos niveles de cobre (500 y 1000 mg kg⁻¹).

Para ello, se realizó una serie de ensayos preliminares para estudiar el desarrollo y crecimiento de las plantas en el suelo. En primer lugar se estudió la germinación de las semillas en placas de Petri y en suelo y crecimiento de las plantas en suelo, tanto en suelo sin contaminar como en suelo contaminado artificialmente. En segundo lugar se procedió a estudiar la extracción de Cu en los dos suelos empleados en presencia de ramnolípidos, en ensayos tipos batch, a un nivel de contaminación de Cu de 1000 mg kg⁻¹. Posteriormente se observó la influencia del ramnolípidos en el crecimiento de las plantas seleccionadas.

Con los datos obtenidos se diseñó el ensayo de fitoextracción de Cu en suelo de Coria del Río, teniendo éste suelo un pH de 7,87 y un porcentaje de arena alto, y en suelo de Constantina, con un pH de 5,5 y con mayor fracción de partículas finas, a tres dosis de Cu distintas (0, 500 y 1000 mg kg⁻¹ Cu), con la presencia del ramnolípidos. En este ensayo se analizó la parte aérea de las plantas, para ver su capacidad de fitoextracción y, mediante dos métodos de extracción, AEDT y CaCl₂, la biodisponibilidad del Cu en el suelo.

Entre los resultados obtenidos, se puede destacar que las plantas no tenían un buen desarrollo a dosis superiores a 1000 mg kg⁻¹ Cu, e incluso a esta dosis la mostaza parda en el suelo de Constantina no presentó biomasa suficiente para ser analizada.

El crecimiento de las plantas fitoextractoras disminuyó a partir de una concentración de ramnolípidos de 1000 mg kg⁻¹ de suelo por lo que concentraciones superiores a esta no son adecuadas para un ensayo de fitoextracción.

En general ni el tipo de planta utilizado ni la presencia de ramnolípidos afectó a la disponibilidad de Cu en el suelo, ya sea medida por AEDT o por CaCl₂. Sin embargo, el tipo de suelo sí influyó en la disponibilidad medida por ambos métodos, observándose que en el suelo de Constantina la adsorción del metal era más fuerte que en el suelo de Coria.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Contaminación. Elementos potencialmente tóxicos en suelos.	1
1.1.1. Contaminación del suelo	1
1.1.2. Elementos potencialmente tóxicos	2
1.1.3. Procedencias de los EPTs en el suelo	4
1.1.4. Contaminación de suelos por EPTs	5
1.2. Riesgo ambiental. Movilidad y biodisponibilidad de los epts	6
1.2.1. Dinámica de los elementos potencialmente tóxicos	7
1.2.2. Factores del suelo que afectan a la movilidad de los elementos potencialmente tóxicos	8
1.2.3. Biodisponibilidad de elementos potencialmente tóxicos	10
1.3. Recuperación de suelos contaminados por EPTs	11
1.3.1. Fitorrecuperación	12
1.3.2. Fitoextracción inducida por agentes quelantes	15
1.4. Biosurfactantes	18
1.4.1. Origen de los biosurfactantes microbianos	19
1.4.2. Composición y función de los biosurfactantes	20
1.4.3. Ventajas y desventajas	21
1.4.4. Recuperación mediante biosurfactantes de suelos contaminados por EPTs	21
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Materiales	24
3.2. Métodos	26
3.2.1. Experimentos de germinación y crecimiento de las plantas fitoextractoras	26
3.2.2. Estudios de crecimiento de las plantas fitoextractoras en presencia de Cu	26
3.2.3. Experimento de extracción de Cu de suelos empleando ramnolípidos	27
3.2.4. Estudios de crecimiento de las plantas fitoextractoras en presencia de ramnolípidos	28
3.2.5. Experimentos de fitoextracción de Cu de suelos en presencia de ramnolípidos	28
3.2.6. Efecto del ramnolípidos en la disponibilidad de Cu en suelos	29
3.2.7. Análisis estadístico	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4.1. Ensayos preliminares	32
4.1.1. Germinación y crecimiento de las plantas fitoextractoras	32
4.1.2. Crecimiento de las plantas fitoextractoras en presencia de Cu	32
4.1.3. Efecto del ramnolípidos en la extracción de Cu en suelos	33
4.1.4. Crecimiento de las plantas fitoextractoras en presencia de ramnolípidos	35
4.2. Efecto del ramnolípidos en la fitoextracción de Cu de suelos	37

4.2.1. Desarrollo de las plantas	37
4.2.2. Contenido de Cu en plantas	46
4.2.3. Efecto del ramnolipido en la disponibilidad de Cu en suelos	50
4.3. Correlación entre las variables de altura y producción de biomasa de plantas y contenido de Cu en plantas y niveles disponibles en suelo	56
5. CONCLUSIONES	64
6. BIBLIOGRAFÍA	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Disponibilidad relativa de las plantas según la forma de retención del metal en el suelo	10
Tabla 1.2. Principales agentes quelatantes	17
Tabla 1.3. Comparación de las ventajas y desventajas de los biosurfactantes frente a los surfactantes sintéticos	21
Tabla 3.1. Caracterización de los suelos utilizados	24
Tabla 4.1. Porcentaje de germinación en placas de Petri a temperatura de 25°C, 100% de saturación de humedad, en oscuridad, a los 15 días después de la siembra	32
Tabla 4.2. Germinación (%), altura (cm) y biomasa fresca (g) de la cebada en suelo de Coria del Río y Constantina	33
Tabla 4.3. Resumen del análisis de la varianza (ANOVA) para la germinación de semillas germinadas en cebada y mostaza parda, en suelos de Coria del Río y Constantina	38
Tabla 4.4. Resumen del análisis de la varianza (ANOVA) para la altura (cm) de las plantas de cebada y mostaza parda, en suelos de Coria del Río y Constantina	40
Tabla 4.5. Resumen del análisis de la varianza (ANOVA) para la biomasa fresca (g) de la parte aérea de las plantas de cebada y mostaza parda, en suelos de Coria del Río y Constantina	43
Tabla 4.6. Resumen del análisis de la varianza (ANOVA) para la biomasa seca (g) de la parte aérea de las plantas de cebada y mostaza parda, en suelos de Coria del Río y Constantina	45
Tabla 4.7. Resumen del análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de metal Cu (mg kg^{-1}) en la parte aérea de las plantas de cebada y mostaza parda, en suelos de Coria del Río y Constantina	49
Tabla 4.8. Porcentaje de Cu extraído por las plantas en los suelos contaminados	50
Tabla 4.9. Resumen del análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de metal Cu (mg kg^{-1}) extraídos con AEDT en suelo sembrado con cebada y mostaza parda, en suelos de Coria del Río y Constantina	53
Tabla 4.10. Resumen del análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de metal Cu (mg kg^{-1}) extraídos con CaCl_2 en suelo sembrado con cebada y mostaza parda, en suelos de Coria del Río y Constantina	55
Tabla 4.11. Relación entre Cu disponible con AEDT respecto a CaCl_2 al finalizar el proceso de fitoextracción según el suelo y el cultivo utilizado.	56
Tabla 4.12. Matriz de correlación global entre las variables de altura y producción de biomasa de plantas y contenido de Cu en planta y niveles disponibles en suelo	57
Tabla 4.13. Matriz de correlación entre las variables de altura y producción de biomasa de plantas y contenido de Cu en planta y niveles disponibles en suelo para la cebada en suelo de Coria del Río y Constantina	58
Tabla 4.14. Matriz de correlación entre producción de biomasa y contenido de Cu en planta y niveles disponibles en suelo para la mostaza parda en suelo de Coria del Río y Constantina	58
Tabla 4.15. Matriz de correlación entre las variables altura de planta, producción de biomasa, contenido de Cu en planta y niveles disponibles en suelo para la cebada en suelo de Coria del Río	59

Tabla 4.16. Matriz de correlación entre las variables altura de planta, producción de biomasa, contenido de Cu en planta y niveles disponibles en suelo para la cebada en suelo de Constantina	59
Tabla 4.17. Matriz de correlación entre las variables producción de biomasa, contenido de Cu en planta y niveles disponibles en suelo para la mostaza parda en suelo de Coria del Río	60
Tabla 4.18. Matriz de correlación entre las variables producción de biomasa, contenido de Cu en planta y niveles disponibles en suelo para la mostaza parda en suelo de Constantina.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Contenidos medios de metales en suelos	4
Figura 1.2. Técnicas de fitorrecuperación	13
Figura 1.3. Fitoextracción de EPTs del suelo	14
Figura 1.4. Fitoextracción continua. Fitoextracción asistida o inducida	16
Figura 1.5. Complejo (quelato) metal-AEDT	17
Figura 1.6. Ubicación de la molécula de surfactante en la interfase	19
Figura 1.7. Representación molecular de mono-ramnolípidos y diramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Figura 3.1. Representación molecular de mono-ramnolípido y di-ramnolípido, componentes del JBR-425	25
Figura 3.2. Baño de arena. Espectrofotómetro de Absorción Atómica	27
Figura 3.3. Disoluciones de cobre de 500 mg kg ⁻¹ y 1000 mg kg ⁻¹	28
Figura 3.4. Macetas con plantas de cebada (derecha) y de mostaza parda (izquierda)	30
Figura 4.1. Biomasa fresca y altura de las plantas en suelo de Coria del Río	32
Figura 4.2. Cu extraído en suelos con distintas concentraciones de ramnolípido	34
Figura 4.3. Influencia de distintas concentraciones de ramnolípidos en la biomasa fresca de la cebada y de la mostaza parda en suelo de Coria del Río	36
Figura 4.4. % Germinación de cebada en suelo de Coria del Río y Constantina	38
Figura 4.5. Altura (cm) de cebada en suelo de Coria del Río y Constantina	40
Figura 4.6. Biomasa fresca (g) de cebada en suelo de Coria del Río y Constantina	41
Figura 4.7. Biomasa fresca (g) de mostaza parda en suelo de Coria del Río y Constantina	42
Figura 4.8. Biomasa seca (g) de cebada en suelo de Coria del Río y Constantina	44
Figura 4.9. Biomasa seca (g) de mostaza parda en suelo de Coria del Río y Constantina	45
Figura 4.10. Contenido de metal Cu (mg kg ⁻¹) en la parte aérea de cebada en suelo de Coria del Río y Constantina	48
Figura 4.11. Contenido de metal Cu (mg kg ⁻¹) en la parte aérea de mostaza parda en suelo de Coria del Río y Constantina	49
Figura 4.12. Contenido de metal Cu (mg kg ⁻¹) extraídos con AEDT en suelo de Coria del Río y Constantina sembrado con cebada y mostaza	52
Figura 4.13. Contenido de metal Cu (mg kg ⁻¹) extraídos con CaCl ₂ en suelo de Coria del Río y Constantina sembrado con cebada y mostaza	54
Figura 4.14. Contenido de metal Cu (mg kg ⁻¹) extraídos con CaCl ₂ en suelo de Coria del Río y Constantina sembrado con mostaza parda	57
Figura 4.15. Línea de regresión global entre Cu en planta frente biomasa seca	61
Figura 4.16. Curva dosis-respuesta del Cu en planta frente a la biomasa fresca de las plantas en los distintos suelos	61
Figura 4.17. Curva dosis-respuesta del Cu extraído mediante AEDT frente al Cu extraído por la parte aérea de las plantas en los distintos suelos	62
Figura 4.18. Curva dosis-respuesta del Cu extraído mediante CaCl ₂ frente al Cu extraído por la parte aérea de las plantas en los distintos suelos	62
Figura 4.19. Curva dosis-respuesta del Cu extraído mediante AEDT frente al Cu extraído mediante CaCl ₂ en los distintos suelos	63

Figura 4.20. Curva dosis-respuesta del Cu extraído mediante CaCl_2 frente a la biomasa seca de las plantas en los distintos suelos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONTAMINACIÓN. ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS EN SUELOS

1.1.1. Contaminación del suelo

La contaminación constituye uno de los aspectos más importantes en la degradación de los suelos. La calidad de un suelo, es decir, su capacidad para sostener efectivamente el crecimiento de las plantas y otros organismos, puede verse afectada negativamente por la contaminación. (Maqueda, 2003).

La proximidad física del suelo hace que éste sea el lugar al que con más probabilidad vayan a parar, abandonados, una buena parte de los residuos originados por la actividad del ser humano. La presencia de sustancias ajenas al medio edáfico puede conllevar serios problemas para el medio vivo que sustenta, y puede proyectarse indirectamente a otros seres a través de la cadena trófica.

El suelo tiene una cierta capacidad de adsorción de contaminantes, e incluso hay ciertos componentes del suelo que actúan como depuradores reteniendo los contaminantes a partir de fenómenos de adsorción física o de interacción química, o bien los transforman al desarrollarse determinadas reacciones químicas. En este sentido, merece destacarse la función que ejercen los materiales húmicos en el suelo, los cuales son capaces de fijar una gran variedad de sustancias disueltas en el agua edáfica, y entre ellas cabe mencionar los cationes polivalentes de metales.

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 depende 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, 1993a).

Las bacterias degradan los compuestos orgánicos en el subsuelo mediante un proceso que libera energía. Las biorreacciones pueden ocurrir tanto en terrenos aireados como en medios anóxicos. En general, los compuestos orgánicos se transforman en otros de estructura más simple, y al cabo de más o menos tiempo, según sea la naturaleza química del substrato, la transformación (oxidación) termina por generar CO_2 y agua.

La contaminación de los suelos puede clasificarse 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. Ésta relación depende de los distintos procesos químicos que ocurren en éste medio, como son las reacciones ácido-base, oxidación-reducción, complejación, así como procesos de adsorción-desorción. En éste 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.

1.1.2. Elementos Potencialmente tóxicos

De los 106 elementos conocidos por el hombre, 84 son metales, por lo que no es de extrañar que las posibilidades de contaminación metálica en el ambiente sean numerosas. Hay que tener presente que 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.

Pero no siempre los metales son peligrosos; algunos elementos, pese a su toxicidad, se presentan de forma muy escasa o insoluble, por lo que el número de estos productos dañinos para la salud sólo suele reducirse a unos pocos. De entre ellos, destacan el plomo y el mercurio, seguidos por el berilio, el bario, el cadmio, el cobre, el manganeso, el níquel, el estaño, el vanadio y el zinc. Aunque su presencia natural no debería ser peligrosa (es parte del equilibrio de la naturaleza), desde la Revolución Industrial, su producción ha ascendido vertiginosamente, llegando en algunas zonas a concentraciones tóxicas, por lo que se conocen como elementos potencialmente tóxicos (ETPs).

La peligrosidad de los EPTs es mayor al no ser 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. De hecho, la toxicidad de algunos metales ha quedado documentada a lo largo de la historia: los médicos griegos y romanos ya diagnosticaban síntomas de envenenamiento agudo por plomo mucho antes de que la toxicología se convirtiera en ciencia.

La necesidad de controlar la contaminación que provocan los EPTs es cada vez más acuciante. Se ha demostrado científicamente que 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.

En el suelo existen unos elementos minoritarios que se encuentran en muy bajas concentraciones y al evolucionar la vida adaptándose a estas disponibilidades, ha ocurrido 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 gr cm^{-3} cuando está en forma elemental. Comúnmente se extiende el uso del término a elementos de carácter metálico con número atómico superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1% y casi siempre menor del 0,01%. Junto a estos metales hay otros elementos químicos que se suelen englobar con ellos por presentar orígenes y comportamientos asociados; es este el caso del As, B, Ba y Se.

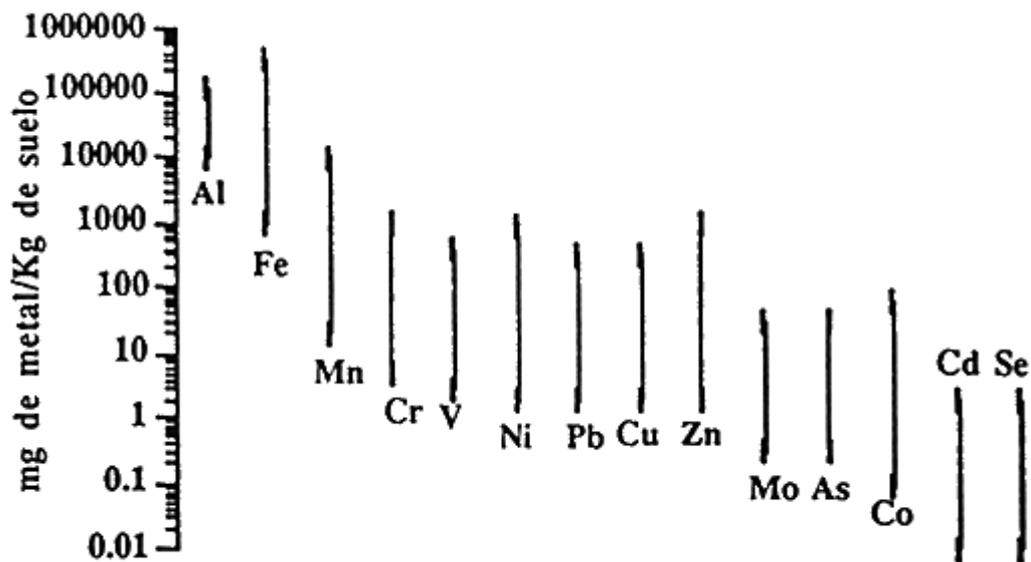
Dentro de los elementos potencialmente tóxicos (EPTs) hay dos grupos:

- 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 concentraciones anómalas que se presentan en un suelo pueden ser por causas naturales (por ejemplo, los suelos desarrollados sobre serpentinas, con altos contenidos en elementos como Cr, Ni, Cu y Mn); los metales son muy estables en el suelo y en el proceso natural de transformación de las rocas para originar a los suelos suelen concentrarse, pero, en general, sin rebasar los umbrales de toxicidad y además los metales procedente de las rocas se encuentran generalmente bajo formas muy poco asimilables para los organismos.

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⁻¹; el Mn puede llegar a 10000 mg kg⁻¹). En menores concentraciones se encuentran el Co, Cu y As (0,1-250 mg kg⁻¹) y con mínimas concentraciones el Cd y Hg (0,01-2 mg kg⁻¹), según Bowen (1979).



Variación en la concentración de metales en suelos

Figura 1.1. Contenidos medios de metales en suelos.

1.1.3. Procedencias de los EPTs en el suelo

- Origen natural.

Los metales contenidos en el material original, al meteorizarse, se concentran en los suelos. A excepción de pH ácidos, los metales son poco móviles en suelos y tienden a acumularse en la parte superficial, en el horizonte biológicamente más activo, lo que hace que los metales estén fácilmente

accesibles para las plantas. Estas concentraciones naturales de metales pueden llegar a ser tóxicas para el crecimiento de las plantas, así por ejemplo, el níquel puede aparecer en concentraciones tóxicas en suelos derivados de rocas ultrabásicas. Concentraciones naturales muy altas en los suelos pueden ocasionar acumulación de algún metal en plantas y ocasionar efectos tóxicos para los animales que las consumen.

Los contenidos medios de metales en suelos se reproducen en la siguiente gráfica, pero hemos de destacar que la concentración de los metales en los suelos varía considerablemente con la profundidad (como ocurre generalmente con todas las propiedades de los suelos).

- Origen antropogénico.

La UE distingue cinco categorías de actividades potencialmente contaminantes de EPTs (Van-Camp y col., 2004):

- Industria: accidentes, vertidos, escapes o fugas, almacenamiento y deposición de residuos.

- Actividades mineras: con un riesgo generalmente asociado con el almacenamiento y deposición de escombreras, drenajes ácidos y el uso de ciertos reactivos químicos.

- Actividades de procesado de residuos: Se estima que el 57% de los residuos municipales generados en la UE se llevan a un vertedero; el 87% en la CEE.

- Tráfico: a través de emisión de gases, pérdidas de aceites y gasolinas, abrasión de gomas de los neumáticos, etc.

- Otras actividades: productos de construcción usados sobre el suelo (hormigones, pinturas), prácticas inadecuadas de agricultura (uso de fertilizantes y pesticidas) almacenamientos privados y comerciales (tanques, gasolineras), sistemas de tratamientos de aguas, etc.

1.1.4. Contaminación de suelos por EPTs

El contenido de metales en suelos, debería ser únicamente función de la composición del material original y de los procesos edafogénicos que dan lugar al suelo. Pero la actividad humana incrementa el contenido de estos metales en el suelo en cantidades considerables, siendo esta, sin duda, la causa más frecuente de las concentraciones tóxicas, procedentes de vertidos industriales, de actividades mineras, de la aplicación de plaguicidas o también del tráfico rodado. Como resultado, se emiten grandes cantidades de partículas que,

después de un cierto tiempo de permanencia en la atmósfera, precipitan en los suelos lejos del lugar donde han sido vertidas.

La contaminación local por EPTs se asocia a normalmente vertidos localizados, como: vertidos de industrias de fundición de metales, drenajes ácidos y aguas de escorrentía generados por la oxidación de materiales de tipo pirítico en escombreras de mina, una elevada producción de cenizas derivadas de la combustión del carbón, o la existencia de una gran cantidad de vertederos de diferentes residuos, especialmente los más antiguos que están contruidos sin barreras de contención y que suponen un peligro potencial para la contaminación de los estratos más profundos del suelo y las aguas subterráneas.

Por otra parte, la contaminación difusa por EPTs se asocia con procesos que afectan a grandes áreas de terreno, como la deposición atmosférica, ciertas prácticas agrícolas y el inadecuado reciclaje de basuras y aguas residuales. La deposición atmosférica representa una de las mayores fuentes de EPTs hacia el suelo (Dudka y Adriano, 1997), con la deposición de metaloides volátiles (Se, Hg, As y Sb) y/o cenizas enriquecidas fundamentalmente en Pb, Cd, Zn, Cu, Ni y V. Por su parte, algunos sistemas de producción agrícola suponen la adición directa durante largos períodos de tiempo de EPTs asociados a diferentes fertilizantes, fundamentalmente Cd por el uso de fosfatos (en Europa una media de 138 mg Cd kg⁻¹) (McGrath y col., 2002) y Ni por el uso de nitrato de calcio (Verloo & Willaert, 1990). También el uso del estiércol procedente de animales supone frecuentemente la contaminación de aguas con nitrato, sales y metales (principalmente Cu y Zn) y el uso de lodos de depuradora que presentan contenidos variables de EPTs (McBride, 2004).

1.2. RIESGO AMBIENTAL. MOVILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD DE LOS EPTs

La contaminación de suelos y sedimentos por ETPs es un problema ampliamente extendido 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 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 por humanos.

Efecto de los contaminantes del suelo

El suelo se puede degradar al acumularse en él sustancias a unos niveles tales que repercuten negativamente en su comportamiento y uso. Los efectos desfavorables son (Porta y col., 1994):

- Destrucción del poder de autodepuración por procesos de regeneración biológica normales, al haber superado su capacidad de aceptación de contaminantes.
- Disminución cualitativa y cuantitativa del crecimiento normal de los microorganismos del suelo, o bien alteración de su diversidad.
- Disminución del rendimiento de los cultivos con posibles cambios en la composición de los productos con riesgo para la salud de los consumidores, al entrar elementos a la cadena trófica.
- Contaminación de las aguas superficiales y freáticas por procesos de transferencia, provocando que se alcancen concentraciones superiores a las consideradas aceptables.
- Disminución de las funciones de soporte de actividades de esparcimiento. Los espacios contaminados presentan problemas de salubridad para los usuarios.

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

La toxicidad de un agente contaminante no sólo va a depender de sí mismo sino que las características del suelo donde se encuentre van a ser decisivas. La sensibilidad de los suelos a la agresión de los agentes contaminantes va a ser muy distinta dependiendo 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.

Por otra parte, algunos metales pueden estar en la disolución del suelo como aniones solubles. Tal es el caso de los siguientes metales: Se, V, As, Cr.

- 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

Además de lo anterior, 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. La capacidad de cambio de cationes es mínima para los minerales del grupo de la caolinita, baja para las micas, alta para las esmectitas y máxima para las vermiculitas.

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 estado uno u otro estado de oxidación, con distintas propiedades en cada caso. Los diagramas Eh (potencial redox)-pH se utilizan para mostrar la estabilidad de compuestos y proporcionan un método fácil para predecir el comportamiento de los EPTs en condiciones ambientales.

Por ejemplo, en condiciones reductoras el Fe^{3+} se transforma en 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. Estos no son estables a Eh bajos y se convierten en FeS o FeCO_3 dependiendo de las condiciones químicas. Cuando esto ocurre los metales que estaban asociados con los hidróxidos de Fe y Mn se movilizan.

- 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 (tabla 1.1).

Tabla 1.1. Disponibilidad relativa de las plantas según la forma de retención del metal en el suelo.

Forma de retención en el suelo	Disponibilidad relativa
Iones en solución del suelo	Fácilmente disponible
Ión en complejo de cambio	Relativamente disponibles pues estos metales, por su pequeño tamaño y altas cargas, quedan fuertemente adsorbidos
Metales formando quelatos con compuestos orgánicos	Menos disponibles
Metal precipitado o coprecipitado	Disponible sólo si ocurre alguna alteración química
Incorporado a la matriz biológica	Disponible después de la descomposición
Metal en la estructura mineral	Disponible después de la meteorización

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. Es por ello que la presencia de altas concentraciones en el horizonte superficial seguida de un drástico decrecimiento a los pocos centímetros de profundidad es un buen criterio de diagnóstico de contaminación antrópica.

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).

Los estudios de biodisponibilidad han cobrado importancia en los últimos años como una herramienta en la evaluación de riesgos asociados a la presencia de EPTs en el suelo y en la gestión de los mismos. Actualmente las técnicas empleadas han experimentado grandes avances que permiten una mayor precisión en los resultados obtenidos y un mejor conocimiento tanto de los procesos que tienen lugar bajo unas condiciones medioambientales y fisiológicas determinadas, como de los factores que influyen en la movilización de los EPTs en el suelo y su biodisponibilidad para poder entender qué especies y mediante qué mecanismos se producen efectos adversos sobre los organismos vivos.

Para evaluar la biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo se han desarrollado una serie de metodologías, desde técnicas de extracción química hasta bioensayos con microorganismos, invertebrados, anfibios, plantas e incluso organismos superiores. La biodisponibilidad se estima mediante la respuesta a sustancias tóxicas para estos organismos o por inhibición de la actividad enzimática, los cambios en la población microbiana, índices de mortalidad, malformaciones o acumulación del contaminante en determinados órganos o en la corriente sanguínea (Gérard y col., 2001; Juhasz y col., 2003a).

Los invertebrados del suelo, como por ejemplo las lombrices debido a su estrecha relación con el suelo que habitan, han sido empleados para evaluar la toxicidad y biodisponibilidad de los contaminantes. Esto se realiza en función de parámetros como la mortalidad de la población, inhibición del crecimiento o acumulación del contaminante en el organismo (Conder y Lanno, 2000; Conder y col., 2001; Lanno y col., 2004).

Los anfibios, como ranas, sapos y salamandras, también han sido empleados como indicadores ambientales (Calevro y col., 1999; Mounaji y col., 2003) ya que son muy sensibles a la presencia de contaminantes pudiéndose producir malformaciones, alteraciones en la metamorfosis y una disminución de la población.

Las plantas, del mismo modo, 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-Rinde y col., 2003) no existe una metodología estándar universalmente aceptada para realizar estos ensayos.

1.3. RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR EPTs

Los metales no se degradan, así que pueden acumularse en el ecosistema provocando concentraciones elevadas, efectos adversos en la mayoría de los

organismos; por ello, se han desarrollado técnicas para recuperar suelos contaminados por EPTs (Gardea-Torresday y col., 2002; Kärenlampi y col., 2000; Nelly y col., 2000).

Puesto que los metales no son sustancias degradables, 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 a desarrollar técnicas que exploten de forma conjunta los procesos biológicos dependientes de plantas y microorganismos, así como procesos químicos como el uso de agentes quelatantes o secuestrantes para reducir el uso inherente asociado con los suelos contaminados con metales (Maqueda, 2003).

1.3.1. Fitorrecuperación

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, o 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.

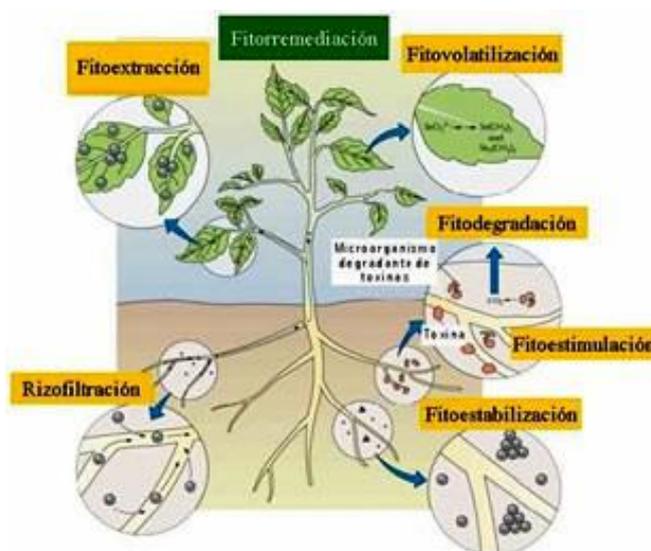


Figura 1.2. Técnicas de fitorrecuperación.



Figura 1.3. Fitoextracción de EPTs del suelo.

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.

Las especies hiperacumuladoras crecen muy lentamente y producen poca biomasa, por lo que se plantea la utilización alternativa de plantas no hiperacumuladoras, que acumulan menor concentración de metales, pero tolerantes a ellos y de gran crecimiento, lo que podría incrementar la cantidad total de metal extraído del suelo.

1.3.2. Fitoextracción inducida por agentes quelantes

La eficiencia de la fitoextracción puede verse reducida por la baja biodisponibilidad de los EPTs. Estos se encuentran en ocasiones fuertemente retenidos en el suelo, por lo que su desorción es muy lenta, limitando así su absorción por las plantas. Por ello, con objeto de mejorar el proceso de fitoextracción, se puede facilitar la absorción de metales por las plantas mediante la aplicación de determinadas enmiendas químicas. 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 (Figura 1.4):

- ***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. Estas enmiendas deben aplicarse cuando el crecimiento de la planta es máximo para favorecer la absorción del metal en un corto período de tiempo, poco antes de la recolección.

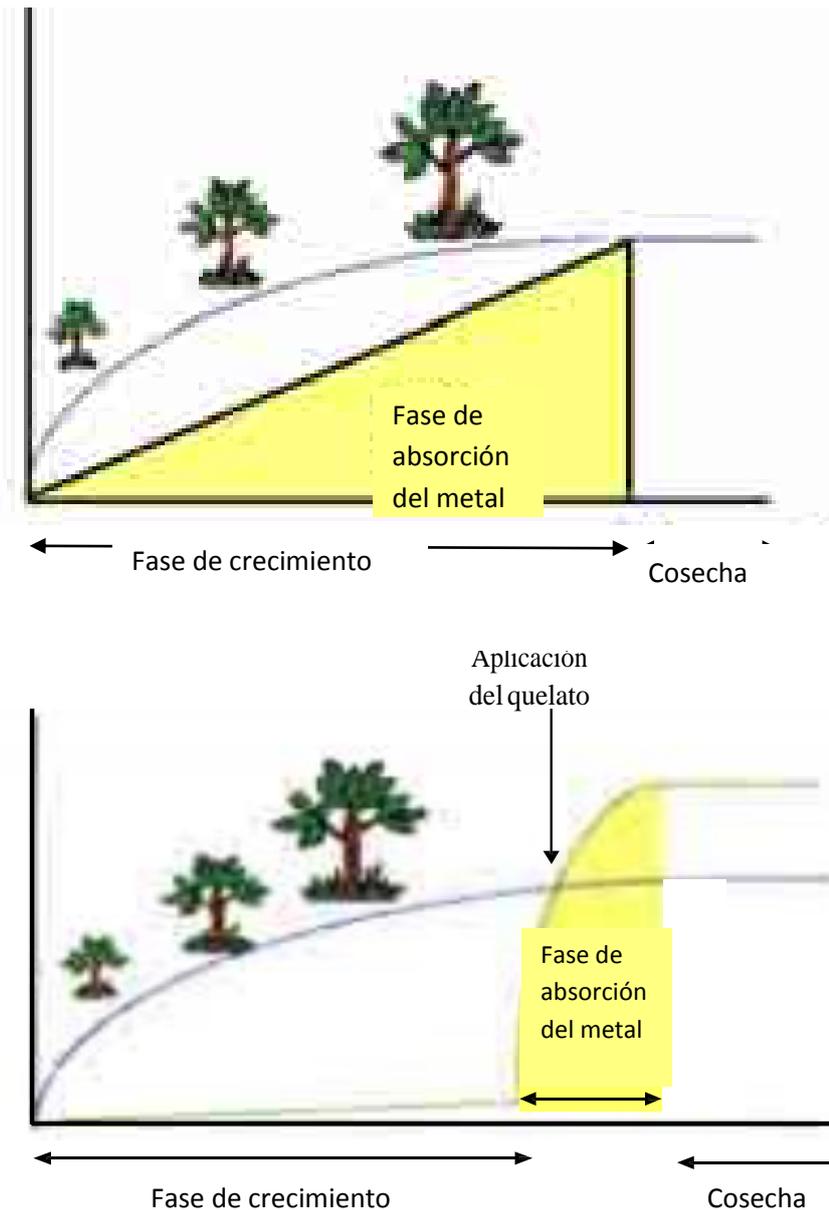


Figura 1.4. Fitoextracción continua (arriba). Fitoextracción asistida o inducida (debajo).

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, ya que éstas únicamente son capaces de tomar metales de las formas más biodisponibles en el suelo.

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.

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.

Entre los compuestos descritos se encuentran los derivados sintéticos de los ácidos aminopolicarboxílicos (APCAs), entre los que se encontraría el propio AEDT, DTPA, el CDTA (ácido trans-1,2-ciclohexilendinitrilotetracético), EGTA (ácido etilenglicoltetraacético), HEDTA (ácido hidroxiletildiaminotetracético), etc. Estos productos, al igual que el AEDT, son capaces de mejorar la absorción de metales por las plantas, pero también presentan toxicidad para las plantas.

El **cobre** (Cu) divalente, Cu^{2+} , se liga fuertemente con los ácidos húmicos y fúlvicos, formando complejos con la materia orgánica. En la solución del suelo, hasta el 98 % del cobre se encuentra quelatado por compuestos orgánicos de bajo peso molecular (aminoácidos, ácidos fenólicos, ácidos polihidroxicarboxílicos, etc.). El complejo más simple del ión cobre es el formado con el amoníaco, $\text{Cu}(\text{NH}_3)^{++}$, el cual es un complejo de color azul oscuro extremadamente soluble. También con el ácido tartárico, el cobre forma un excelente quelato que puede mantenerse en solución en medios fuertemente alcalinos. En solución acuosa, el ion Cu^{2+} es absorbido más rápidamente que el cobre quelatado.

1.4. Biosurfactantes

Los biosurfactantes (BS) son compuestos naturales producidos principalmente ciertos por hongos y bacterias. Estas moléculas tienen propiedades emulsificantes y dispersantes, que disminuyen la tensión superficial del agua de 72 a 25 mN/m aproximadamente. Los microorganismos sintetizan BS 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).

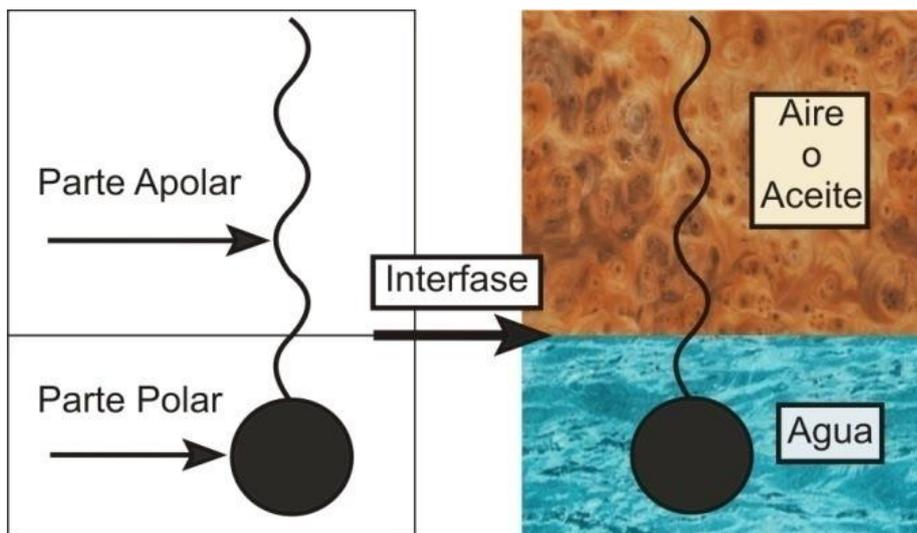


Figura 1.6. Ubicación de la molécula de surfactante en la interfase. Si el surfactante está dentro de la fase acuosa, su grupo polar puede estar rodeado de moléculas de agua. Si el surfactante está disuelto en una fase oleica, su grupo apolar posee interacciones con el solvente (Celik y col., 2008).

1.4.1. Origen de los biosurfactantes microbianos

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

Debido a la ecotoxicidad que tienen los SS al ambiente, la tendencia se dirige hacia la búsqueda de moléculas tensoactivas, productos biodegradables y tecnologías que sustituyan el uso de SS a fin de disminuir el impacto que estos tienen sobre el ambiente.

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

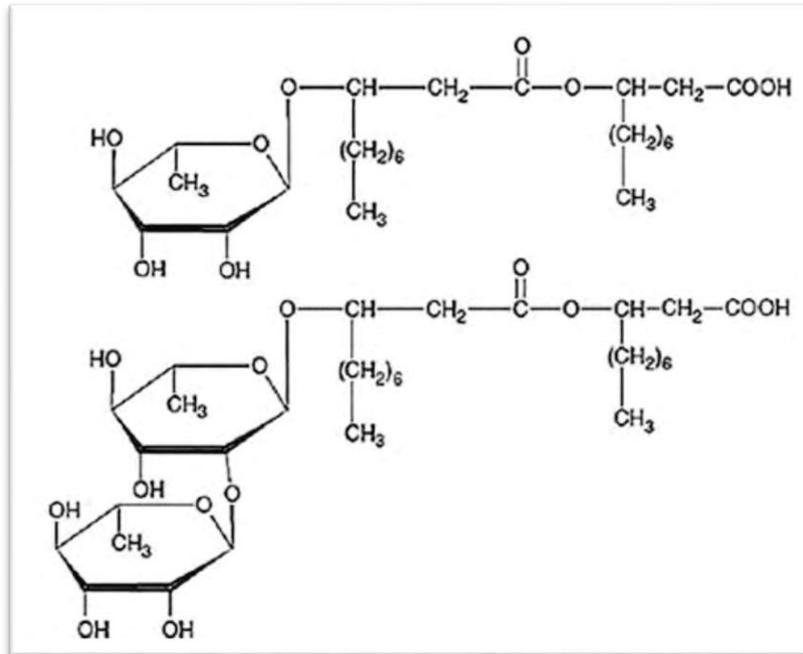


Figura 1.7. Representación molecular de mono-ramnolípidos (parte superior) y diramnolípidos (parte inferior) producidos por *Pseudomonas aeruginosa*. (Lovaglio y col., 2011).

1.4.2. 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).

Igual que los SS, los BS tienen propiedades emulsificantes, dispersantes, impermeabilizantes, suavizantes, lubricantes y humectantes. Los microorganismos producen BS para reducir la tensión superficial 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).

1.4.3. Ventajas y desventajas

Los biosurfactantes adecuados para ser aplicados en procesos de biorremediación, deben ser de baja ecotoxicidad, producidos por microorganismos inocuos, tener una alta actividad tensoactiva bajo condiciones ambientales amplias de pH, temperatura, salinidad y que además en el proceso de producción la cepa del microorganismo tenga una alta eficiencia. Con respecto a los surfactantes sintéticos, los biosurfactantes tienen ventajas y desventajas que se muestran en la tabla 2 (Singh y col., 2007; Rahman & Gakpe, 2008).

Tabla 1.3. Comparación de las ventajas y desventajas de los biosurfactantes frente a los surfactantes sintéticos (Rahman y Gakpe 2008).

VENTAJAS	DESVENTAJAS
<ul style="list-style-type: none">✓ Son extracelulares y biodegradables.✓ Baja ecotoxicidad.✓ Amplio espectro de actividad tensoactiva a condiciones de pH, salinidad y temperatura extrema.✓ Propiedades emulsificantes, dispersantes similares a los SS.✓ Ambientalmente aceptables en procesos de biorrecuperación.✓ Incrementa la eficiencia de remoción de petróleo.	<ul style="list-style-type: none">⊗ Regulación de la síntesis de biosurfactantes poco comprendida.⊗ Producción costosa a gran escala.⊗ Dificultad en la obtención de biosurfactantes puros.

1.4.4. Recuperación mediante biosurfactantes de suelos contaminados por EPTs

La contaminación ambiental por EPTs se ha convertido en un serio problema en el mundo. El problema de la contaminación por EPTs es cada vez más grave con el aumento de la industrialización y la perturbación de los ciclos biogeoquímicos naturales. A diferencia de las sustancias orgánicas, los EPTs son esencialmente no biodegradable y por lo tanto se acumulan en el ambiente.

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 biorremediación de suelos contaminados con EPTs es importante debido las características de su baja biodisponibilidad, su alta persistencia en el suelo y a su efecto potencial sobre la salud humana. Los esfuerzos que se han realizado en la investigación acerca de la biorremediación, se han aplicado en la optimización de la actividad microbiana con adición de nutrimentos, o bien en la bioaumentación, aunque no se ha tenido mucho éxito, lo cual suele atribuirse a la falta de disponibilidad de los EPTs, ya que su alta adherencia a las partículas del suelo y su baja solubilidad en agua, condiciona la persistencia de compuestos biodegradables.

La biodisponibilidad limitada de un EPTs se presenta cuando su tasa de degradación por microorganismos se afecta por una barrera físico-química entre el contaminante y los mismos. Cuando el contaminante se encuentra en el suelo, ocurren diferentes interacciones con los microorganismos, lo cual influye en la biodisponibilidad.

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, sintetizados por *Pseudomonas 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 Tritón o Tween. Por otro lado Guo y Mulligan (2006), informaron que los ramnolípidos son capaces de remover más del 90 % del estireno adsorbido en una mezcla compuesta de tierra y arena. Sin embargo en un estudio realizado en laboratorio la cepa de *Burkholderia cenocepacia* BSP3 produce un BS identificado como un glucolípidos, el cual mostró una notable mejora en la solubilización de los plaguicidas, paratión metílico, paratión etílico y trifluralina. Debido a su superficie, propiedades activas y un buen rendimiento en la mejora de la solubilización de los plaguicidas, Wattanaphon y col. (2008) sugieren la utilización de este BS como un agente solubilizante en la remediación ambiental de suelos contaminados con plaguicidas.

2. OBJETIVOS

La presencia de sustancias ajenas al medio edáfico puede conllevar serios problemas para el medio vivo que sustenta, pudiendo además proyectarse indirectamente a otros seres a través de la cadena trófica. Algunos elementos, como el cobre, son micronutrientes de las plantas, pero cuando superan un cierto umbral de concentración en el suelo tienen efectos tóxicos. Algunas especies vegetales tienen una alta tolerancia a ciertos elementos tóxicos, debido a su capacidad para bloquearlos y/o acumularlos en zonas específicas, y por ello han sido propuestas como un medio para la estabilización y rehabilitación de suelos contaminados por fitoextracción.

El uso de biosurfactantes ha sido propuesto como una técnica de biorremediación de suelos contaminados debido a la capacidad que tienen para formar complejos con ciertos metales aumentando la biodisponibilidad de los mismos. Por su carácter biodegradable tienen ventajas frente a los tensioactivos sintéticos.

El presente trabajo tiene como **objetivo principal** evaluar el efecto que tiene un biosurfactante biodegradable (JBR-425) compuesto por una mezcla de 2 ramnolípidos en la fitoextracción de cobre por dos especies de plantas, cebada (*Hordeum Vulgare*) y mostaza parda (*Brassica Juncea*), en dos suelos agrícolas con distintas propiedades, contaminados artificialmente con dos niveles de cobre (500 y 1000 mg kg⁻¹).

Para ello, se estudiarán los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudio del desarrollo de cultivos de Cebada y de Brassica en función de la presencia de distintas concentraciones de Cu y ramnolípidos en el suelo.
2. Evaluación del potencial de ambos cultivos para su uso en técnicas de fitoextracción de Cu en suelos contaminados.
3. Evaluación del efecto de la aplicación de ramnolípidos como agente quelante sobre la acumulación de Cu en la parte aérea de las plantas.
4. Estudio de biodisponibilidad de Cu en los suelos al final de los ensayos de fitoextracción.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

Suelos

En el presente estudio se utilizaron 2 tipos de suelo de origen agrícola. Un suelo de la finca experimental 'La Hampa' del CSIC en Coria del Río y un suelo de la finca 'Bienvenida' en Constantina, ambos municipios de la provincia de Sevilla.

La nomenclatura empleada para cada tipo de suelo es la siguiente:

CR: Coria del Río

CONS: Constantina

En la tabla 3.1 se presentan algunos parámetros físicoquímicos de los suelos utilizados.

Tabla 3.1. Caracterización de los suelos utilizados.

SUELO	TIPO DE SUELO	pH	CO ₃ ²⁻ (%)	M.O. (%)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)
Coria del Río (CR)	Franco arcillo arenoso	7,87	3,0	1,13	72,6	7,0	20,4
Constantina (CONS)	Franco	5, 50	1,1	1,91	50,4	39,4	10,2

Plantas

Se utilizaron dos tipos de plantas distintas: cebada (*Hordeum vulgare*) y mostaza parda (*Brassica juncea*). Aunque ninguna de las dos especies son consideradas plantas hiperacumuladoras de metales, ambas presentan a priori características adecuadas para el presente ensayo.

La elección de la cebada como cultivo experimental se debe a que es una planta con una capacidad elevada de extracción de metales del suelo (Ebbs y Kochian, 1998), tiene un rápido crecimiento inicial que impone la necesidad de que la planta absorba un contenido elevado de nutrientes y eso puede favorecer la extracción de metales y presenta resistencia a la salinidad (debido a la adición de soluciones metálicas para contaminar el suelo, los tratamientos podrían presentar salinidad).

El motivo principal para la selección de la mostaza parda se debe a su poder acumulador de diversos EPTs, entre ellos el Cu. Es una planta ampliamente utilizada en ensayos de fitoextracción, aunque presenta un menor ritmo de crecimiento y por lo tanto una menor biomasa que la cebada.

Nitrato de cobre

El reactivo utilizado para la contaminación con Cu de los suelos fue nitrato de cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ suministrado por Panreac.

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).

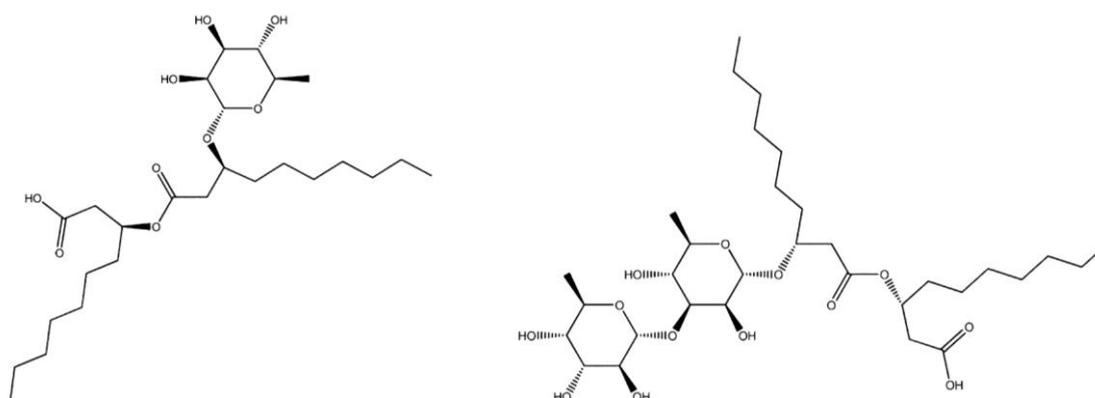


Figura 3.1. Representación molecular de mono-ramnolípido (izquierda) y di-ramnolípido (derecha), componentes del JBR-425.

Abono (Abofol)

Las macetas recibieron una dosis de fertilización de fondo (25 mg/maceta) con una disolución del abono Abofol NPK 24-16-12, con aminoácidos, boro, cobre, manganeso, y cinc, suministrado por Syngenta.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Experimentos de germinación y crecimiento de las plantas fitoextractoras

Se realizó un ensayo de germinación de semillas de cebada y de mostaza en placas de Petri. Este ensayo se realizó para comprobar que las semillas que íbamos a utilizar no tuvieran problemas a la hora de germinar.

Para ello, las semillas de cebada se mantuvieron en agua durante 24 h.

Para este ensayo se prepararon placas de Petri, donde se puso papel de filtro y se humedeció el papel con agua. Seguidamente, se colocaron 10 semillas de mostaza o 5 semillas de cebada, por duplicado. Se llevaron a estufa a 30°C, para mantener unas condiciones de temperatura óptimas.

Tras este ensayo se estudió el crecimiento de la cebada y de la mostaza en suelo. Para ello, tomamos el suelo de Coria del Río y preparamos 8 macetas con 400g de suelo en cada maceta, y se añaden 70 mg de agua. En las macetas plantaremos por cuadruplicado 15 semillas de cebada o 200 mg de semillas de mostaza.

Se planta en húmedo, retirando aproximadamente 1 cm de suelo. Tras plantar las semillas se repone el suelo que se había quitado.

Al cabo de 30 días se cortó la parte aérea de la planta y se pesó su biomasa.

3.2.2. Estudios de crecimiento de las plantas fitoextractoras en presencia de Cu

Se preparan 24 macetas de cada suelo, Coria del Río y Constantina, con 350 gr de suelo cada una. Se contaminaron 6 macetas de cada suelo con 4 dosis de Cu (añadido a partir de disoluciones de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$), 0 (Control), 500, 1000 y 2000 mg kg^{-1} . Tras dejar secar el suelo, volver a tamizar y esperar 45 días, se plantaron por triplicado en cada suelo y dosis de Cu 12 semillas de cebada o 60 mg de mostaza parda, tal como se indica en el ensayo anterior. La humedad final de las macetas quedó en el 60% de la capacidad de retención de agua del suelo.

Se dejaron crecer las plantas durante un mes en una cámara de incubación, regadas 3 veces al día, y se cortaron 30 días después de la siembra, determinándose altura (15 días) y biomasa fresca y seca (tras cortar las plantas).

3.2.3. Experimento de extracción de Cu de suelos empleando ramnolípidos

Se utilizaron los dos suelos, Coria del Río y Constantina, contaminados con una concentración de cobre de 1000 mg kg^{-1} .

En un ensayo tipo “batch”, se prepararon 12 tubos de centrífuga para cada suelo, con 15 g de suelo añadiendo 15 ml de disolución de ramnolípidos de concentraciones 0, 1000, 5000 y 10000 mg L^{-1} (por triplicado).

Los tubos de centrífuga se agitaron durante 3 días, hasta alcanzar el equilibrio. Tras esto, se centrifugan los tubos, y se toman 8 ml de sobrenadante que fueron sometidos a digestión en medio ácido, tal como se describe a continuación.

En matraces Erlenmeyer de 50 mL se añade el sobrenadante anterior y se adicionan 2 ml de peróxido de hidrógeno al 30%. Se digiere en baño de arena a 150°C durante 45 minutos con el matraz tapado para evitar una evaporación excesiva. Se deja enfriar, y se añaden 2 ml de HNO_3 concentrado. Se digiere durante 1 hora a 150°C (tapado). Se deja enfriar, se diluye el extracto a 25 ml y se filtra. El Cu se determina por Espectrofotometría de Absorción Atómica.



Figura 3.2. Baño de arena (izquierda). Espectrofotómetro de Absorción Atómica (derecha).

3.2.4. Estudios de crecimiento de las plantas fitoextractoras en presencia de ramnolípidos

Para la determinación del efecto del ramnolípidos JBR-425 sobre el crecimiento de las plantas fitoextractoras seleccionadas, se realizó un ensayo en macetas con 350 g del suelo de Coria del Río. El ensayo se hace por triplicado con 3 dosis distintas de ramnolípidos. Las concentraciones de ramnolípidos JBR-425 que se utilizaron en este ensayo fueron: 0 (Control), 1000 mg kg⁻¹ RL, 5000 mg kg⁻¹ RL y 10000 mg kg⁻¹ RL. El ensayo se hace tanto para cebada como para mostaza parda.

Se plantan las semillas como en el caso anterior, empleando 12 macetas con 12 semillas de cebada y otras 12 macetas con 60 mg de mostaza añadiendo a las macetas 50 ml de agua. Finalmente se riegan hasta el 60% de la capacidad de campo.

Al cabo de dos semanas, añadimos 10 ml de disolución acuosa con las dosis ya comentadas de ramnolípidos.

A los 30 días de haber sembrado las semillas, se corta la parte aérea de las plantas, se lavan, se pesan en fresco, se secan en estufa a 70 °C, y se vuelven a pesar en seco.

3.2.5. Experimentos de fitoextracción de Cu de suelos en presencia de ramnolípidos

En este ensayo se utilizaron dos suelos: el de Coria del Río y el de Constantina. Cada uno de estos suelos fue contaminado con dos dosis de Cu, 500 y 1000 mg kg⁻¹ de suelo, y un tratamiento control sin adición de Cu.



Figura 3.3. Disoluciones de cobre de 500 mg kg⁻¹ (derecha) y 1000 mg kg⁻¹ (izquierda).

Para la contaminación de los suelos se usó Cu(NO₃)₂. Se puso el suelo en botes de vidrio, y se procedió a la contaminación. La adición del metal se hizo añadiendo a los botes de vidrio disoluciones ya preparadas con 50 ml de solución de metal, preparadas a las concentraciones adecuadas (500 mg L⁻¹ y

1000 mg L⁻¹) para obtener la concentración requerida de cada uno, diluida con otros 50 ml de agua. El suelo se dejó secar y envejecer durante 45 días. Se volvió a tamizar y se prepararon las macetas con 350 g de suelo

El experimento se llevó a cabo para los dos tipos de plantas, cebada y mostaza parda, que fueron plantadas tal como se ha descrito en el ensayo anterior. Tras 2 semanas desde la germinación, se añadió el ramnolípido JBR-425, a la dosis seleccionada de 1000 mg kg⁻¹ suelo.

Se obtuvieron de esta manera 6 tratamientos para cada suelo y para cada tipo de planta con 3 replicados para cada tratamiento, representados con la siguiente nomenclatura:

C: suelo control.

C-RL: suelo control con presencia de ramnolípido JBR-425.

500 ppm: suelo contaminado con 500 mg kg⁻¹ de Cu.

500 ppm-RL: suelo contaminado con 500 mg kg⁻¹ de Cu con presencia de ramnolípido JBR-425.

1000 ppm: suelo contaminado con 1000 mg kg⁻¹ de Cu.

1000 ppm-RL: suelo contaminado con 1000 mg kg⁻¹ de Cu con presencia ramnolípido JBR-425.

Se llevan a la cámara de cultivo, y se controla la humedad periódicamente por gravimetría, que esté entre 50-60% de la capacidad de retención de agua. Durante el crecimiento del cultivo, se determinó el porcentaje de germinación de las semillas y la altura de las plantas (la media de las 3 plantas más altas de cada maceta a los 15 días de la siembra) en el caso de la cebada.

3.2.6. Efecto del ramnolípido en la disponibilidad de Cu en suelos

Una vez cortadas las plantas de cebada y mostaza, se procedió a preparar los suelos de las macetas. Para ello se separan los primeros 5 cm de suelo, donde el efecto del ramnolípido y el sistema radicular de las plantas habrá sido más notable, y se secan en estufa a 40°C. Para la preparación del suelo utilizamos un tamiz de 2 mm de luz. El suelo se recogió en un papel de filtro donde se hizo una limpieza de restos de raíces y semillas que pudieran quedar y se conservaron en vasos de plástico hasta su análisis.

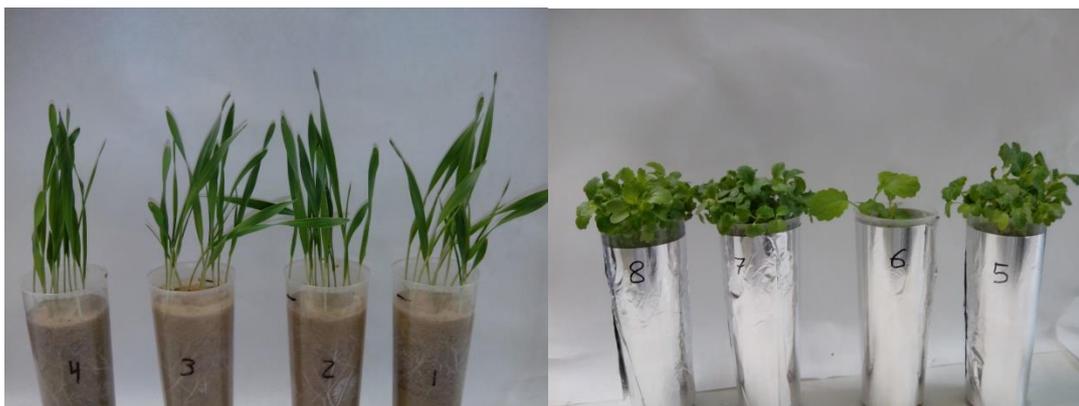


Figura 3.4. Macetas con plantas de cebada (izquierda) y de mostaza parda (derecha).

3.2.6.1. Extracción de metales con AEDT

Esta metodología aplicada para el estudio de la contaminación de los suelos se basa en la utilización de una solución que contiene un agente quelante, en nuestro caso el ácido etilendiaminotetraacético (AEDT).

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 quelatantes ha constituido uno de los mayores avances en el análisis de micronutrientes del suelo (Sims y Johnson, 1991).

Estos agentes 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 quelatante 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 quelatantes simulan la toma de nutrientes por las raíces vegetales y su restitución posterior desde las fases sólidas del suelo.

Protocolo experimental

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

3.2.6.2. Extracción de metales con CaCl₂

El uso de soluciones de CaCl₂ resulta en algunos casos un buen indicador de la disponibilidad de los distintos metales pesados para las plantas. Estas soluciones extraen dichos metales presentes en la solución del suelo y parte de las formas fácilmente cambiables.

Algunas razones para su uso son:

- presentar una concentración muy parecida a la solución del suelo
- el Ca²⁺ es el catión dominante en el complejo de adsorción y el CaCl₂ mejora la extracción de otros cationes sin afectar al equilibrio final.
- la baja concentración de cloruro favorece la determinación final de los EPTs.

Protocolo experimental

Se pesaron en tubos de centrifuga 2,5 g de suelo y se añadieron 25 ml de CaCl₂ 0,01M (Ure y col. 1993), y a continuación se dejó macerar la mezcla toda la noche. Posteriormente se agitó durante 2 horas y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Seguidamente se filtró a través de papel de filtro Whatman 2 y se acidificaron las muestras al 2% con HNO₃ de calidad ultrapura. El contenido de metales se determinó por ICP-OES.

3.2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se ha realizado usando el programa informático Statgraphics Centurion XVI.I. La comparación de las medias entre tratamientos se ha realizado por el método ANOVA para establecer los efectos principales y las interacciones de los diferentes factores experimentales que influyen en el rendimiento de biomasa y la absorción de metales. Las variables del estudio se sometieron a un análisis de correlaciones bivariadas y regresión lineal.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ENSAYOS PRELIMINARES

4.1.1. Germinación y crecimiento de las plantas fitoextractoras.

Germinación en placas Petri

En este ensayo en placas de Petri se obtuvo que el 100% de las semillas germinaron, tanto en el caso de la cebada como de la mostaza parda (Tabla 4.1), por lo que comprobamos que las semillas que vamos a utilizar no tienen ningún problema previo que nos dificulte la interpretación de los resultados que obtengamos.

Tabla 4.1. Porcentaje de germinación en placas de Petri a los 15 días después de la siembra.

PLANTA	% GERMINACION
Cebada	100
Mostaza parda	100

Crecimiento en macetas

En este ensayo se observa la germinación de las plantas en macetas y el crecimiento de las plantas. Para estimar el crecimiento de las plantas, se determina la biomasa fresca y la altura de las plantas sembradas en el suelo de Coria del Río.

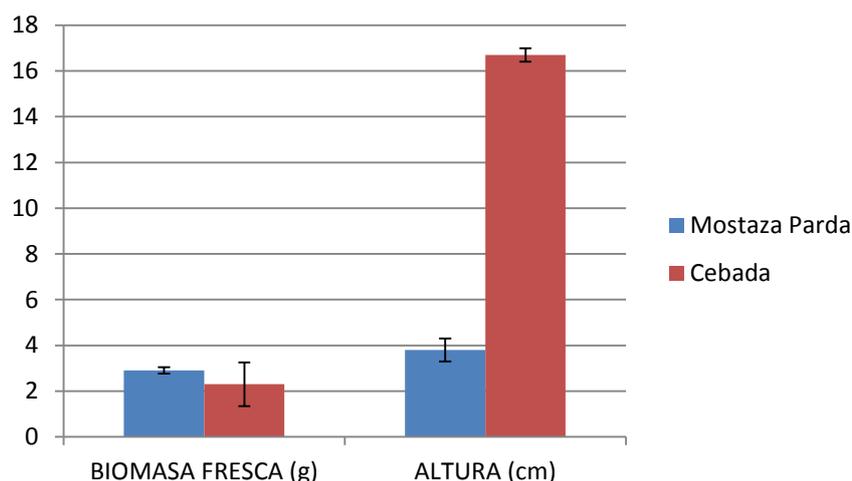


Figura 4.1. Biomasa fresca y altura de las plantas en suelo de Coria del Río.

4.1.2. Crecimiento de las plantas fitoextractoras en presencia de Cu

En la tabla 4.2, se muestran los resultados de crecimiento para la cebada en los distintos suelos para distintas dosis de tratamiento con Cu. Se puede observar que a

una dosis de 2000 mg Cu/kg de suelo la planta no crece lo suficiente teniendo reducciones significativas tanto para la germinación, altura y biomasa.

Tabla 4.2. Germinación (%), altura (cm) y biomasa fresca (g) de la cebada en suelo de Coria del Río y Constantina.

Tratamientos de Cu (mg kg ⁻¹ de suelo)	GERMINACION (%)		ALTURA (cm)		BIOMASA FRESCA (g)	
	CR	CONST	CR	CONST	CR	CONST
CONTROL	86,1 b	95,8 c	14, b	22,7 c	1,8 b	3,6 d
500	93,1 b	93,1 bc	13,6 b	22,6 c	2,1 b	2,0 c
1000	87,5 b	77,8 b	14,1 b	18,5 b	1,7 b	1,1 b
2000	65,5 a	60,0 a	8,2 a	6,2 a	1,1 a	0,9a

Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos de Cu ($p < 0,05$).

Debido a estos resultados, se decidió no seguir trabajando con el nivel de contaminación 2000 mg kg⁻¹, el más elevado de los inicialmente propuestos, ya que afecta considerablemente al desarrollo de las plantas, y por lo tanto no es viable para un ensayo de fitorrecuperación de Cu en suelo.

4.1.3. Efecto del ramnolípido en la extracción de Cu en suelos

Los suelos de Coria y Constantina, contaminados artificialmente con una concentración conocida de cobre, 1000 mg Cu/kg suelo, se sometieron a extracciones con diferentes concentraciones de ramnolípido JBR-425.

La figura 4.2 muestra que un aumento de la concentración del ramnolípido favorece la extracción de cobre en los suelos estudiados, especialmente en el suelo de Coria del Río. Este comportamiento puede explicarse por la capacidad del ramnolípido para formar complejos estables con el cobre, lo que facilitaría su movilidad con vistas a su fitoextracción. 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).

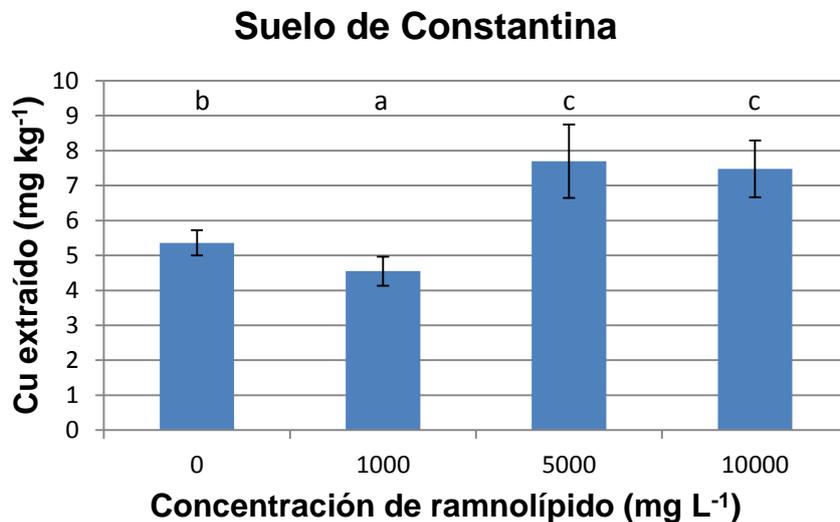
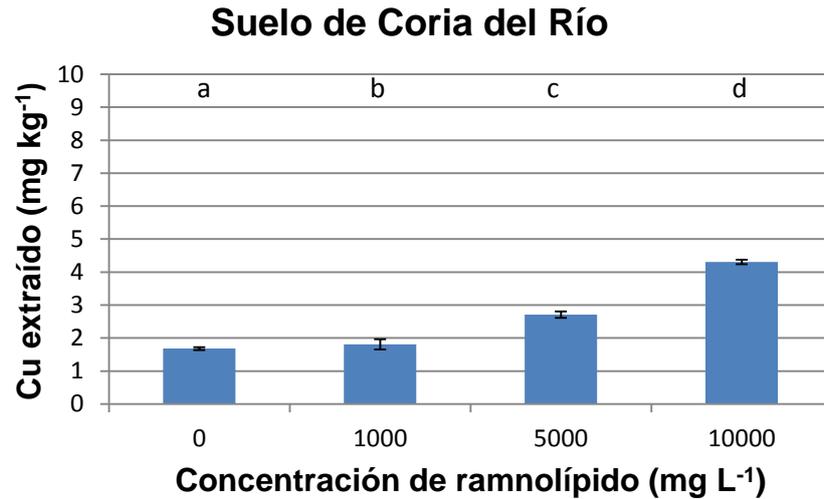


Figura 4.2. Cu extraído en suelos con distintas concentraciones de ramnolípido. Letras diferentes en columnas para el mismo suelo indican diferencias de medias significativas ($p < 0,05$).

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 es de 5,6. En suelos básicos el ión Al^{3+} no estaría en disolución, pero la presencia de otros iones abundantes en la solución del suelo como el ión calcio podrían interferir sólo en el caso de que sus concentraciones fueran mucho más altas que la del ión Cu^{2+} .

Mientras ligandos complejantes como el AEDT, también empleados para extraer metales de suelos, pueden ser persistentes en el medio ambiente, los ramnolípidos pueden permanecer en el suelo el tiempo suficiente para favorecer la fitoextracción de metales, pero no el suficiente para el transporte de metal a

largo plazo (Wen y col., 2009). Tales compuestos forman complejos con un amplio grupo de metales (Ochoa-Loza y col., 2001), contribuyendo a la descontaminación de los suelos (Juwarkar y col., 2007, 2008; Stacey y col., 2008). Sin embargo, la retención de las moléculas complejantes en las superficies sólidas puede reducir o incluso impedir su acción movilizadora hacia los metales (Wen y col., 2010), y de hecho algunos autores, en contraste con algunos de los citados anteriormente, no han encontrado una liberación significativa de metales de suelos contaminados (Franzetti y col., 2008). Esto explicaría que en el suelo de Constantina la dosis más alta de ramnolípido (10000 mg/L) no incremente la extracción del Cu, quizás por quedar adsorbido en la materia orgánica o en las fracciones más finas del suelo (limo más arcilla), ya que ambas fracciones son más abundantes en este suelo que en el de Coria. Las extracciones de Cu con ramnolípido en el suelo de Coria del Río son un 60% y un 69,5% inferiores a las extracciones obtenidas el suelo de Constantina, para la dosis de ramnolípido de 1000 mg L⁻¹ y 5000 mg L⁻¹, respectivamente. Este comportamiento también podría deberse al menor pH del suelo de Constantina (Tabla 3.1), ya que pH bajos favorecen la solubilidad de los EPTs.

4.1.4. Crecimiento de las plantas fitoextractoras en presencia de ramnolípidos

El ramnolípido producido por la bacteria *Pseudomonas Aeruginosa*, se ha estudiado ampliamente para la fitoextracción de metales (Jordan y col., 2002, Johnson y col., 2009) y recuperación de suelos contaminados por elementos potencialmente tóxicos (Mulligan, 2005, 2007).

En el ensayo del efecto del ramnolípido en el crecimiento de las plantas fitoextractoras (Figura 4.3), se observa que las que la dosis de 5000 mg kg⁻¹ y 10000 mg kg⁻¹ provocan descensos significativos de la biomasa fresca de cebada del 21 %, y 35% respectivamente frente al control. En las plantas de mostaza el efecto del ramnolípido no es significativo frente al control debido a la alta dispersión de los datos obtenidos en éste, aunque se observa que la dosis de 1000mg kg⁻¹ produjo un incremento de un 30,5% en la biomasa, mientras que las dosis de 5000 y 10000 mg kg⁻¹ provocaron descensos del 39% y 60% respectivamente frente al control.

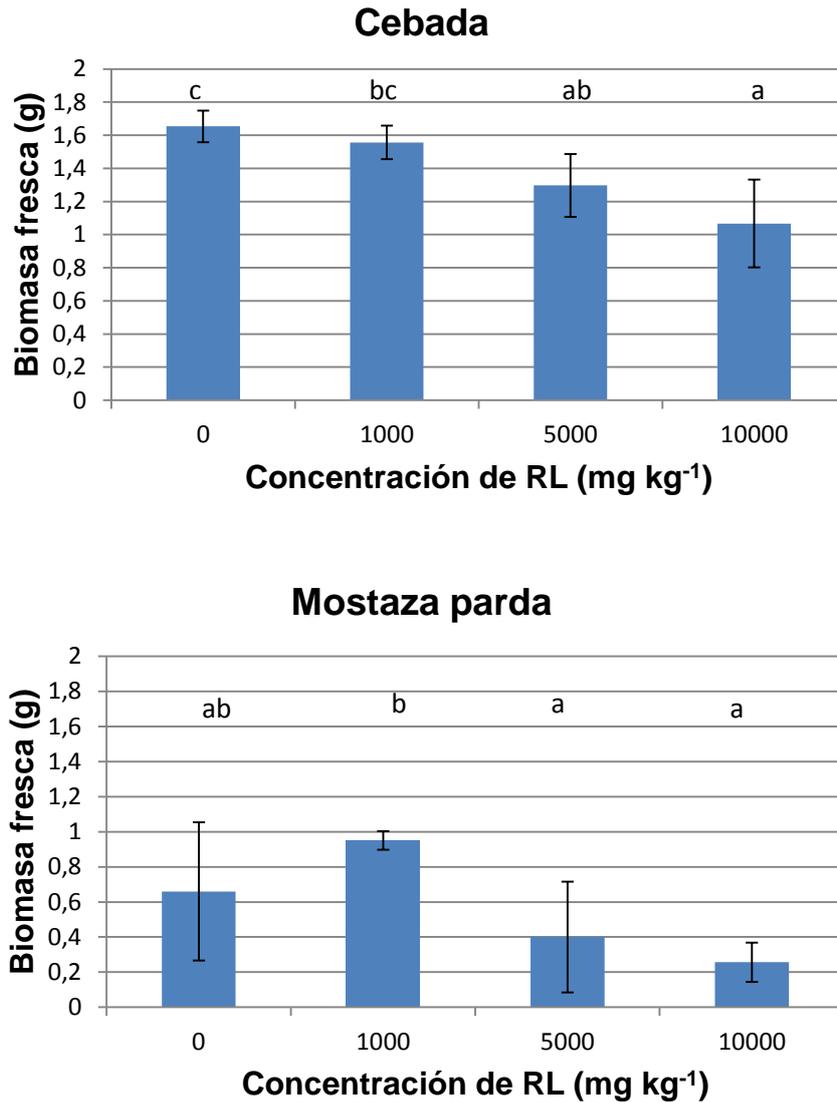


Figura 4.3. Influencia de distintas concentraciones de ramnolípidos en la biomasa fresca de la cebada y de la mostaza parda en suelo de Coria del Río. Letras minúsculas distintas para un mismo cultivo indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Debido a este descenso significativo de biomasa en los tratamientos con mayores dosis de ramnolípidos, las descartamos y el ensayo de fitoextracción se decide realizar con la dosis más baja de las empleadas, 1000 mg kg⁻¹, a pesar del mayor poder de extracción de Cu en suelo de las mayores dosis de ramnolípidos usadas, tal como se ha descrito en el punto 4.3.

4.2. EFECTO DEL RAMNOLÍPIDO EN LA FITOEXTRACCION DE COBRE DE SUELOS

4.2.1. Desarrollo de las plantas

Los resultados del estudio se analizaron en base a en las observaciones de los síntomas de toxicidad, rendimiento de biomasa aérea y la concentración de metal en los tejidos de las plantas.

Para estimar los efectos de los tratamientos con Cu en la germinación de la cebada se contó el número de semillas germinadas (Figura 4.4) y se midió la altura de las plantas (Figura 4.5). Ambas variables fueron determinadas antes de la aplicación del ramnolípido. Las macetas de cada cultivo y concentración de metal se dividieron en dos bloques de tres macetas cada uno, uno de los cuales se usó como control y el otro recibió una dosis de ramnolípido de 1000 mg kg^{-1} de suelo para determinar el efecto del ramnolípido en la fitoextracción, así como en el crecimiento de las plantas.

Germinación

En la figura 4.4 se presentan la de germinación de cebada en ambos suelos en ausencia y presencia de Cu y ramnolípido y en la tabla 4.3 se presenta el análisis de la varianza correspondiente.

En la Tabla 4.3 se presentan los datos del análisis ANOVA global, usando como variable el porcentaje de semillas germinadas de cebada, donde se observa que de forma general sí hay efecto de la dosis de Cu añadida.

Sin embargo, en el suelo de Coria del Río el efecto del nivel de Cu no es significativo (Figura 4.4), quizás por la mayor capacidad que tiene el suelo para adsorber el cobre, haciendo que éste no quede biodisponible, mientras que en el suelo de Constantina sí lo es, germinando menos semillas en las macetas con mayor dosis de Cu. El descenso de la germinación fue de un 18,8% para la dosis de cobre de 1000 mg kg^{-1} de suelo respecto del control. La dosis de cobre aplicada sólo presenta efecto fitotóxico en el suelo de Constantina, posiblemente debido a su menor capacidad de adsorción de cobre, (Figura 4.2).

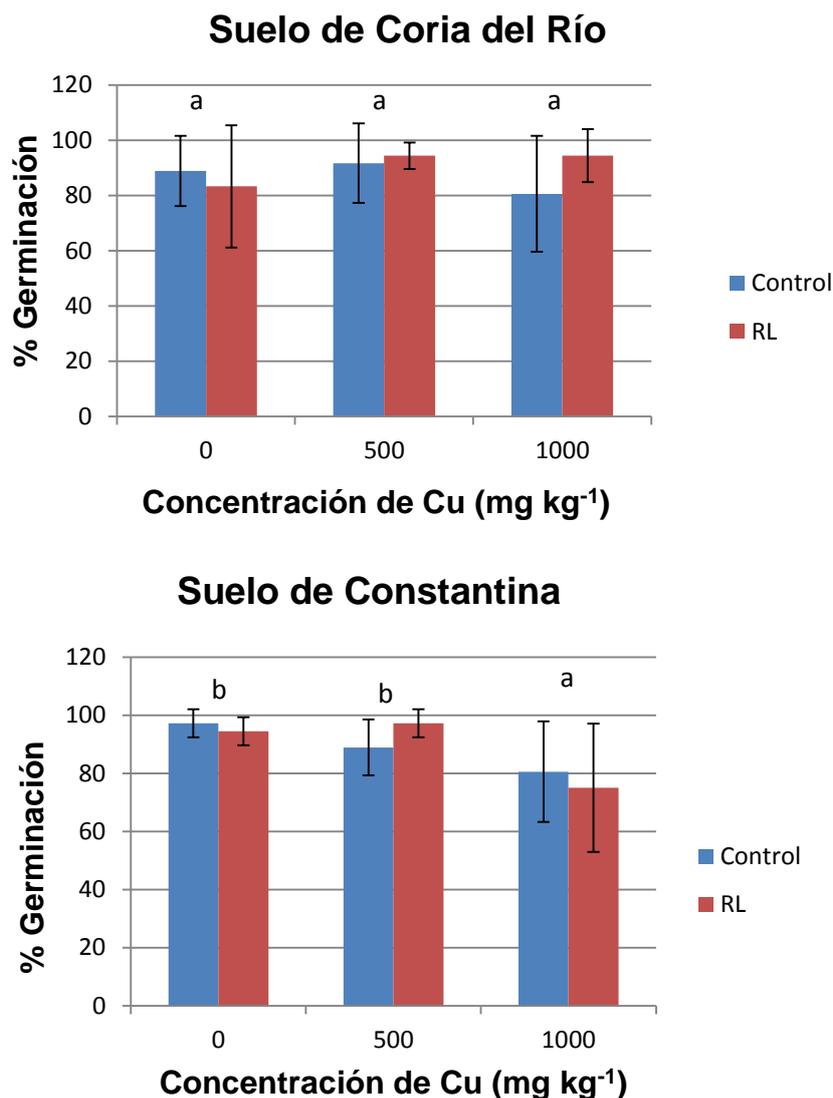


Figura 4.4. % Germinación de cebada en suelo de Coria del Río y Constantina. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 4.3. Resumen del análisis de la varianza (ANOVA) para la germinación de semillas germinadas en cebada y mostaza parda, en suelos de Coria del Río y Constantina.

ANÁLISIS DE LA VARIANZA	% GERMINACIÓN	VALOR p
	Efecto de la planta	0 *
	Efecto del suelo	0,9999
	Efecto del tratamiento de Cu	0,0255 *
	Efecto del ramnolípido	0,2929

El asterisco indica un efecto estadísticamente significativo del factor con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

No se aprecia efecto significativo de los bloques de macetas en la germinación de las semillas, lo que implica que antes de añadir el ramnolípido no había diferencias entre las macetas con los mismos niveles de Cu. Ambos bloques no reciben ningún tratamiento diferente hasta la adición del ramnolípido

en el día 15 del experimento, por lo cual es lógico que aún no presenten ninguna diferencia entre ellos, y aparentemente no hay influencias externas que están influyendo en el crecimiento de las plantas.

Altura

En lo que respecta a la medición de las plantas de cebada, la figura 4.5 muestra los resultados obtenidos en ambos suelos en presencia y ausencia de Cu y ramnolípidos y en la tabla 4.4 se presenta el análisis de la varianza correspondiente. En la medición de la altura de las plantas (Figura 4.5), ocurre lo mismo que en la germinación de las semillas, obteniéndose sólo diferencias estadísticamente significativas en suelo de Constantina y obteniéndose menor altura en las macetas con mayor dosis de Cu. El efecto fitotóxico del cobre en el suelo de Constantina se aprecia a la dosis de 1000 mg de Cu/kg de suelo con una reducción en altura del 18,5% en la cebada. No se aprecia efecto significativo de los bloques de macetas en la altura de planta.

Biomasa fresca

Tras la determinación de las variables descritas, se aplicó el ramnolípidos JBR-425 en una dosis de 1000 mg kg⁻¹ de suelo a las macetas de uno de los bloques, quedando el otro bloque como control. Tras 30 días de cultivo en cámara bajo condiciones controladas se recolectó la parte aérea de las plantas y se determinaron los pesos de biomasa aérea en cada maceta. En la figura 4.6 se presentan los datos de biomasa fresca referente a cebada y en la figura 4.7 aquellas referentes a mostaza.

La reducción en el rendimiento de la biomasa observado en los ensayos se puede atribuir a la adición de concentraciones de metales (Chen y Cutright, 2001).

La biomasa y el nivel de bioacumulación de metal alcanzado por las plantas son los dos factores claves que definen la eficiencia del proceso de fitoextracción (McGrath & Zhao, 2003), y es obvio que aquellas especies con un bajo nivel de acumulación requieren demasiado tiempo para la recuperación de un suelo.

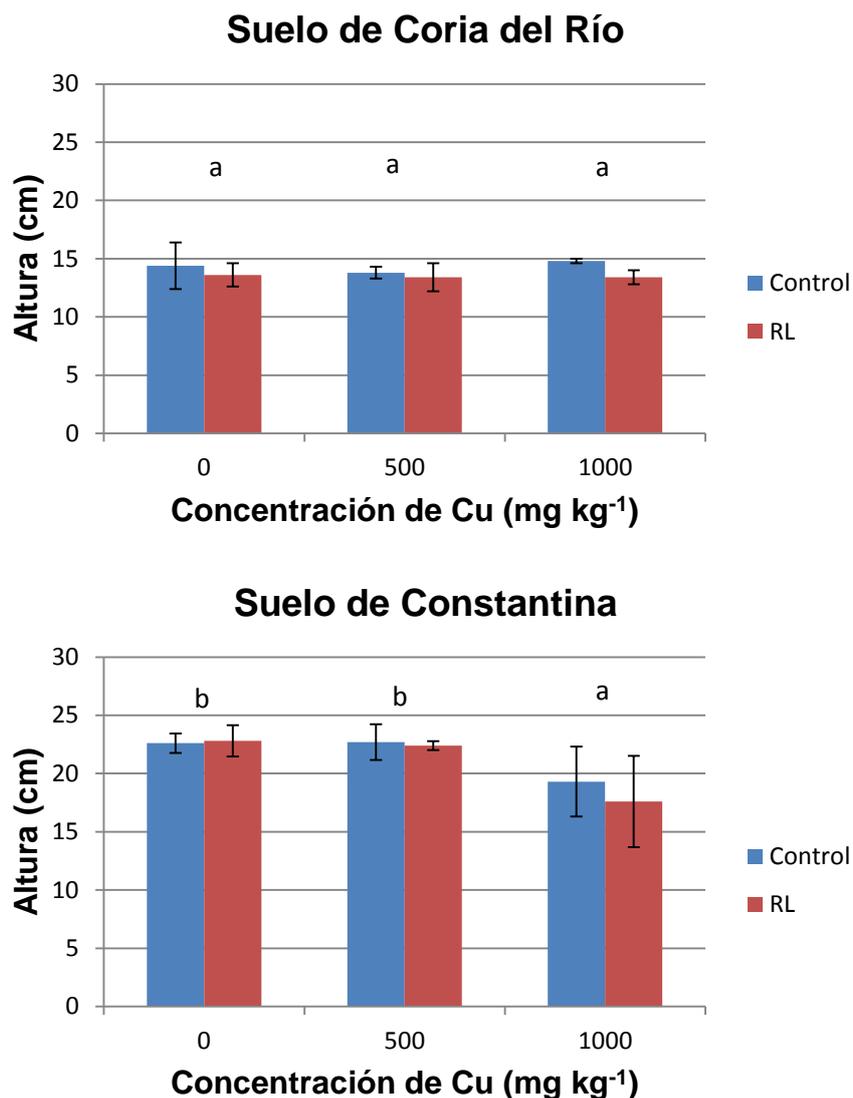


Figura 4.5. Altura (cm) de cebada en suelo de Coria del Río y Constantina. Letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre tratamiento de Cu ($p < 0,05$).

Tabla 4.4. Resumen del análisis de la varianza (ANOVA) para la altura (cm) de las plantas de cebada y mostaza parda, en suelos de Coria del Río y Constantina.

ANÁLISIS DE LA VARIANZA	ALTURA	VALOR p
	Efecto de la planta	0,0000 *
	Efecto del suelo	0,0000 *
	Efecto del tratamiento de Cu	0,0000 *
	Efecto del ramnolípido	0,3711

El asterisco indica un efecto estadísticamente significativo del factor con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

En el desarrollo de la biomasa fresca, se puede observar que hay diferencias significativas de forma global entre los distintos factores que pueden influir (Tabla 4.5).

Para el caso de la cebada sembrada en suelo de Coria del Río (Figura 4.6), las plantas no presentan diferencias significativas entre los distintos tratamientos tanto de dosis de Cu como de adición de ramnolípidos, mientras que las plantas de cebada sembrada en suelo de Constantina y para las plantas de mostaza sembrada en ambos suelos, Coria del Río y Constantina (Figura 4.7), sí existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos con Cu (Tabla 4.5).

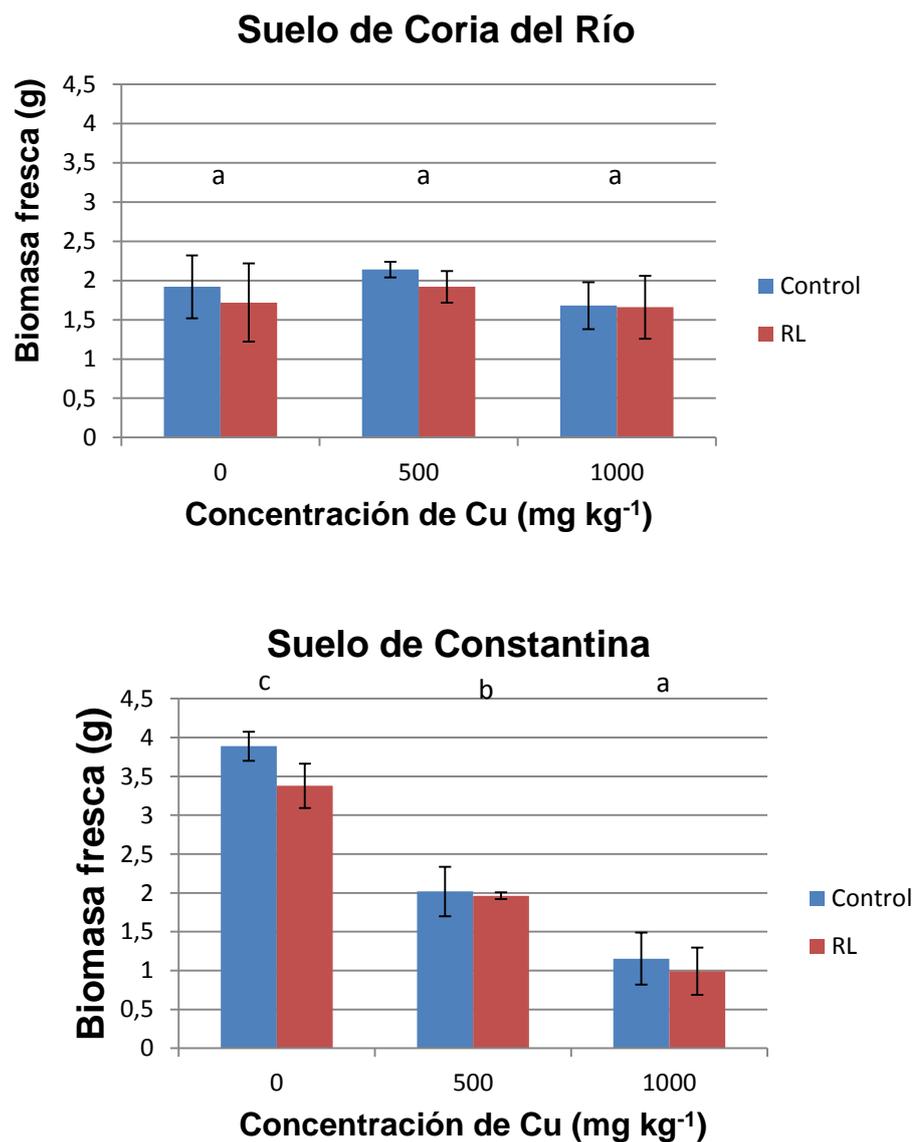


Figura 4.6. Biomasa fresca (g) de cebada en suelo de Coria del Río y Constantina. Letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre tratamiento de Cu ($p < 0,05$).

Se observa que en suelo de Coria del Río la biomasa fresca es similar entre las distintas concentraciones de Cu, mientras que en suelo de Constantina, la mayor biomasa fresca se obtiene en las macetas en ausencia de Cu, lo que

puede indicar que el efecto fitotóxico del Cu es más acusado debido a que en el suelo de Constantina está más biodisponible.

En el caso de las plantas de mostaza sembradas en suelo de Constantina (figura 4.7), se observa que también hay diferencias significativas entre tratamientos con y sin ramnolípidos. La concentración mayor de cobre en solución posiblemente indujo efectos negativos en su crecimiento y disminuyó significativamente la biomasa aérea en relación al control. La dosis de Cu de 500 mg kg⁻¹ resultó ser fitotóxica en presencia de ramnolípido, ya que se produjo una reducción de biomasa del 76,6 %, mientras que en ausencia del RL la misma dosis de Cu no resultó fitotóxica, lo que vuelve a poner en evidencia que ramnolípido ejerce una acción extractora del Cu presente en el suelo.

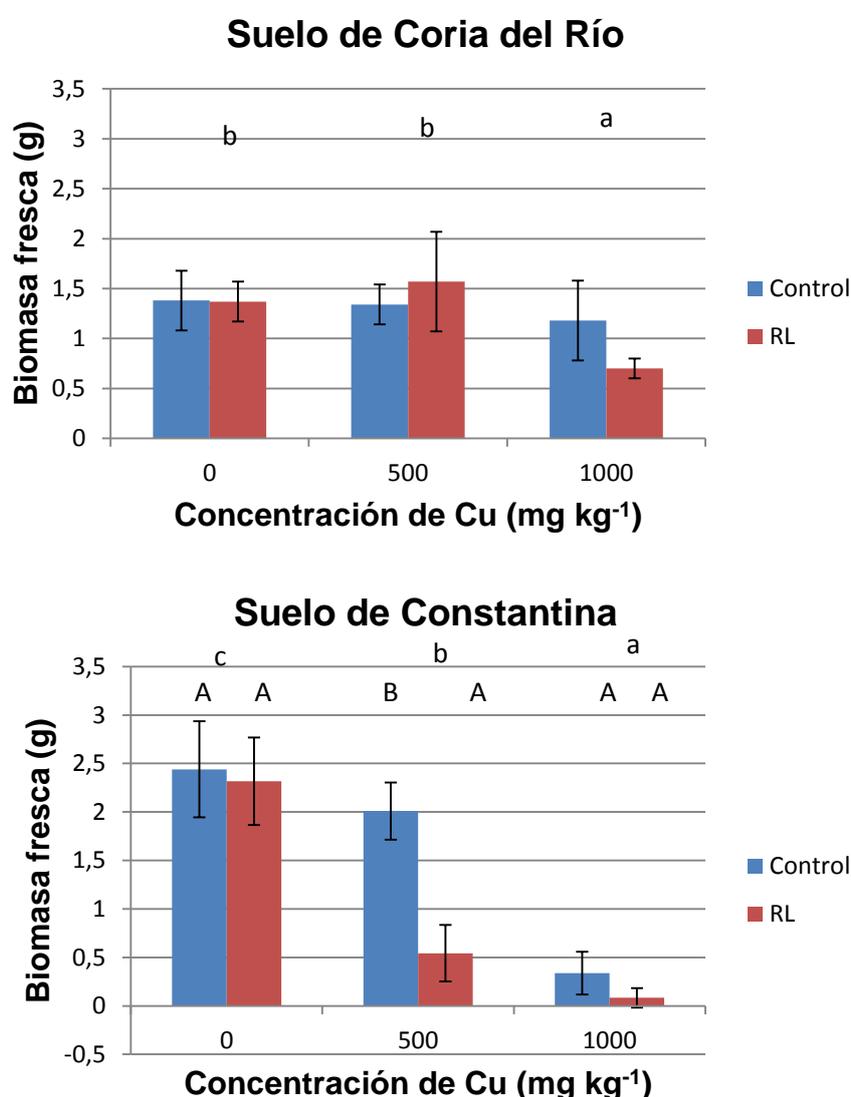


Figura 4.7. Biomasa fresca (g) de mostaza parda en suelo de Coria del Río y Constantina. Letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre tratamiento de Cu ($p < 0,05$). Letra mayúscula diferentes para el mismo tratamiento de Cu, indican diferencias estadísticamente significativa entre tratamiento de RL ($p < 0,05$).

Tabla 4.5. Resumen del análisis de la varianza (ANOVA) para la biomasa fresca (g) de la parte aérea de las planta de cebada y mostaza parda, en suelos de Coria del Río y Constantina.

ANALISIS DE LA VARIANZA	BIOMASA FRESCA	VALOR p
	Efecto de la planta	0,0000 *
	Efecto del suelo	0,0074 *
	Efecto del tratamiento de Cu	0,0000 *
	Efecto del ramnolípido	0,0007 *

El asterisco indica un efecto estadísticamente significativo del factor con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Biomasa seca

En la tabla 4.6, se muestran los resultados del análisis ANOVA del peso de biomasa seca de la parte aérea de las plantas de cebada y mostaza en los dos tipos de suelo. En ella se puede ver que no existen diferencias significativas entre los dos suelos ni entre el efecto del tratamiento con ramnolípidos, pero sí se pueden observar diferencias entre los distintos niveles de tratamiento con Cu. En las figuras 4.8 y 4.9 se observa que hay una reducción de biomasa seca a medida que la concentración de Cu es mayor en el suelo de Constantina, siendo esta reducción del 55.5% en cebada y del 91.6% en mostaza para la dosis más alta con respecto al control. Este efecto tóxico para la cebada ya se aprecia también para la dosis media en este suelo, con una reducción del 27.04%.

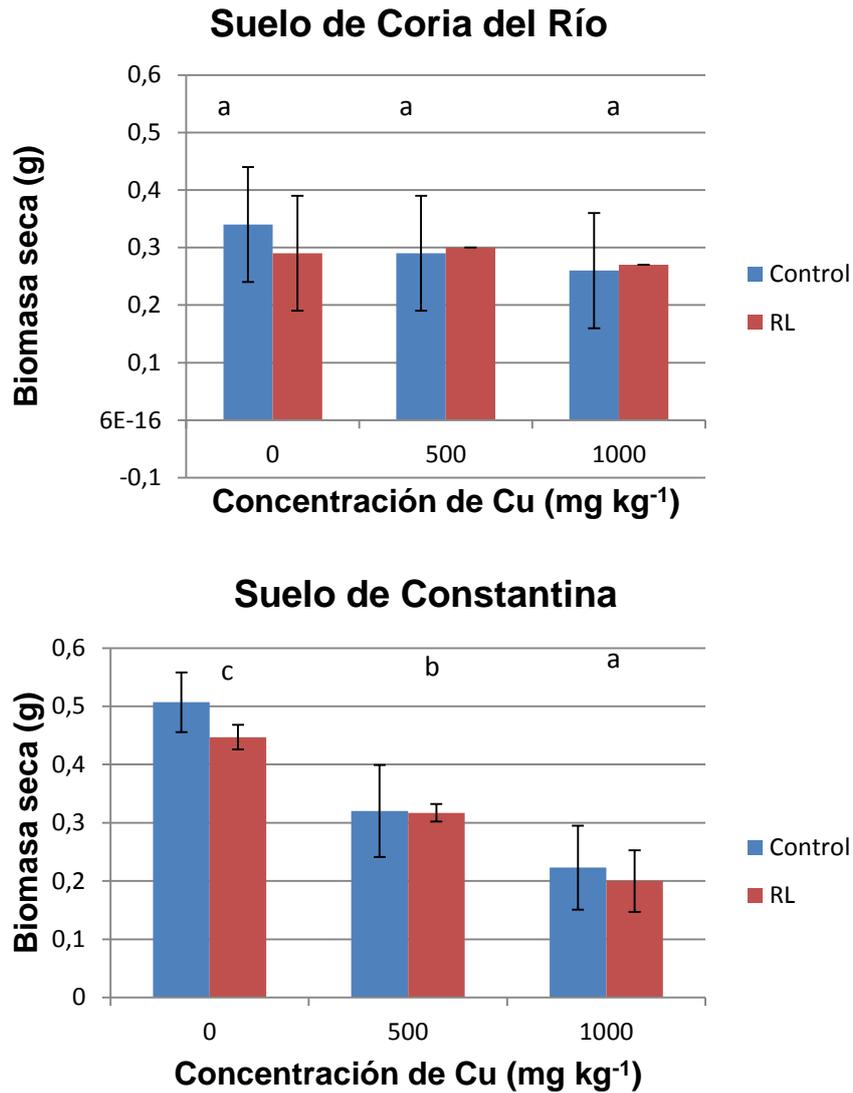


Figura 4.8. Biomasa seca (g) de cebada en suelo de Coria del Río y Constantina. Efecto de la contaminación con Cu y la presencia de ramnolipido (1000 mg kg⁻¹). Letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre tratamiento de Cu ($p < 0,05$).

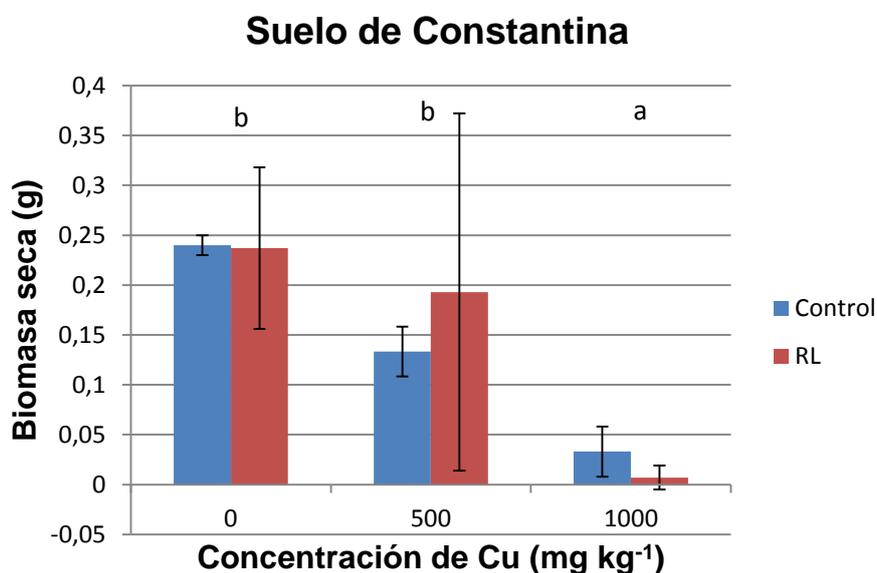
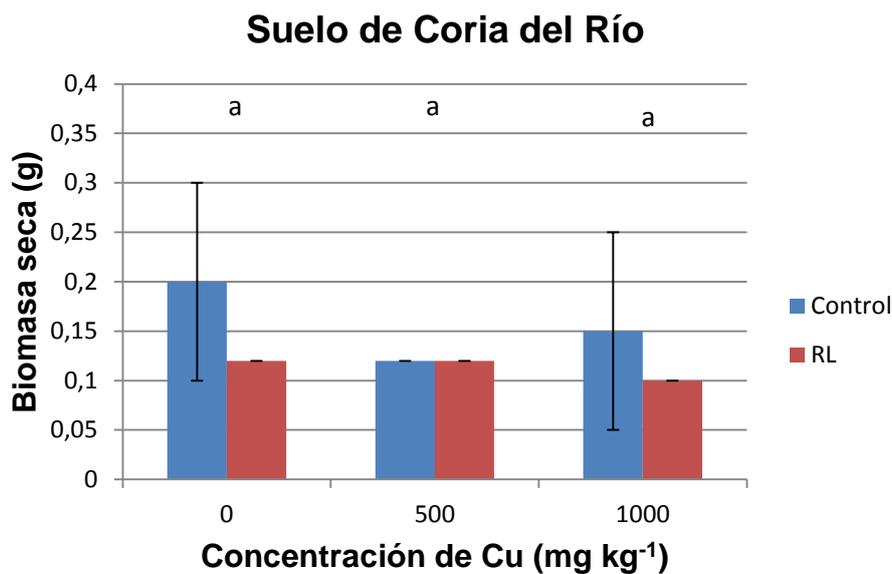


Figura 4.9. Biomasa seca (g) de mostaza parda en suelo de Coria del Río y Constantina. Efecto de la contaminación con Cu y la presencia de ramnolípido (1000 mg kg⁻¹). Letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre tratamiento de Cu ($p < 0,05$).

Tabla 4.6. Resumen del análisis de la varianza (ANOVA) para la biomasa seca (g) de la parte aérea de las planta de cebada y mostaza parda, en suelos de Coria del Río y Constantina.

ANÁLISIS DE LA VARIANZA	BIOMASA SECA		Valor p
	Efecto de la planta		0,0000 *
	Efecto del suelo		0,0814
	Efecto del tratamiento de cu		0,0000 *
	Efecto del ramnolípido		0,1764

El asterisco indica un efecto estadísticamente significativo del factor con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

4.2.2. Contenido de Cu en plantas

Al finalizar el ensayo se determinó la concentración de cobre en los tejidos aéreos de ambas plantas. Los mecanismos de absorción de Cu por las plantas aún no están del todo claros, ya que se ha observado una probable absorción pasiva de Cu, especialmente cuando la concentración de la solución en que crecen las plantas está en el rango tóxico del metal aun cuando existen numerosas evidencias respecto a su absorción activa (Kabata-Pendias, 2000). En los tejidos de la raíz, el Cu se encuentra casi completamente en formas complejas, sin embargo, es muy probable que el metal ingrese a las células de las raíces en formas disociadas y a tasas diferentes según la especie del metal.

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

Los contenidos de metales que han sido determinados en la parte aérea de las plantas y los efectos de los tratamientos variaron de un suelo a otro. Se observaron contenidos de metales más elevados en las plantas de mostaza (Figura 4.10) que en las de cebada, a pesar de que en las plantas de mostaza se obtuvo menor biomasa. *Brassica juncea*, es una productora de gran biomasa y posee la capacidad de hiperacumular varios metales (Nanda y col., 1995). Según Salt y col., 1998, la cebada posee mejor capacidad de acumulación de metal y mayor producción de biomasa. La concentración de cobre en la solución afectó significativamente a la concentración de cobre en los tejidos aéreos. A mayor concentración de cobre en la solución, se observó una mayor concentración de cobre en dichos tejidos (Figuras 4.10 y 4.11) en ambos suelos. Sí se pudieron apreciar diferencias significativas entre los distintos niveles de Cu, en los cuales la mayor cantidad de Cu que pudo extraer la planta fue de forma general para la dosis media, 500 mg kg⁻¹ Cu. La planta aumenta la absorción de metal en la parte aérea al incrementarse la concentración total de metales en suelo, hasta que alcanza un valor máximo o umbral a partir del cual la planta no responde a mayores aplicaciones de Cu, incluso se alcanza el nivel tóxico y se observa una reducción de la producción, como se observa en general para la concentración de 1000 mg kg⁻¹ Cu, y sobre todo en el caso de las macetas de mostaza en suelo de Constantina, que no se pudieron medir, ya que la biomasa seca (Figura 4.9) obtenida fue demasiado pequeña para la detección del metal en la parte aérea de la planta.

La capacidad de exclusión/acumulación de metales por las plantas estudiadas puede ser cuantificada mediante el cálculo del factor de bioacumulación (FB), que muestra la relación existente entre la concentración de

metal en la parte aérea de las plantas y la concentración de metal en el suelo (Mattina y col., 2003; McGrath & Zhao, 2003). Se consideran especies excluidoras las que poseen FB menores que 1, más bajos cuanto mayor es su capacidad de exclusión. Por el contrario, son especies acumuladoras las que presentan valores de FB mayores que 1, tanto más elevados cuanto mayor es su capacidad de acumulación.

En este ensayo, se extrajo poca cantidad de Cu, con respecto a la cantidad aplicada al suelo. El Cu tiene una movilidad relativamente baja respecto a otros elementos en las plantas, permaneciendo en los tejidos de las raíces y hojas hasta su senescencia, de esta forma, los órganos jóvenes generalmente son los primeros en desarrollar síntomas de deficiencia de Cu. El exceso de cobre suele presentarse con valores de 300 mg de Cu/kg 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.

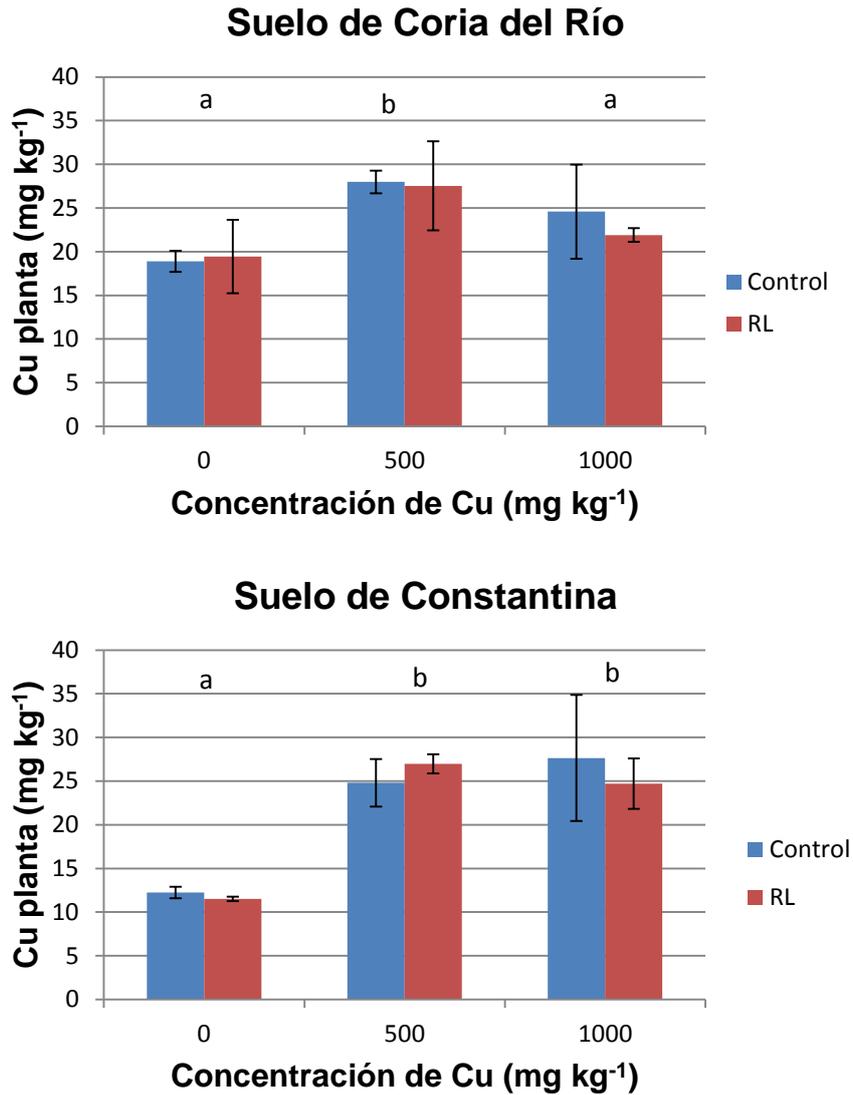


Figura 4.10. Contenido de Cu (mg kg⁻¹) en la parte aérea de cebada en suelo de Coria del Río y Constantina. Letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre tratamiento de Cu ($p < 0,05$).

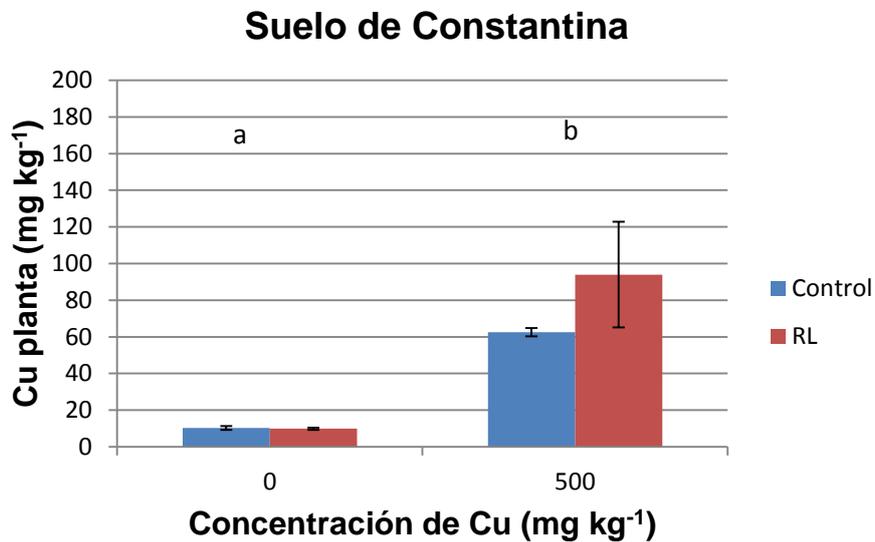
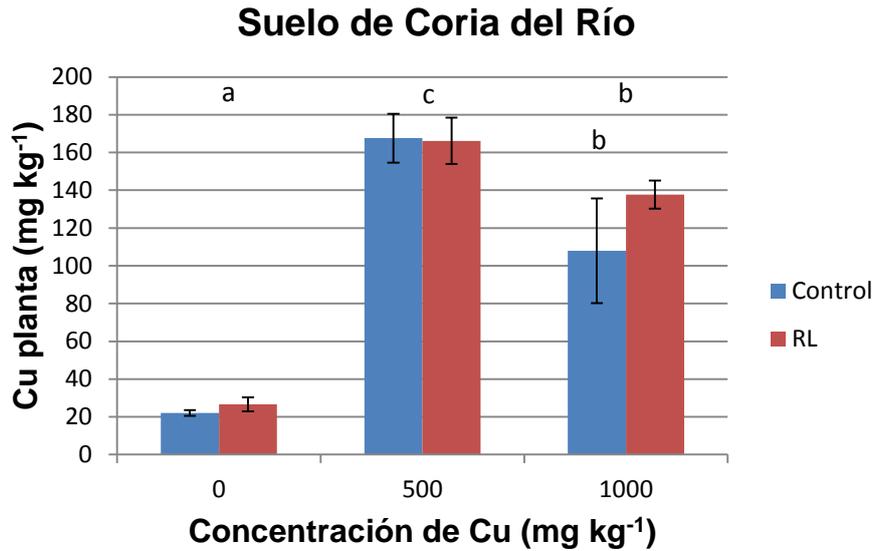


Figura 4.11. Contenido de Cu (mg kg⁻¹) en la parte aérea de mostaza parda en suelo de Coria del Río y Constantina. Letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre tratamiento de Cu ($p < 0,05$).

Tabla 4.7. Resumen del análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de Cu (mg kg⁻¹) en la parte aérea de las plantas de cebada y mostaza parda, en suelos de Coria del Río y Constantina.

ANÁLISIS DE LA VARIANZA	Cu EN PLANTA		VALOR p
	Efecto de la planta		0 *
	Efecto del suelo		0,0014 *
	Efecto del tratamiento de Cu		0 *
	Efecto del RL		0,465

El asterisco indica un efecto estadísticamente significativo del factor con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Rendimiento de la técnica de fitoextracción

En la tabla 4.8 se presenta el rendimiento del proceso de fitoextracción a que han sido sometidos ambos suelos. Se observa que la proporción de Cu extraído es muy baja en todos los casos, equivalente a unos 2 mg Cu kg⁻¹ suelo lo que es inapreciable en la práctica para esos niveles de contaminación. Se puede concluir por lo tanto, que la aplicación de esta técnica requiere menores niveles de contaminación y mayores niveles de biomasa en los cultivos seleccionados, para conseguir una reducción efectiva del nivel de Cu en suelos.

Tabla 4.8. Porcentaje de Cu extraído por las plantas en los suelos contaminados.

Tratamiento	Suelo	Planta	
		Cebada	Mostaza
Cu-500	Coria del Río	4,6 10 ⁻³	11,8 10 ⁻³
Cu-500-RL	Coria del Río	4,6 10 ⁻³	11,6 10 ⁻³
Cu-1000	Coria del Río	3,6 10 ⁻³	8,6 10 ⁻³
Cu-1000-RL	Coria del Río	3,4 10 ⁻³	5,9 10 ⁻³
Cu-500	Constantina	4,4 10 ⁻³	4,8 10 ⁻³
Cu-500-RL	Constantina	4,9 10 ⁻³	12,3 10 ⁻³
Cu-1000	Constantina	1,7 10 ⁻³	--
Cu-1000-RL	Constantina	1,4 10 ⁻³	--

-- Sin suficiente biomasa para cuantificar.

4.2.3. Efecto del ramnolípido en la disponibilidad de Cu en suelos

La cantidad de cobre en los suelos varía de acuerdo a su tipo y al uso que se le haya dado al suelo. La distribución de metales se estima que varía con las principales características físicas y químicas del suelo (Lacerda y col. 1993).

Con el objetivo de simular la biodisponibilidad de los metales para las plantas, se han empleado diferentes métodos de extracción química de metales (Chaignon y col., 2003; Feng y col., 2005; Meers y col., 2007).

Extracción de metales con AEDT

La extracción de metales con AEDT es un método desarrollado para estimar la disponibilidad para las plantas de dichos metales en el suelo. El conjunto de metales potencialmente tóxicos disponibles incluye, según Brümmer (1986), las fracciones de la fase sólida del suelo que pueden ser liberados a la disolución del suelo en un plazo de tiempo relativamente corto, como puede ser un período vegetativo. 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. Se supone, no obstante, que algunos factores pueden afectar la capacidad complejante del AEDT, como la materia orgánica, el contenido de óxidos e hidróxidos de metales, pH, etc. (Sims & Johnson, 1991), y que puede ocurrir una saturación de su capacidad de extracción debido a la alta

concentración de metales presentes en la solución, por lo que su interpretación deber ser cuidadosa (National Research Council, 2003).

En este ensayo se puede ver que de forma global afectan significativamente al Cu disponible con AEDT todos los factores que se han tenido en cuenta a la hora de realizar el experimento (Tabla 4.8 y Figura 4.12).

Los suelos estudiados se comportaron significativamente de distinta forma, ya que en el suelo de Coria del Río tuvo lugar una mayor extracción de Cu que en el suelo de Constantina. La composición granulométrica de los suelos tiene una gran importancia en la retención de los metales debido a las fracciones más finas, fundamentalmente, a la capacidad de adsorción de las arcillas. (Giusti, 2001; Huang & Lin 2003), mientras que la fracción arena tiene una baja capacidad de adsorción. Por otra parte, en el suelo los iones de Cu presentan una alta afinidad para formar complejos con la materia orgánica. De esta forma, es frecuente que la materia orgánica del suelo sea un factor predominante en determinar la biodisponibilidad del Cu (del Castilho et al., 1993). Así es posible que el mayor contenido de MO del suelo de Constantina, junto con el alto porcentaje de fracción arena del suelo de Coria del Río, sean responsables de la mayor disponibilidad de Cu en este suelo.

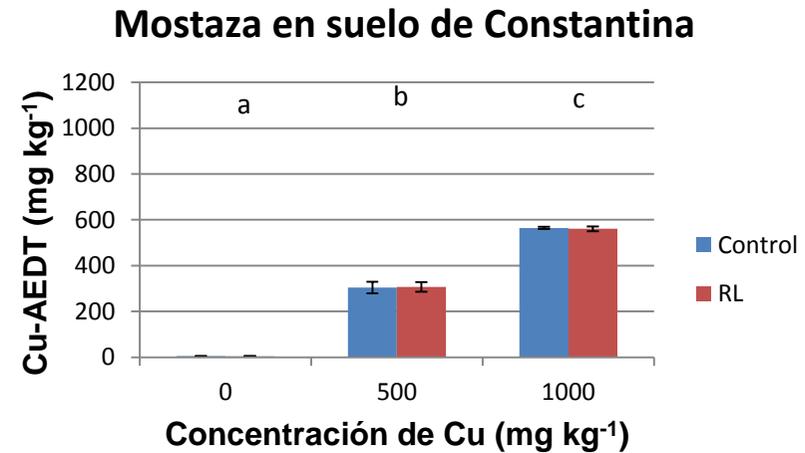
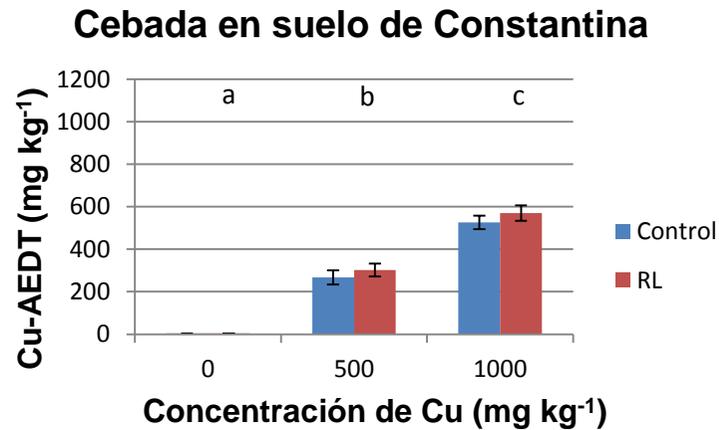
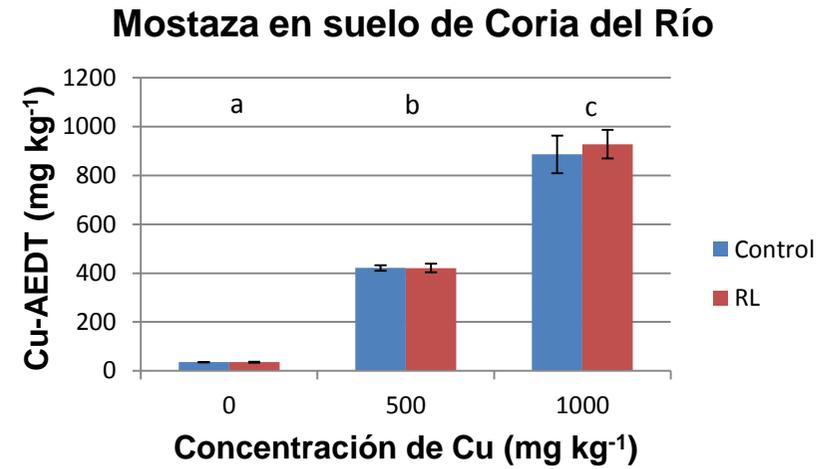
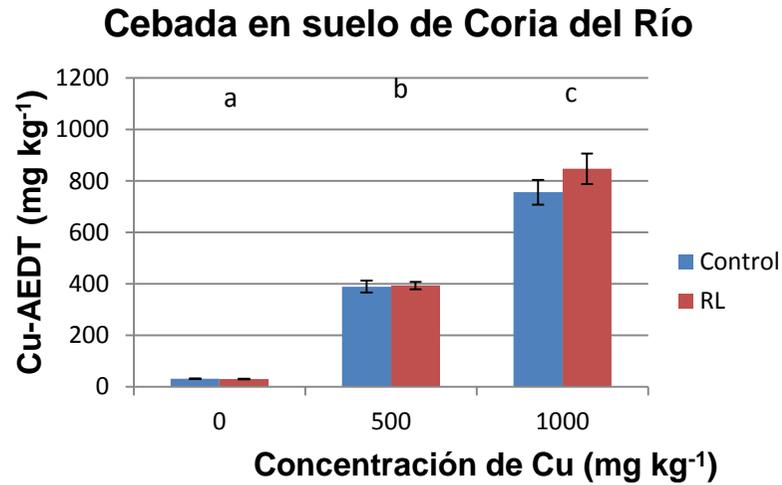


Figura 4.12. Contenido de Cu (mg kg⁻¹) extraído con AEDT en ambos suelos y cultivos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre tratamiento de Cu ($p < 0,05$).

Para el conjunto del estudio hay cierto efecto del tratamiento con ramnolípido (Tabla 4.9), encontrando valores de cobre más altos, entre un 8% y un 12%, en la parte aérea de cebada en las macetas tratadas con ramnolípido. Sin embargo, el análisis de la varianza realizado para cada suelo y planta de forma separada, mostró que el efecto del ramnolípido no es estadísticamente significativo (Figura 4.12). Por el contrario, sí hay un efecto significativo de las cantidades de Cu extraídas, que aumentan a medida que se incrementa la dosis de Cu aplicada en los tratamientos.

Tabla 4.9. Resumen del análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de Cu (mg kg⁻¹) extraídos con AEDT en suelo sembrado con cebada y mostaza parda, en suelos de Coria del Río y Constantina.

ANALISIS DE LA VARIANZA	Cu EXTRAÍDO CON AEDT	VALOR p
	Efecto de la planta	0,0002 *
	Efecto del suelo	0,0000 *
	Efecto del tratamiento de Cu	0,0000 *
	Efecto del RL	0,0163 *

El asterisco indica un efecto estadísticamente significativo del factor con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Extracción de metales con CaCl₂

Las sales neutras no tamponadas (CaCl₂, MgCl₂, NaNO₃, NH₄NO₃), que extraen los metales fácilmente intercambiables, se consideran métodos adecuados con fines ecotoxicológicos en la evaluación del riesgo de entrada de metales en la cadena trófica (Meers y col., 2007; Menzies y col., 2007).

La extracción de EPTs de un suelo con una disolución de CaCl₂ 0,01 M no tamponada es un método que se utiliza tanto para estimar la contaminación de un suelo como la disponibilidad para las plantas de metales traza. Este método ha sido recomendado en algunos países europeos (Houba y col., 1996) y combina una capacidad de extracción adecuada con una baja concentración salina en el extracto, lo cual facilita la determinación de los metales debido a que la matriz en que se encuentran es menos compleja (Pueyo y col., 2004).

El CaCl₂ es un extractante salino neutro, y se usa como una aproximación a la solución del suelo, y por lo tanto es un método para estimar la concentración de metales solubles en el suelo.

En este ensayo, se extrajeron menores cantidades de Cu que en el ensayo con AEDT. En el conjunto, se observa que hay diferencias significativas entre los suelos y entre los tratamientos de Cu, pero no se observa efecto del tratamiento con ramnolípido (Tabla 4.10).

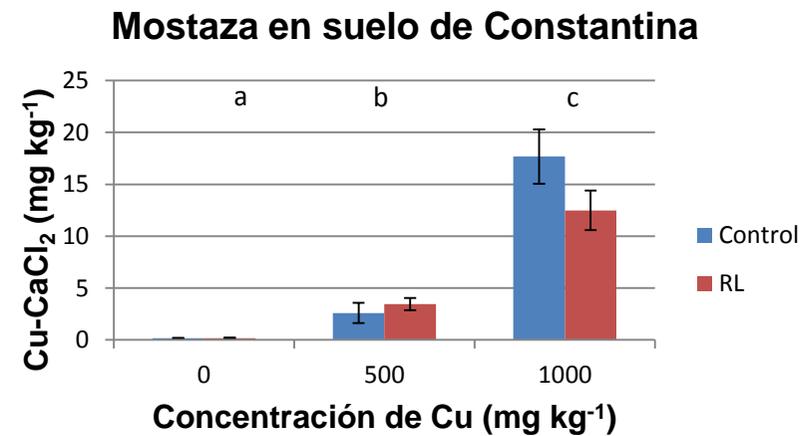
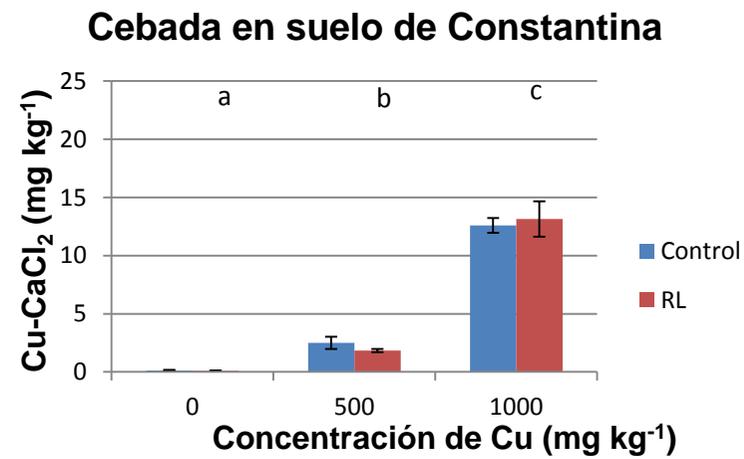
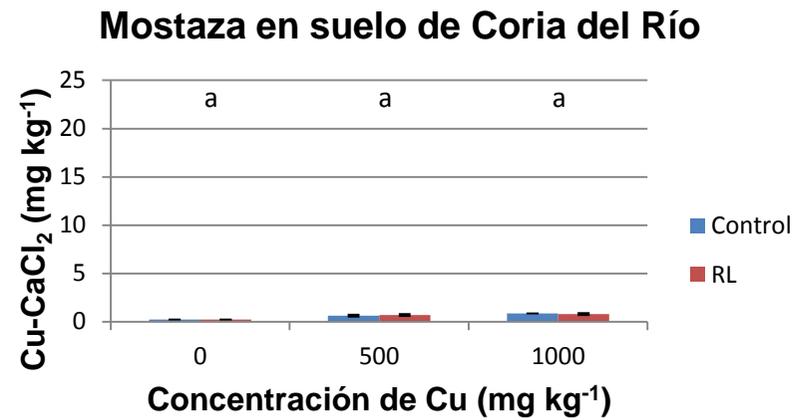
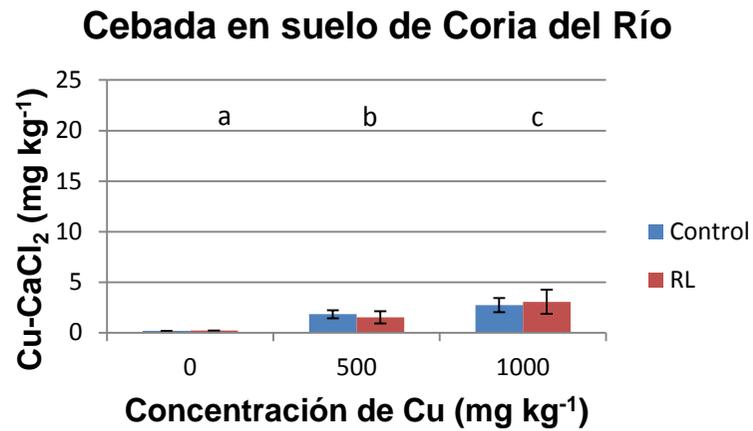


Figura 4.13. Contenido de Cu (mg kg⁻¹) extraído con CaCl₂ en ambos suelos y cultivos. Letras minúsculas diferentes indican diferencias de medias significativas entre tratamiento de Cu (p<0,05).

En el suelo de Constantina se extrajo mucha más cantidad de Cu, más de cuatro veces la extraída de media en el suelo de Coria del Río (Figura 4.13), siendo la diferencia significativa. Esta diferencia entre suelos es justo lo contrario de lo observado para el AEDT. Esto se debe probablemente al menor pH que presenta el suelo de Constantina (5.5) que hace que en la extracción con CaCl₂, que no es una disolución tamponada, el Cu se solubilice más fácilmente.

Se puede observar que para la mostaza sembrada en suelo de Constantina, el efecto del ramnolípido es estadísticamente significativo, observándose una menor extracción de cobre con CaCl₂ en los suelos con presencia de ramnolípido quizás debido a que el ramnolípido forma complejos estables con Ca (Ochoa Loza y col., 2001), disminuyendo la capacidad para intercambiar Ca con el Cu adsorbido en el complejo de cambio.

Tabla 4.10. Resumen del análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de Cu (mg kg⁻¹) extraídos con CaCl₂ en suelo sembrado con cebada y mostaza parda, en suelos de Coria del Río y Constantina.

ANALISIS DE LA VARIANZA	Cu EXTRAÍDO CON CaCl ₂	VALOR p
	Efecto de la planta	0,5031
	Efecto del suelo	0,0000 *
	Efecto del tratamiento de Cu	0,0000 *
	Efecto del RL	0,4037

El asterisco indica un efecto estadísticamente significativo del factor con un nivel de confianza del 95% (p<0,05).

Relación del Cu disponible por extracción con AEDT con el Cu por extracción con CaCl₂

En la Tabla 4.11 Se observa una gran diferencia en la cantidad de Cu disponible con AEDT respecto a CaCl₂ en el suelo de Coria, lo que indica que el metal se adsorbe más fuertemente en el suelo de Constantina, por lo que es más difícil de extraer con un extractante más agresivo como el AEDT. De hecho, como se observa en la figura 4.12, la cantidad de Cu extraída con AEDT en el suelo de Coria y en el de Constantina suponen aproximadamente un 80% y 50%, respectivamente, respecto a la contaminación inicial.

Con respecto al cultivo utilizado, en el suelo de Constantina prácticamente no se observa influencia en la relación Cu-AEDT/Cu-CaCl₂, al contrario de lo que ocurre en el suelo de Coria. En este suelo, aunque la cantidad de Cu extraído con AEDT fue similar para ambos cultivos (Figura 4.12), la mostaza dio lugar a una disminución importante en el contenido de Cu extraído con CaCl₂ (Figura 4.13).

En relación a la dosis de contaminación de Cu inicial, se observa que en el suelo de Constantina los valores de la relación Cu-AEDT/Cu-CaCl₂ para la

dosis de 1000 mg kg⁻¹ son bastante menores que los obtenidos con la contaminación más baja. Ello es debido al incremento de la fracción de Cu extraída con CaCl₂ cuando se contaminó con la dosis más alta (figura 4.13), multiplicándose x6 con respecto a la dosis de 500 mg kg⁻¹, mientras que en la extracción con AEDT solo se multiplicó x2.

Tabla 4.11. Relación entre Cu disponible con AEDT respecto a CaCl₂ al finalizar el proceso de fitoextracción según el suelo y el cultivo utilizado.

Suelo	Cultivo	Cu-AEDT / Cu-CaCl ₂	
		500 mg kg ⁻¹	1000 mg kg ⁻¹
Coria	Cebada	237	278
	Mostaza	600	1058
Constantina	Cebada	136	42.0
	Mostaza	102	37.5

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIANTE

Para una mejor comprensión de los datos obtenidos, así como para obtener una visión más general de los mismos, se ha llevado a cabo un análisis estadístico multivariable utilizando las propiedades finales del ensayo, incluyéndose los datos descritos en los apartados anteriores. Se muestran a continuación las matrices de correlación con los coeficientes de correlación de Pearson para cada pareja de variables, el número de casos incluidos en el análisis y el valor p.

Seguidamente se han realizado los análisis de correlaciones entre las variables de estudio para cada planta y cada suelo.

Correlación entre las variables de altura y producción de biomasa de plantas y contenido de Cu en planta y niveles disponibles en suelo

La matriz de correlaciones (Tabla 4.12) indica una correlación significativa ($r=-0,5706$, valor $p=0$) entre biomasa seca y Cu en planta. La figura 4.14 muestra el descenso de la biomasa seca con el aumento del contenido de Cu en la parte aérea para el conjunto de datos estudiados.

Para la cebada en ambos suelos (Tabla 4.13), se obtiene una correlación significativa entre biomasa seca y Cu en planta aumenta, el coeficiente de correlación aumenta respecto del global ($r=-0,7734$, valor $p=0$). Para la mostaza en ambos suelos (Tabla 4.14), la correlación lineal es significativa pero el coeficiente de correlación disminuye en valor absoluto respecto del global ($r=-0,4101$, valor $p=0,0244$).

Esto puede deberse a que en suelos de Coria del Río, la planta de mostaza no presenta correlación entre contenido de Cu en planta y biomasa seca, ni fresca, mientras que en suelo de Constantina, solo aparece una correlación significativa entre contenido de Cu en planta y biomasa fresca (tablas 4.16 y 4.17).

Tabla 4.12. Matriz de correlación global entre las variables de altura y producción de biomasa de plantas y contenido de Cu en planta y niveles disponibles en suelo.

ALTURA	0,1682					
N	36					
Valor p	0,3267					
BIOMASA FRESCA	0,6287	0,5355				
N	54	54				
Valor p	0*	0*				
BIOMASA SECA	0,7382	0,7253	0,815			
N	54	54	72			
Valor p	0*	0*	0*			
Cu PLANTA	-0,4071	-0,42	-0,4826	-0,5706		
N	54	48	66	66		
Valor p	0,0023*	0,003*	0*	0*		
Cu AEDT	-0,2286	-0,1208	-0,5499	-0,4338	0,4569	
N	54	54	72	72	66	
Valor p	0,0964	0,3844	0*	0,0001*	0,0001*	
Cu CaCl₂	0,0072	-0,2765	-0,5517	-0,4207	-0,066	0,3871
N	54	54	72	72	66	72
Valor p	0,9591	0,043*	0*	0,0002*	0,5987	0,0008*
	GERMINACION	ALTURA	BIOMASA FRESCA	BIOMASA SECA	Cu PLANTA	Cu AEDT

N = número de casos.

Asterisco indica correlación significativa a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Figura 4.14. Línea de regresión global entre Cu en planta frente biomasa seca.

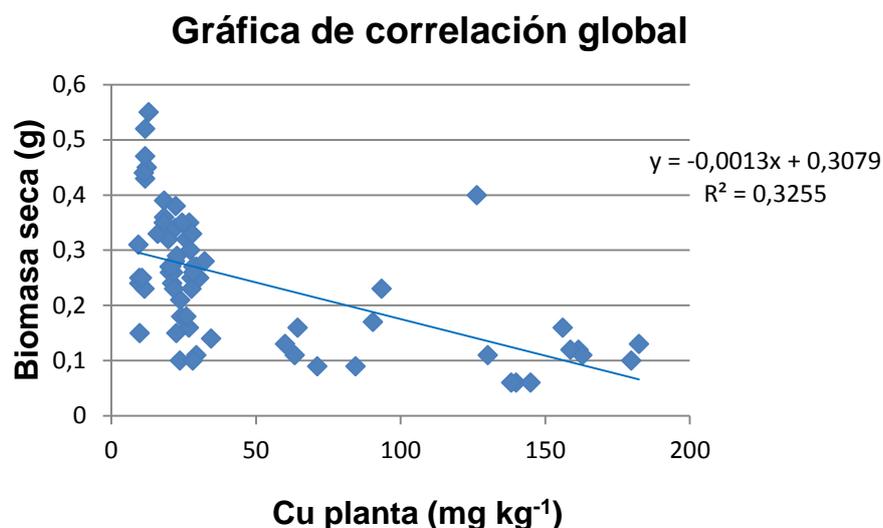


Tabla 4.13. Matriz de correlación entre las variables de altura y producción de biomasa de plantas y contenido de Cu en planta y niveles disponibles en suelo para la cebada en suelo de Coria del Río y Constantina.

ALTURA	0,1682					
Valor p	0,3267					
BIOMASA FRESCA	0,5432	0,4633				
Valor p	0,0006*	0,0044*				
BIOMASA SECA	0,6448	0,4793	0,9432			
Valor p	0*	0,0031*	0*			
Cu PLANTA	-0,3042	-0,3416	-0,7158	-0,7734		
Valor p	0,0712	0,0414*	0*	0*		
Cu AEDT	-0,1932	-0,3534	-0,6003	-0,6152	0,5357	
Valor p	0,259	0,0345*	0,0001*	0,0001*	0,0008*	
Cu CaCl₂	-0,3995	0,0362	-0,6112	-0,5856	0,4187	0,5084
Valor p	0,0158*	0,834	0,0001*	0,0002*	0,011*	0,0015*
	GERMINACION	ALTURA	BIOMASA FRESCA	BIOMASA SECA	Cu PLANTA	Cu AEDT

Número de casos = 36.

Asterisco indica correlación significativa a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Tabla 4.14. Matriz de correlación entre producción de biomasa y contenido de Cu en planta y niveles disponibles en suelo para la mostaza parda en suelo de Coria del Río y Constantina.

BIOMASA SECA	0,6206			
Valor p	0,0001*			
Cu PLANTA	-0,53	-0,4101		
Valor p	0,0026*	0,0244*		
Cu AEDT	-0,5774	-0,4941	0,7282	
Valor p	0,0002*	0,0022*	0*	
Cu CaCl₂	-0,6084	-0,5538	0,3181	0,2995
Valor p	0,0001*	0,0005*	0,0867	0,0759
	BIOMASA FRESCA	BIOMASA SECA	Cu PLANTA	Cu AEDT

Número de casos = 36.

Número de casos para Cu planta = 30.

Asterisco indica correlación significativa a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Tabla 4.15. Matriz de correlación entre las variables altura de planta , producción de biomasa, contenido de Cu en planta y niveles disponibles en suelo para la cebada en suelo de Coria del Río.

ALTURA	-0,1334					
Valor p	0,5977					
BIOMASA FRESCA	0,7191	0,106				
Valor p	0,0008*	0,6755				
BIOMASA SECA	0,7885	0,0759	0,7375			
Valor p	0,0001*	0,7648	0,0005*			
Cu PLANTA	-0,1446	-0,1408	0,011	-0,4648		
Valor p	0,567	0,5774	0,9653	0,052		
Cu AEDT	0,0652	0,033	-0,2011	-0,3331	0,2982	
Valor p	0,7971	0,8966	0,4235	0,1768	0,2293	
Cu CaCl₂	0,0178	-0,0362	-0,0744	-0,3735	0,4187	0,8743
Valor p	0,9441	0,8866	0,7691	0,1268	0,0837	0*
	GERMINACION	ALTURA	BIOMASA FRESCA	BIOMASA SECA	Cu PLANTA	Cu AEDT

Número de casos = 18.

Asterisco indica correlación significativa a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Tabla 4.16. Matriz de correlación entre las variables altura de planta, producción de biomasa, contenido de Cu en planta y niveles disponibles en suelo para la cebada en suelo de Constantina.

ALTURA	0,5809					
Valor p	0,0115*					
BIOMASA FRESCA	0,6061	0,6008				
Valor p	0,0077*	0,0084*				
BIOMASA SECA	0,6757	0,6601	0,9772			
Valor p	0,0021*	0,0029*	0*			
Cu PLANTA	-0,4287	-0,4821	-0,8787	-0,8627		
Valor p	0,0759	0,0428*	0*	0*		
Cu AEDT	-0,5866	-0,6184	-0,9609	-0,9152	0,7965	
Valor p	0,0105*	0,0062*	0*	0*	0,0001*	
Cu CaCl₂	-0,6388	-0,7423	-0,8372	-0,8174	0,5885	0,9148
Valor p	0,0043*	0,0004*	0*	0*	0,0102*	0*
	GERMINACION	ALTURA	BIOMASA FRESCA	BIOMASA SECA	Cu PLANTA	Cu AEDT

Número de casos = 18.

Asterisco indica correlación significativa a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Tabla 4.17. Matriz de correlación entre las variables producción de biomasa, contenido de Cu en planta y niveles disponibles en suelo para la mostaza parda en suelo de Coria del Río.

BIOMASA SECA	0,6914			
Valor p	0,0015*			
Cu PLANTA	-0,187	-0,4399		
Valor p	0,4574	0,0677		
Cu AEDT	-0,5386	-0,3426	0,6167	
Valor p	0,0211*	0,164	0,0064*	
Cu CaCl₂	-0,0254	-0,155	0,3823	0,1786
Valor p	0,9204	0,5391	0,1174	0,4782
	BIOMASA FRESCA	BIOMASA SECA	Cu PLANTA	Cu AEDT

Número de casos = 18.

Asterisco indica correlación significativa a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Tabla 4.18. Matriz de correlación entre la variables producción de biomasa, contenido de Cu en planta y niveles disponibles en suelo para la mostaza parda en suelo de Constantina.

BIOMASA SECA	0,6124			
Valor p	0,0069*			
Cu PLANTA	-0,8329	-0,0596		
Valor p	0,0008*	0,8539		
Cu AEDT	-0,8644	-0,7721	0,9053	
Valor p	0*	0,0002*	0,0001*	
Cu CaCl₂	-0,7604	-0,7305	0,8544	0,8899
Valor p	0,0002*	0,0006*	0,0004*	0*
	BIOMASA FRESCA	BIOMASA SECA	Cu PLANTA	Cu AEDT

Número de casos = 18.

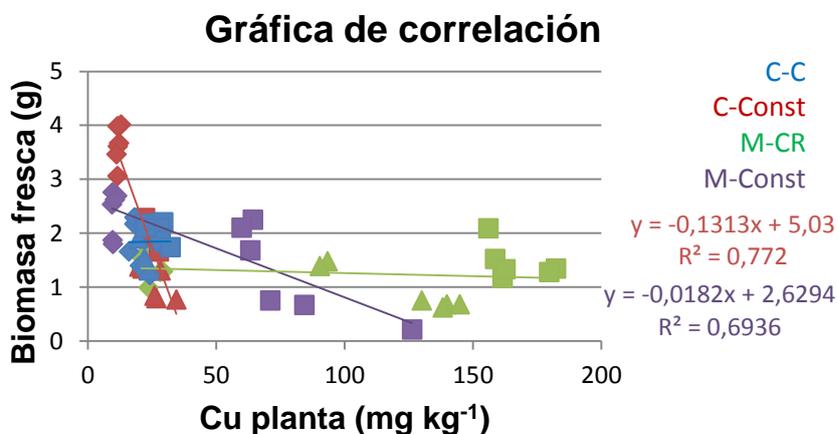
Número de casos para Cu en planta = 12.

Asterisco indica correlación significativa a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Se utilizó un análisis de regresión para investigar la influencia de los factores y tratamientos de Cu en la biomasa vegetal y las concentraciones de metales en los tejidos. Se han representado gráficamente las variables para estimar posibles relaciones no lineales entre variables.

La figura 4.15 muestra la relación inversa entre biomasa y concentración de Cu en planta. La pendiente de la ecuación de la recta es negativa en ambos casos, pero es más pronunciada en las plantas de cebada, lo que se traduce en que la cebada presenta drásticas reducciones de biomasa ante pequeñas acumulaciones de Cu en la parte aérea, sin embargo, la planta de mostaza puede acumular en su parte aérea hasta tres veces más Cu que la cebada sufriendo una reducción de la producción de biomasa del mismo orden.

Figura 4.15. Curva dosis-respuesta del Cu en planta frente a la biomasa fresca de las plantas en los distintos suelos.



Símbolos en forma de rombo pertenecen al nivel de tratamiento de Cu 0 mg kg⁻¹.

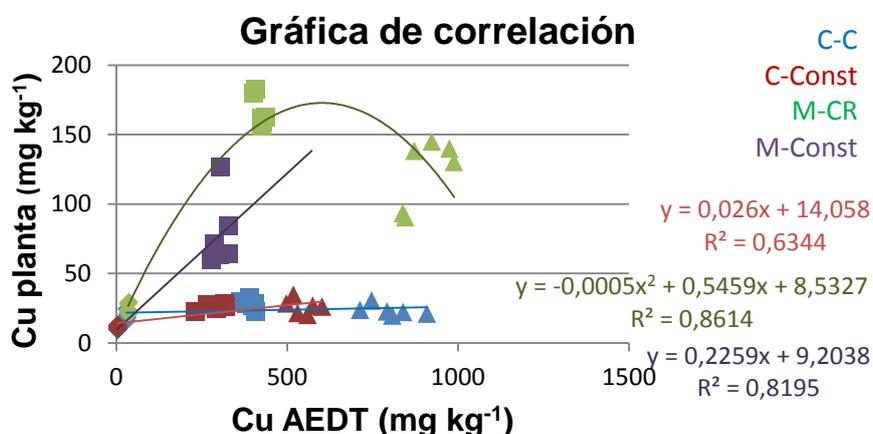
Símbolos en forma de cuadrado pertenecen al nivel de tratamiento de Cu 500 mg kg⁻¹.

Símbolos en forma de triángulo pertenecen al nivel de tratamiento de Cu 1000 mg kg⁻¹.

La planta de mostaza es la que más Cu acumula en la parte aérea, tanto en el suelo de Coria del Río como el de Constantina, especialmente a la dosis intermedia (500 mg de Cu/kg de suelo). Posiblemente debido al menor contenido de materia orgánica, el Cu está más biodisponible en el suelo de Coria.

La figura 4.16 muestra la relación inversa entre Cu extraído por la planta y el Cu disponible en el suelo extraído mediante extracción con AEDT. Las plantas de mostaza extrae más cantidad de Cu en la parte aérea que las de cebada. Se observa que las plantas de mostaza en suelo de Coria del Río no tienen una relación lineal.

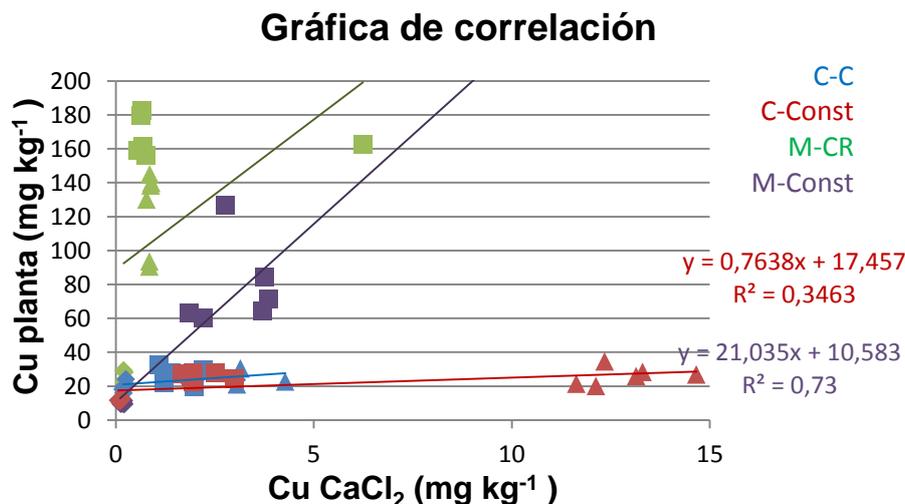
Figura 4.16. Curva dosis-respuesta del Cu extraído mediante AEDT frente al Cu extraído por la parte aérea de las plantas en los distintos suelos.



Símbolos en forma de rombo pertenecen al nivel de tratamiento de Cu 0 mg kg⁻¹.
 Símbolos en forma de cuadrado pertenecen al nivel de tratamiento de Cu 500 mg kg⁻¹.
 Símbolos en forma de triángulo pertenecen al nivel de tratamiento de Cu de 1000 mg kg⁻¹

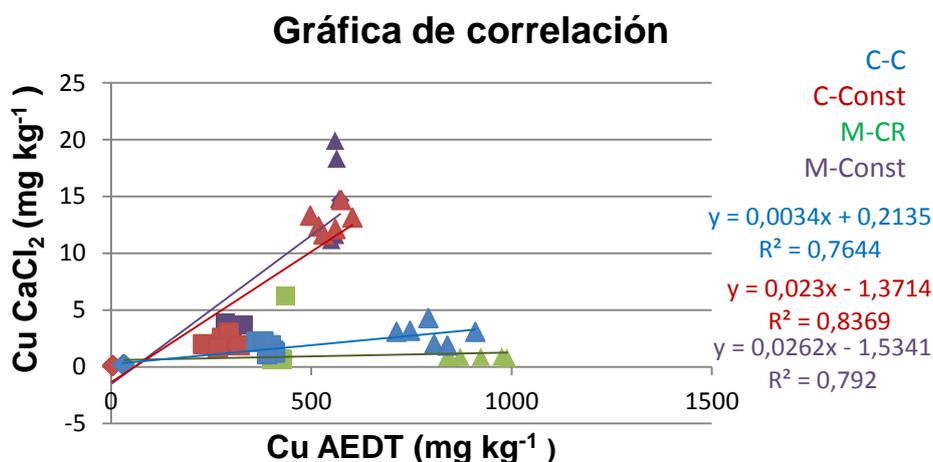
En la figura 4.17 se muestra la relación de Cu disponible extraído mediante CaCl₂ frente al Cu extraído por las plantas. Las plantas de mostaza crecidas tanto en suelo de Coria del Río como de Constantina muestran una relación estadísticamente significativa entre ambos parámetros. Las plantas de mostaza fueron las que más Cu extrajeron en comparación con las plantas de cebada.

Figura 4.17. Curva dosis-respuesta del Cu extraído mediante CaCl_2 frente al Cu extraído por la parte aérea de las plantas en los distintos suelos.



Símbolos en forma de rombo pertenecen al nivel de tratamiento de Cu 0 mg kg^{-1} .
 Símbolos en forma de cuadrado pertenecen al nivel de tratamiento de Cu 500 mg kg^{-1} .
 Símbolos en forma de triángulo pertenecen al nivel de tratamiento de Cu de 1000 mg kg^{-1} .

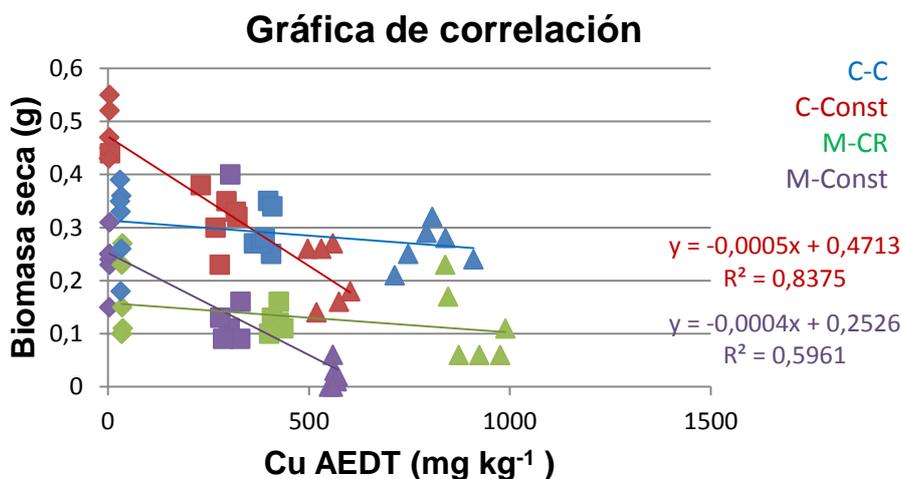
Figura 4.18. Curva dosis-respuesta del Cu extraído mediante AEDT frente al Cu extraído mediante CaCl_2 en los distintos suelos..



Símbolos en forma de rombo pertenecen al nivel de tratamiento de Cu 0 mg kg^{-1} .
 Símbolos en forma de cuadrado pertenecen al nivel de tratamiento de Cu 500 mg kg^{-1} .
 Símbolos en forma de triángulo pertenecen al nivel de tratamiento de Cu de 1000 mg kg^{-1} .

En la figura 4.19. se muestra la relación entre biomasa seca frente al Cu extraído mediante AEDT. Las plantas sembradas en suelo de Constantina se obtiene una relación estadísticamente significativa, donde el Cu está menos biodisponible para la planta que en suelo de Coria del Río, debido a la alta afinidad que tiene los iones de Cu para formar complejos con la materia orgánica.

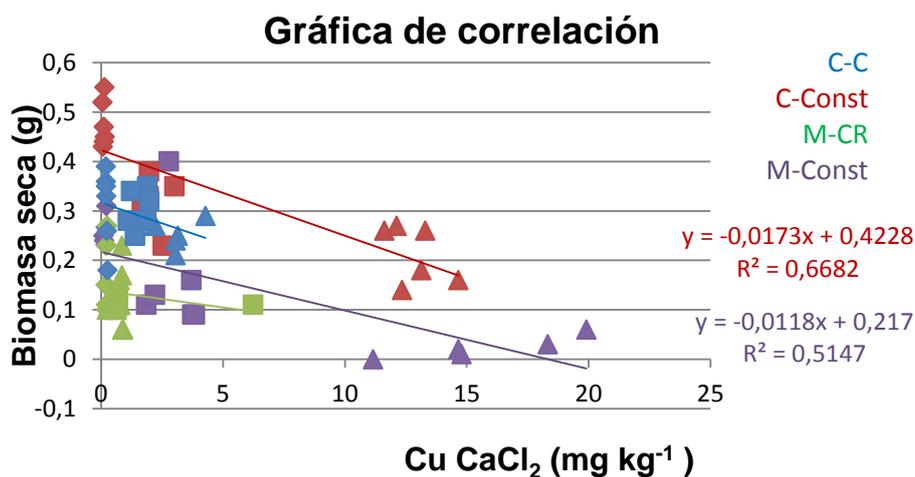
Figura 4.19. Curva dosis-respuesta del Cu extraído mediante AEDT frente a la biomasa seca de las plantas en los distintos suelos.



Símbolos en forma de rombo pertenecen al nivel de tratamiento de Cu 0 mg kg⁻¹.
 Símbolos en forma de cuadrado pertenecen al nivel de tratamiento de Cu 500 mg kg⁻¹.
 Símbolos en forma de triángulo pertenecen al nivel de tratamiento de Cu de 1000 mg kg⁻¹.

En la figura 4.20 se muestra la relación entre la biomasa seca frente al Cu extraído mediante CaCl₂. En los suelos de Constantina la cebada y la mostaza presentan una relación significativa del Cu extraído con CaCl₂ frente a la biomasa seca en comparación con el suelo de Coria del Río. La mostaza en suelo de Constantina presente una relación no lineal. La dosis alta de Cu (1000 mg Cu kg⁻¹ suelo) afectó a las plantas obteniéndose una menor biomasa.

Figura 4.20. Curva dosis-respuesta del Cu extraído mediante CaCl₂ frente a la biomasa seca de las plantas en los distintos suelos.



Símbolos en forma de rombo pertenecen al nivel de tratamiento de Cu 0 mg kg⁻¹.
 Símbolos en forma de cuadrado pertenecen al nivel de tratamiento de Cu 500 mg kg⁻¹.
 Símbolos en forma de triángulo pertenecen al nivel de tratamiento de Cu de 1000 mg kg⁻¹.

5. CONCLUSIONES

- ✓ Salvo en casos de elevada contaminación y toxicidad, la biomasa aérea seca producida por el cultivo de cebada fue el doble que la producida por el de mostaza.
- ✓ La contaminación con Cu en los suelos tuvo efectos significativos en la producción de biomasa. La dosis de contaminación con 2000 mg Cu kg⁻¹, provocó una reducción del crecimiento de las plantas de cebada y mostaza parda, que imposibilita el uso las mismas en ensayos de fitoextracción de Cu con esta concentración de contaminante. La mostaza parda en el suelo de Constantina con la dosis de 1000 mg Cu kg⁻¹ tampoco presentó biomasa suficiente para ser analizada.
- ✓ En ensayos tipo batch la adición de disoluciones de ramnolípido JBR-425 al suelo contaminado con 1000 mg Cu kg⁻¹ aumentó la extractabilidad de Cu del suelo, siendo la concentración de 10.000 mg kg⁻¹ suelo la más efectiva. El ramnolípido extrajo mayores cantidades de cobre en el suelo de Constantina que en el de Coria del Río.
- ✓ Sin embargo, el crecimiento de las plantas fitoextractoras disminuyó a partir de una concentración de ramnolípido de 1000 mg kg⁻¹ de suelo por lo que concentraciones superiores a esta no son adecuadas para un ensayo de fitoextracción.
- ✓ La presencia de Cu en el suelo también provocó un incremento en el Cu absorbido por las plantas, mientras que la presencia del ramnolípido no produjo efectos significativos en la absorción de Cu.
- ✓ Las plantas de mostaza parda acumularon mayor concentración de Cu por peso de biomasa que las de cebada en los suelos contaminados, principalmente en el suelo de Coria de Río. Ambas especies disminuyeron su capacidad de fitoextracción de Cu a dosis por encima de 500 mg kg⁻¹.
- ✓ El rendimiento global de la técnica de fitoextracción aplicada fue excesivamente bajo, por lo que esta técnica no puede ser considerada válida para la recuperación de suelos contaminados con estos niveles de Cu.
- ✓ La disponibilidad de cobre en suelo al final del ensayo determinada con AEDT presentó una correlación significativa con la cantidad de cobre extraída por las plantas. En general ni el tipo de planta utilizado ni la presencia de ramnolípidos afectó a la disponibilidad de Cu en el suelo, ya sea medida por AEDT o por CaCl₂. Sin embargo, el tipo de suelo sí influyó en la disponibilidad medida por ambos métodos, observándose que en el

suelo de Constantina el metal se adsorbía más fuertemente que en el suelo de Coria.

6. BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

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

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.

Brümmer, G.W., (1986). Heavy metal species, mobility and availability in soils. En: Bernhard, M., Brickman, F.E., Sadler, P.J. (eds.), The importance of Chemical Speciation in Environmental Processes. Springer-Verlag, Berlin.

Calevro, F., Campani, S., Filippi, C., Batistoni, R., Deri, P., Bucci, S., Raggianti, M., Mancino, G. (1999). Bioassays for testing effects of Al, Cr and Cd using development in the amphibian *Pleurodeles waltl* and regeneration in the planarian *Dugesia etrusca*. *Aquatic Ecosystem Health and Management.* 2 (3): 281-288.

Celik, G.Y., Aslim, B., Beyatli, Y. (2008). Enhanced crude oil biodegradation and rhamnolipid production by *Pseudomonas stutzeri* strain G11 in the presence of Tween-80 and Triton X-100. *J. Environ. Biol.* 29(6), 867-870.

Chaignon, V., Sanchez-Neira, I., Herrmann, P., Jaillard, B., Hinsinger, P., (2003). Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environ. Pollut.* 123, 229-238.

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.

Chen, H., Cutright, T. (2001). EDTA and HEDTA effects on Cd, Cr, and Ni uptake by *Helianthus annuus*. *Chemosphere.* 45:21–28.

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

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

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

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

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

Del Castilho, P., Chardon, W.J. and Salomons, W. (1993). Influence of cattle-manure slurry application on the solubility of cadmium, copper, and zinc in a manured acidic, loamy-sand soil. *Environ. Qual.* 22: 689-697.

Desai, J., Banat, I. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61(1): 47–64.

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

Dudka, S. & Adriano, D.C., (1997). Environmental Impacts of Metal Ore Mining and Processing: A Review. *J. Environ. Qual.* 26: 590-602.

Ebbs, S.D., Kochian, L.V.(1998). Phytoextraction of zinc by oat (*Avena sativa*) barley (*Hordeum vulgare*) and Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environ. Sci. and Techn.* 32: 802-806.

Feng, M., Shan, X., Zhang, S. and Wen, B., (2005). A comparison of the rhizospherebased method with DTPA, EDTA, CaCl₂, and NaNO₃ extraction

methods for prediction of bioavailability of metals in soil to barley. *Environ. Pollut.* 137, 231-240.

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.

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

Gérard, E., Echevarria, G., Morel, C., Sterckeman, T., Morel, J. (2001). Isotopic Exchange Kinetics Method for Assessing Cadmium Availability in Soils. En: Trace elements in soil. Bioavailability, Flux and Transfer. Eds. Iskandar, I.K. y Kirkham, M. B. CRC Press.

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.

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

Houba, V. J. G., Lexmond, Th. M., Novozamsky, I., Van der Lee, J. J., (1996). State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *Sci. Tot. Env.* 178, 21–28.

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

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

Johnson, A., Gunawardana, B., Singhal, N. (2009). Amendments for enhancing copper uptake by *Brassica juncea* and *Lolium perenne* from solution. *Int. J. Phytorem.* 11:215–234.

Jordan, F.L., Robin-Abbott, M., Maier, R.M., Glenn, E.P. (2002). A comparison of chelator-facilitated metal uptake by a halophyte and a glycophyte. *Environ Toxicol Chem.* 21:2698–2704.

Juhasz, A. L., Smith, E., J., Naidu, R. (2003a). Estimation of Human Availability of Arsenic in Contaminated Soils. Proceedings of the Fifth National Workshop on the Assessment of site Contamination. Environment Protection & Heritage Council.

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.

Juwarkar, A.A., Dubey, K.V., Nair, A., Singh, S.K., (2008). Bioremediation of multi-metal contaminated soil using biosurfactant – a novel approach. *Indian J. Microbiol.* 48, 142-146.

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

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

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

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

Kelley, M. E., Braunung, S. E., Schoof, R. A., Ruby, 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.

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

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

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.

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.

Mattina, M.I., Lannucci-Berger, W., Musante, C., White, J.C., (2003). Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. *Environ. Pollut.*, 124: 375–378.

McBride, M.B., (2004). Molybdenum, sulfur, and other trace elements in farm soils and forages after sewage sludge application. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 35: 517–35.

McGrath, S.P., Zhao, F. J., Lombi, E., (2002). Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Adv. Agron.* 75: 1-56.

McGrath, S.P. & Zhao, F.J., (2003). Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotech.* 14: 277–282.

Meers, E., du Laing, G., Unamuno, V., Ruttens, A., Vangronsveld, J., Tack, F.M.G., Verloo, M.G., (2007). Comparison of cadmium extractability from soils by commonly used single extraction protocols. *Geoderma* 141, 247-259.

Menzies, N.W., Donn, M.J., Kopittke, P.M., (2007). Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environ. Pollut.* 145, 121-130.

Mounaji, D., Vlassi, M., Erraiss, N., Vegnez, M., Serrano, A., Soukri, A. (2003). In vitro effect of metal ion on the activity of two amphibian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases: potential metal binding sites. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochem. Molec. Biol.* 135 (2): 241-254.

Mulligan, C.N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133:183–198.

Mulligan, C.N. (2007). Rhamnolipid Biosurfactants: Solubility and Environmental Issues. In: Letcher TM, editor. Thermodynamics, Solubility and Environmental Issues, Elsevier B.V. p. 279–298.

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

Nanda, P.B.A., Dushenkov V., Motto, H., Raskin I. (1995). Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environ. Sci. Tech.* 29: 1232–1238.

National Research Council, 2003. Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments: Process, Tools and Applications. The National Academies Press, Washington, DC <http://fermat.nap.edu/books/0309086256/html>.

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.

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.

Pueyo, M., López-Sánchez, J. F., Rauret, G., (2004). Assessment of bioaccumulation in extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soils. *Anal. Chem.* 504, 217–226.

Rahman, K., Gakpe, E. (2008). Production, characterization and applications of biosurfactants – Review. *Biotechnol.* 7(2):360-370.

Rosenberg, E., Ron, E. (1999). High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:154-162.

Salt, D.E, Smith, R.D., Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 643-68.

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.

Singh, A., Van Hamme, J., Ward, O. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol. Adv.* 25: 99– 121

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.

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.

Van-Camp, L., Bujarrabal, B., Gentile, A-R., Jones, R.J.A., Montanarella, L., Olazabal, C., Selvaradjou, SK., (2004). Reports of the Technical Working Groups Established under the Thematic Strategy for Soil Protection. EUR 21319 EN/4, 872 pp. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

Verloo, M. & Willaert, G. (1990). Direct and indirect effects of fertilisation practices on heavy metals in plants and soils. En: Merckx, R., Vereecken, H., Vlassak, K. (eds.), Fertilisation and the environment. Leuven University, Press Belgium pp 79-87.

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

Wattanaphon, H., Kerdsin, A., Thammacharoen, C., Sangvanich, P., Vangna,i A. (2008). A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization. *J. App. Microbiol.* 105:416-426.

Wen, J., McLaughlin, M.J., Stacey, S.P., Kirby, J.K., (2010). Is rhamnolipid biosurfactant useful in cadmium phytoextraction. *J. Soils Sed.* 10, 1289-1299.

Wen, J., Stacey, S.P., McLaughlin, M.J., Kirby, J.K., (2009). Biodegradation of rhamnolipid, EDTA and citric acid in cadmium and zinc contaminated soils. *Soil Biol. & Biochem.* 41, 2214-2221.

Welch, R.M. (1995). Micronutrient nutrition of plants. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 14: 49-82.

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.