

Tesis Doctoral

# Retención, biodisponibilidad y remediación de Pb en suelos: efectos de la interacción suelo-planta (*Brassica napus*) y bioacumulación

Ferreyroa, Gisele Verónica

2016-02-19

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Ferreyroa, Gisele Verónica. (2016-02-19). Retención, biodisponibilidad y remediación de Pb en suelos: efectos de la interacción suelo-planta (*Brassica napus*) y bioacumulación. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Ferreyroa, Gisele Verónica. "Retención, biodisponibilidad y remediación de Pb en suelos: efectos de la interacción suelo-planta (*Brassica napus*) y bioacumulación". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-02-19.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**Universidad de Buenos Aires**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

**Retención, biodisponibilidad y remediación de  
Pb en suelos: efectos de la interacción suelo-  
planta (*Brassica napus*) y bioacumulación**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos  
Aires en el área Ciencias Biológicas

**Gisele Veronica Ferreyroa**

Directores de tesis: Dr. Fernando Molina e Ing. Raúl Lavado

Consejero de Estudios: Prof. David Bilenca

Lugar de Trabajo: Departamento de Química Inorgánica,  
Analítica y Química Física - INQUIMAE

Ciudad autónoma de Buenos Aires, 2015

Fecha de defensa: 19 de febrero de 2016

# Índice

Resumen.....	i
Abstract.....	iii
Agradecimientos.....	v

## PARTE I. INTRODUCCIÓN GENERAL

### CAPÍTULO 1. Introducción General: Suelos, Metales y Fitorremediación

1.1. Relevancia del tema de estudio.....	3
1.2. Suelo, metales y su interacción.....	5
1.3. Fitoabsorción: una posible herramienta de remediación para suelos contaminados con Pb.....	7
1.4. Efecto de la rizosfera sobre la biodisponibilidad.....	10
1.5. Empleo de cultivos agrícolas en remediación. Características de <i>Brassica napus</i> .....	10
1.6. Objetivo general.....	12
1.7. Bibliografía.....	13

## PARTE II. ENSAYOS PRELIMINARES DE ESPECIACIÓN DEL Pb

### CAPÍTULO 2. Ensayos preliminares

2.1. Introducción.....	19
2.2. Objetivos.....	20
2.3. Hipótesis.....	20
2.4. Caracterización del suelo.....	21
2.4.1. Materiales y métodos.....	21
2.4.2. Resultados y discusión.....	24
2.5. Elección del Método de Extracción Secuencial Selectiva.....	34
2.5.1. Materiales y Métodos.....	34
2.5.2. Resultados y Discusión.....	40
2.6. Conclusiones.....	46
2.7. Bibliografía.....	48

### CAPÍTULO 3. Interacción de Pb con los componentes del suelo

3.1. Introducción.....	52
------------------------	----

3.2. Objetivos.....	53
3.3. Hipótesis.....	54
3.4. Materiales y Métodos.....	54
3.5. Resultados y discusión.....	57
3.6. Conclusiones.....	64
3.7. Bibliografía.....	66

**Parte III. ESPECIACIÓN DE Pb EN CULTIVO DE *BRASSICA NAPUS* Y SU EFECTO SOBRE LA PLANTA**

**CAPÍTULO 4. Especiación de Pb en suelo rizosférico y no rizosférico en cultivo de *Brassica napus***

4.1. Introducción.....	71
4.2. Objetivos.....	74
4.3. Hipótesis.....	74
4.4. Materiales y Métodos.....	74
4.5. Resultados y discusión.....	82
4.6. Conclusiones.....	90
4.7. Bibliografía.....	92

**CAPÍTULO 5. Bioabsorción de Pb por *Brassica napus***

5.1. Introducción.....	95
5.2. Objetivos.....	96
5.3. Hipótesis.....	96
5.4. Materiales y Métodos.....	96
5.5. Resultados y discusión.....	101
5.6. Conclusiones.....	113
5.7. Bibliografía.....	115

**CAPÍTULO 6. Efectos del Pb sobre órganos fotosintéticos de *Brassica napus***

6.1. Introducción.....	118
6.2. Objetivos.....	122
6.3. Hipótesis.....	122

<b>6.4. Materiales y Métodos.....</b>	<b>123</b>
<b>6.5. Resultados y discusión.....</b>	<b>127</b>
<b>6.6. Conclusiones.....</b>	<b>139</b>
<b>6.7. Bibliografía.....</b>	<b>141</b>
<b>CAPÍTULO 7. Conclusiones generales y perspectivas</b>	
<b>7.1. Conclusiones.....</b>	<b>144</b>
<b>7.2. Perspectivas.....</b>	<b>148</b>
<b>7.3. Bibliografía.....</b>	<b>149</b>

A los pueblos que luchan  
por cuidar nuestra tierra.

*"No acepten lo habitual como cosa natural, pues en tiempos de desorden sangriento, de confusión organizada, de arbitrariedad consciente, de humanidad deshumanizada, nada debe parecer natural, nada debe parecer imposible de cambiar." Bertolt Brecht*

# **Retención, biodisponibilidad y remediación de Pb en suelos: efectos de la interacción suelo-planta (*Brassica napus*) y bioacumulación**

## **Resumen**

La contaminación en suelos por metales pesados, en particular por plomo, es una problemática ambiental de gran importancia; la movilidad y biodisponibilidad de dicho contaminante es fuertemente dependiente de los componentes bióticos y abióticos del suelo. Debido a la importancia toxicológica que la contaminación de Pb reviste en nuestro país, en esta tesis se propone analizar la interacción de este metal con los componentes del suelo y su posible remediación con plantas. Por lo tanto, los objetivos generales del presente trabajo son la determinación de la especiación del metal y su interacción con los componentes del suelo, y el estudio sobre la capacidad de acumulación del metal por parte de una planta de cultivo (*Brassica napus*, colza), analizando el efecto de dicha planta sobre la especiación del metal.

En el estudio sobre la especiación química del metal en el suelo y su evolución temporal, se observó que el Pb se asocia rápidamente con las fracciones minerales, quedando una muy baja fracción en forma soluble e intercambiable al cabo de 60 días, que es en principio la fracción biodisponible.

Luego, mediante el cultivo de *Brassica napus* en suelos con agregado de Pb reciente y otro con contaminación consolidada por Pb, se analizó la interacción e influencia de la rizosfera en la especiación del metal. El efecto resultó en una mayor concentración de Pb en la zona rizosférica del suelo con contaminación reciente, particularmente en la fracción mineral, y en la permanencia de fracciones intercambiables de Pb en la etapa de fructificación de la planta. En la madurez fisiológica de *B. napus*, no se detectó contenido de Pb en la fracción intercambiable.

*Brassica napus* resultó una especie acumuladora de Pb en suelos con contaminación reciente. Se cuantificó su concentración en hojas, resultando mayor en hojas jóvenes, y en granos. Se observaron efectos negativos en la ultraestructura celular (particularmente en cloroplastos), y en el contenido de

foto pigmentos, los cuales se cuantificaron exitosamente mediante métodos no invasivos. Aun así, no se observó un efecto negativo en su desarrollo fenológico. En suelos con contaminación consolidada, no se detectó contenido del metal en los órganos estudiados de *B. napus*.

Se concluye entonces que la presencia de Pb recientemente incorporado al suelo resulta en la acumulación del metal por *Brassica napus*, mientras que si el metal ha permanecido en el suelo previamente al sembrado, éste no se encuentra disponible para la planta debido a que evoluciona hacia formas químicas más estables, no biodisponibles.

**Palabras clave:** especiación, metales traza, rizosfera, bioacumulación, *Brassica napus*.

## **Retention, bioavailability and remediation of Pb in soils: effects of soil-plant interaction (*Brassica napus*) and bioaccumulation**

### **Abstract**

Soil contamination by heavy metals, in particular lead, is an environmental issue of great importance; the mobility and bioavailability of this pollutant are strongly dependent on the biotic and abiotic components of soil. Because of the toxicological significance of lead pollution in our country, in this thesis it is proposed to analyze the interaction of the metal with soil components and possible ways for phytoremediation. Therefore, the general objectives of this study are to determine the speciation of the metal and its interaction with soil components, and the study of metal storage capacity by a crop plant (*Brassica napus*, rapeseed) analyzing the effect of the plant on the speciation of the metal.

In the study on the chemical speciation of Pb in soil, and its time evolution, it was observed that Pb is rapidly associated with mineral fractions; the soluble and exchangeable fraction, which is considered bioavailable, has a very low level after 60 days.

The interaction and influence of the rhizosphere on the metal speciation was analyzed. This was accomplished, by growing *Brassica napus* in polluted soils, both with recent addition of Pb and with consolidated Pb pollution. A higher concentration of Pb in rhizosphere zone in soil with recent pollution was determined, mainly in the mineral fraction; exchangeable Pb is still detectable in the fruiting stage of the plant. At physiological maturity of *B. napus*, Pb content is not detected in the exchangeable fraction.

*Brassica napus* proved to be a good Pb accumulator from soils with recent contamination. Metal concentration was quantified in leaves, being higher in young leaves, and grains. Negative effects were observed in cell ultrastructure (particularly in chloroplasts), and photo pigments content was successfully quantified by non-invasive methods. Still, no negative effect was

observed in phenological development. Lead content is not detected in the studied organs of *B. napus* for soils with consolidated contamination.

It is concluded that the presence of Pb recently incorporated into the soil results in the accumulation of the metal by *Brassica napus*; if the metal has remained in the soil prior to planting, it is not available for the plant because evolves into more stable and non-bioavailable chemical forms.

Keywords: speciation, trace metals, rhizosphere, bioaccumulation, *Brassica napus*.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a todos los que hicieron posible este trabajo. El camino de la tesis doctoral puede ser tortuoso, pero como suele suceder, son las personas que están alrededor nuestro las que lo hacen feliz.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores, Raúl y Fernando, que desde un principio apostaron en mí y en este proyecto. Por su trabajo constante, consejos, enseñanzas. Especialmente agradecer a Fernando por hacer fácil y alegre el día a día, por todo lo aprendido, por tener siempre palabras de aliento, brindarme tranquilidad, escuchar mis inquietudes, aceptar e incentivar mis actividades docentes y de militancia. Y a Raúl, por las palabras precisas, el pensamiento claro y práctico.

A mis compañeros y amigos del labo: Andre, Ser, Romi, Nico, Jona y Marian. Por el trabajo conjunto, por los mates, las risas, las discusiones, los enojos compartidos, las tristezas, los festejos y alegrías... por haber llegado a ser parte de mi vida. A Brian, Sole, Mati, por el tiempo compartido y la tolerancia a la “invasión de la tierra” dentro del labo.

A Ana, por haber colaborado en Agronomía, compartir sus conocimientos, por su buen humor y por haberme brindado su ayuda, siempre.

A los amigos y compañeros del E16: Mati Va., Rocío, Mati Vl., Flor, Pol, Alan, Néstor, Tami, Maira, Nati, Nico, Andre, Romi, Leo, Iair, Fede, y a Franco, Santi, Álvaro y Walter. Por los mates, las charlas, los consejos, los abrazos y por ser el sostén de todos los días.

A Gabriela Lagorio, Mabel Tudino, Jorge Stripeikis, Alcira Trinelli, Pablo Leal y Marcelo Romano, por la colaboración en este proyecto, sus consejos y enseñanzas.

A Alci y Rena, por su amistad, compañía, enseñanzas, por el trabajo y la lucha codo a codo. Gracias.

A los compañeros de los grupos de extensión, Taller de Aguas, Chaco-Exactas, Remediar la Tierra y al TLPS de FADU. Por pensar la ciencia desde las necesidades de nuestro pueblo, en producción y aprendizaje conjuntos. Cada uno de

los grupos es una parte de mí, y hacen que todo lo aprendido y el trabajo diario cobre sentido.

A mis viejos, Silvia y Rubén, que siempre me apoyaron, escucharon y alentaron con amor en esta hermosa carrera.

A mis amores, Dami, Clarita y Mora. Por la compañía, el amor, la paciencia y la paz que me dan día a día. A Dami por no dejarme bajar los brazos en cada proyecto que me propongo, y recordarme lo importante.

Por último quiero agradecer a cada uno de los estudiantes, docentes, becarios e investigadores, que luchan porque nuestra universidad sea de calidad, pública y gratuita. A todos los que enseñan, en cada acción, incansablemente. A los compañeros de la gremial docente y de Graduados al Frente, por trabajar y pelear por una universidad más justa y democrática.

Al Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, al INQUIMAE, a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA), a la Facultad de Agronomía (UBA) y al CONICET.

# **PARTE I.**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

# **1. INTRODUCCIÓN GENERAL:**

## **SUELOS, METALES Y FITORREMEDIACIÓN**

**1.1. Relevancia del tema de estudio**

La presencia en el medio ambiente de elementos potencialmente tóxicos, entre ellos los metales traza, ha sido estudiada ampliamente en todo el mundo. Estos metales tienen la particularidad de permanecer y/o acumularse en distintos componentes del ambiente, exponiendo la biota de un ecosistema a un posible efecto tóxico durante un largo período de tiempo. Algunos metales sólo son tóxicos en concentraciones altas (por ejemplo elementos esenciales como Cu y Zn), pero otros pueden serlo aún en concentraciones bajas (elementos no esenciales como Cd y Pb) (Wong, Li, y Thornton 2006). En la Tabla 1.1.1 se presentan las especies dominantes en suelos de distintos elementos traza, su contenido promedio en suelos y el efecto que pueden tener sobre la biota.

**Tabla 1.1.1:** Elementos traza presentes en el suelo. Se muestran las especies iónicas dominantes, su contenido promedio y el efecto sobre la salud en la biota.

Elemento	Especie dominante en suelos	Contenido promedio en suelos (ppm)	Efecto en la salud de la biota
Ag	Ag <sup>+</sup>	0.05	Tóxico para animales.
As	AsO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	6	Tóxico para plantas y animales.
Cd	Cd <sup>2+</sup>	0.35	Tóxico para animales.
Co	Co <sup>2+</sup>	8	Nutriente para plantas y animales.
Cr	Cr <sup>3+</sup> , CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	70	Nutriente para animales. Cr (VI) es carcinogénico.
Cu	Cu <sup>2+</sup>	30	Nutriente para plantas y animales; tóxico sobre determinados niveles.
Mo	MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.2	Nutriente para plantas y animales; tóxico sobre determinados niveles.
Pb	Pb <sup>2+</sup>	19	Tóxico para plantas y animales.
Zn	Zn <sup>2+</sup>	70	Nutriente para plantas y animales; tóxico sobre determinados niveles.

Sumner, Handbook of Soil Science, 2000.

En Argentina se ha estudiado la presencia y distribución de elementos potencialmente tóxicos, como As, Pb, Cd, Cr y Cu, entre otros (Lavado et al. 1998; Lavado 2006; Roca, Pazos, y Bech 2008; Rodriguez et al. 2014). En suelos de zonas agrícolas de la Región Pampeana Argentina, se han determinado concentraciones de metales traza similares a las halladas en suelos no contaminados de otros continentes (Zubillaga y Lavado 2002; Lavado et al. 2004). Sin embargo, en suelos de zonas urbanas y suburbanas pampeanas, se han hallado concentraciones que superan los valores establecidos por la Organización Mundial de la Salud (Lavado et al. 1998). En algunos humedales del norte de Santa Fe se hallaron concentraciones potencialmente tóxicas de Pb en suelos debido a la caza furtiva de patos (Romano et al. 2015).

El Pb puede ser encontrado en el ambiente debido a la extensa variedad de actividades antropogénicas, como minería y actividades industriales (Arrouays et al. 1996), pinturas y esmaltes (Needleman 2004), tuberías de Pb (Cartier et al. 2013), cacería con municiones de plomo (Ferreira, Romano, y Uhart 2009; Selonen et al. 2012), residuos de baterías de auto (Hamzeh, Aftabi, y Mirzaee 2011) y aditivos antiguos para combustibles que permanecen en el ambiente (Farmer et al. 1997; Lavado et al. 1998; Mielke, Laidlaw, y Gonzales 2011).

A partir del suelo, este contaminante, en general especies solubles de Pb(II), pueden ser absorbidos por las plantas, pudiendo alcanzar los granos y así ser transmitido a animales y humanos (Wierzbicka y Antosiewicz 1993; Lavado et al. 2007).

En los últimos años, se ha hecho foco en los efectos tóxicos del Pb sobre poblaciones expuestas durante largos períodos a bajas concentraciones del metal, siendo la más sensible la población de niños. Los niños son más sensibles a la exposición por plomo que los adultos por varias razones: i) su exposición se incrementa con su actividad de llevar todo lo que posee en la mano a la boca; ii) su intestino absorbe el Pb más fácilmente que el de un adulto; iii) el sistema nervioso central (SNC) en desarrollo es más vulnerable a los tóxicos que el SNC maduro (Needleman 2004). Los principales efectos de la intoxicación por Pb

son: desórdenes comportamentales, problemas de aprendizaje, problemas de atención y dificultades en el habla (Byers y Lord 1943). Muchas de las propiedades tóxicas del Pb se deben a su habilidad de competir con el Ca; a concentraciones picomolares, el Pb puede competir exitosamente con calcio por los sitios de unión de enzimas que intervienen en las señales neuronales, afectando su correcto funcionamiento (Markovac y Goldstein 1988). Además puede afectar el normal desarrollo del cerebro y de sus componentes celulares, desde el desarrollo fetal hasta los primeros años de crecimiento (Wilson et al. 2000).

Debido a la importancia toxicológica de la contaminación por Pb en suelo y su posible remediación con plantas, reviste gran relevancia la determinación de la especiación del metal, su interacción con los distintos componentes del suelo y la incidencia de plantas de cultivo capaces de absorber Pb sobre ese suelo.

### **1.2. Suelo, metales y su interacción**

El suelo es uno de los compartimentos esenciales del ambiente. En él se relacionan otros componentes abióticos como el agua y el aire, con componentes bióticos como bacterias, hongos, plantas y animales micro y macroscópicos. Debido a estas interrelaciones, el ecosistema terrestre posee una estructura tan compleja y heterogénea como la del propio suelo que lo sostiene.

De acuerdo a Molina (Molina 2013) los componentes sólidos del suelo pueden clasificarse en tres grandes clases: mineral, material orgánico y material biológico. La primera, incluye óxidos y arcillas minerales, así como otros materiales de baja cristalinidad; el material orgánico incluye principalmente ácidos húmicos, y en menor cantidad péptidos y sacáridos, ya que son degradados rápidamente; el material biológico comprende principalmente a las bacterias, y, de acuerdo a lo descrito por Gams (Gams 2007) puede incluir también una gran diversidad de hongos.

En este complejo sistema, la materia orgánica puede descomponerse (mediante intervención de hongos y bacterias) y los minerales que la componen meteorizarse. Así, los componentes inorgánicos se liberan, permaneciendo en suspensión en la solución del suelo, o adsorbidos a otros minerales o componentes orgánicos. Algunos de estos componentes, sean nutrientes o no, pueden ser absorbidos por las raíces de las plantas e incorporados en su biomasa. Por lo tanto, la movilidad y biodisponibilidad de cationes metálicos como el Pb(II), depende fuertemente de la interacción que posean con los distintos componentes del suelo. Particularmente, el Pb(II) puede adsorberse sobre minerales cristalinos, especialmente los que están en forma de arcillas, y formar complejos con la materia orgánica. Desde allí puede incorporarse a la fase sólida, quedando retenido en la red cristalina, o bien simplemente permanecer complejo, por ejemplo con sustancias húmicas, y llegar a ser transportado en solución o suspensión en caso de moverse la materia orgánica (Magrisso, Belkin, y Erel 2009; Orroño y Lavado 2009; Yang et al. 2010; Shahid et al. 2012).

Para determinar en cuáles de estas posibles fracciones del suelo se encuentra el catión Pb(II), es necesario, además de realizar una debida caracterización del suelo, analizar la interacción con estos componentes diferenciando cada una de las fracciones. Por esto, el método de Extracción Secuencial Selectiva (Kot y Namiesńik 2000) se convierte en una herramienta muy importante. Esta técnica se basa en la exposición de la muestra a sucesivos tratamientos químicos con soluciones acuosas, como se analizará en el siguiente capítulo. Las soluciones se utilizan para extraer las fracciones del metal unidas a distintos componentes del suelo. En cada paso el tratamiento se realiza con extractantes de poder creciente, lo que permite conocer las cantidades de Pb(II) en fracciones químicas definidas operacionalmente, desde el más débilmente adsorbido hasta el que se encuentra incorporado a la fracción mineral.

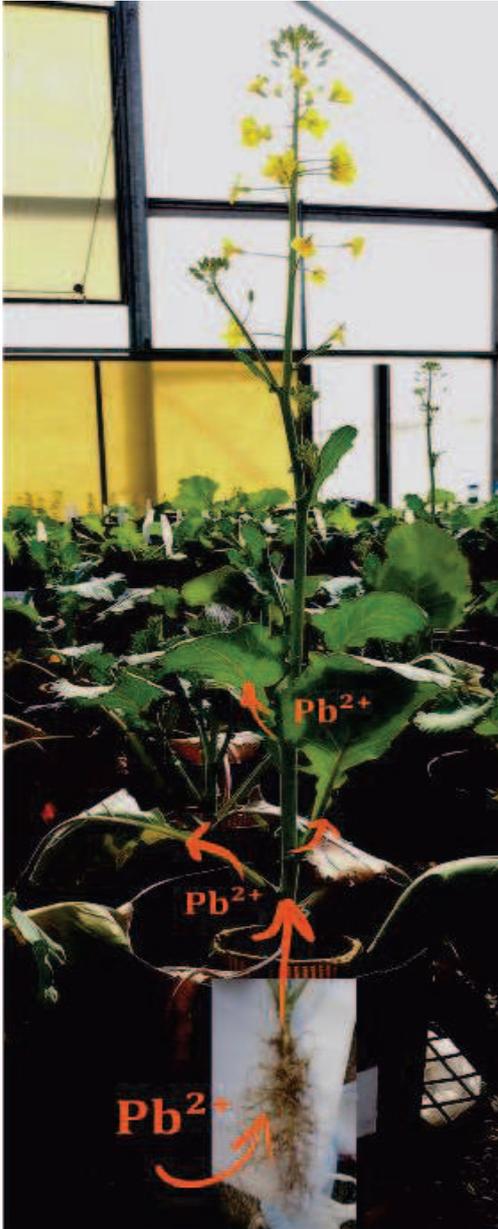
#### **1.3. Fitoabsorción: una posible herramienta de remediación para suelos contaminados con Pb**

La remediación o tratamiento de suelos mediante el uso de plantas, llamada fitoremediación, es una tecnología de alto impacto desarrollada en las últimas décadas, la cual se define como el uso de plantas para secuestrar, remover o inmovilizar un contaminante de un medio natural (Raskin y Ensley 1999). Es una tecnología efectiva, con muy bajo nivel de disturbio sobre el medio ambiente, económica y estéticamente agradable; además, es potencialmente perdurable en el tiempo y no requiere de personal especializado para su aplicación, siendo de muy fácil implementación y mantención. Sin embargo, pueden describirse algunas limitaciones como la profundidad de acción, el tiempo de implementación que requiere, la apropiada disposición de la biomasa colectada con el contaminante posteriormente a la remediación, su dependencia con el clima y el tipo de suelo de la zona de aplicación, la posible introducción y transferencia del contaminante a la cadena alimenticia; además debe tenerse precaución con el efecto de prácticas de cultivo y uso de enmiendas en la movilidad del contaminante (Alkorta et al. 2004).

De acuerdo a Alkorta y colaboradores (Alkorta et al. 2004) existen distintas categorías en el campo de la fitoremediación, como son la fitoextracción, fitoestabilización, fitofiltración, fitovolatilización, entre otras. De estas tecnologías, la fitoextracción es la más ampliamente estudiada y utilizada para la remoción de metales pesados y metaloides (Raskin y Ensley 1999; Garbisu y Alkorta 2001; McGrath, Zhao, y Lombi 2002; Alkorta et al. 2004). Además, puede implementarse junto a otras estrategias de remediación, como el uso de secuestrantes químicos o enmiendas orgánicas, la aplicación de potenciales eléctricos, el uso de plantas modificadas genéticamente (Gisbert et al. 2003; Gong, Lee, y Schroeder 2003), y el enriquecimiento del suelo con nutrientes y antioxidantes (Lavado et al. 1998; Torri y Lavado 2009; Bilal Shakoore et al. 2014).

El esquema general de fitoextracción, se resume en la Figura 1.3.1: el metal que se halla en el suelo en su forma biodisponible (posee movilidad) es

susceptible de ser absorbido por la raíz de la planta; desde allí el metal es translocado hacia el tallo y las hojas, pudiendo acumularse en ambos órganos; luego se debe cosechar la planta y el metal debe ser removido de la biomasa (McGrath et al. 2002; Alkorta et al. 2004).



**Figura 1.3.1:** Ilustración de la movilidad del  $Pb^{2+}$  desde el suelo hasta las hojas de una planta de colza (*B. napus*). El metal en su forma biodisponible es susceptible de ser absorbido por la raíz de la planta desde el suelo; luego puede translocarse al tallo y desde allí a las hojas. En todos estos órganos el ión metálico puede acumularse.

Idealmente, las plantas utilizadas en fitoextracción deberían contar con las siguientes características (Garbisu et al. 2002):

i. ser tolerantes a altos niveles del metal contaminante,

- ii. acumular concentraciones medianamente altas o altas del metal,
- iii. poseer una tasa rápida de crecimiento,
- iv. producir una biomasa medianamente alta o alta en condiciones naturales,
- v. poseer un sistema de raíces profuso.

Por lo tanto, la aplicación de esta tecnología debe realizarse por expertos con un amplio conocimiento en el área, con capacidad para diseñar los proyectos, escoger cuidadosamente la especie a utilizar para el metal a remediar (o la combinación de varios metales), considerar las características de la región a remediar, y manejar el sistema en su completitud, a fin de optimizar la extracción (Alkorta et al.2004).

Globalmente se han estudiado diversas plantas, entre ellas gramíneas forrajeras, ornamentales y también cultivos extensivos (Torri y Lavado 2009; Orroño, Schindler, y Lavado 2012; Padmavathiamma y Li 2010; Rodriguez et al. 2014) obteniendo diversos resultados en cuanto a absorción, acumulación, ubicación y efectos del contaminante. En cuanto a la tolerancia, algunas especies de plantas superiores han desarrollado estrategias que les permiten sobrevivir en suelos con altas concentraciones de metales pesados. Dahmani-Muller y colaboradores (Dahmani-Muller et al. 2000) han observado distintos niveles de acumulación de Pb, Cd y Zn en raíces y hojas, en tres especies de metalofitas; en algunos casos hallaron una mayor acumulación de los metales en las raíces, indicando una restricción al transporte hacia la biomasa aérea; en los casos en los que se encontró alta concentración de los metales en las hojas, también se observaron características de senescencia, evidenciando estrategias de detoxificación.

Para analizar la capacidad fitorremediadora de una determinada planta sobre un sistema y poder realizar comparaciones, deben tenerse en cuenta las características del suelo a remediar, ya que la biodisponibilidad del metal dependerá de la especiación que posea en el suelo (Orroño y Lavado 2009; Shahid et al. 2012). También, es necesario establecer relaciones entre los

niveles del metal que absorbe la planta y su concentración biodisponible en el suelo. Uno de los índices más utilizados en los últimos años es el FBC, Factor de Bioconcentración, el cual se define como la relación entre la concentración del metal en la planta respecto de la concentración del metal en el suelo (Salazar et al. 2012; Monferrán, Pignata, y Wunderlin 2012).

#### **1.4. Efecto de la rizosfera sobre la biodisponibilidad**

En suelos, tanto su estructura como las concentraciones de iones en solución, se encuentran en constante cambio, ya sea a mediano o largo plazo, debido a: acción de la rizosfera, intercambio de nutrientes, agregado de fertilizantes o pesticidas, salinización, etc. La rizosfera (definida como el medioambiente del suelo que rodea la raíz) presenta características diferentes a las que posee el suelo alejado de esta zona. Esto es el resultado de la acción de raíces y la colonización por microorganismos. Se ha encontrado que entre la rizosfera y el suelo no rizosférico, existen diferencias en los valores de pH, en las concentraciones de cationes y en las concentraciones de compuestos solubles orgánicos (Merckx et al. 1986; Hinsinger et al. 2003; Hinsinger et al. 2005). Todas estas variables inciden en la complejación, procesos de sorción y en la movilidad, haciéndolos más o menos disponibles para las plantas (Youssef y Chino 1989; Kim, Owens, y Kwon 2010; Orroño, Schindler, y Lavado 2012; Azimzadeh, Shirvani, y Shariatmadari 2014). Esto se estudiará especialmente en el Capítulo 4 de la presente tesis.

#### **1.5. Empleo de cultivos agrícolas en remediación. Características de *Brassica napus***

El estudio sobre remediación con plantas cultivadas reviste importancia debido al impacto que esto puede tener tanto en la economía agrícola como en la cadena alimenticia. Se han estudiado diversas especies, algunas en mayor profundidad que otras, dependiendo del tipo de cultivo practicado y el suelo de

una región determinada. En Argentina, los cultivos de soja (Rodríguez et al. 2011), arroz, trigo (Bermudez et al. 2011) y sorgo (Salazar y Pignata 2014) han sido estudiados para la bioabsorción de Pb, pero no se han hallado en bibliografía estudios sobre cultivos de *Brassica napus*.

*Brassica napus* (colza) es una oleaginosa invernal de ciclo anual, perteneciente a la familia de las crucíferas del género *Brassica*. Dentro del mismo género, hay otras especies de importancia económica como *B. campestris*L., *B. carinata*L., *B. juncea*L. y *B. nigra*. Su origen es europeo y asiático, siendo originalmente una maleza que a partir del mejoramiento genético se fue transformando, primero para la utilización de su aceite en la industria y luego para la alimentación animal y humana. Por ello, reviste importancia agrícola a nivel mundial y, en nuestra región, como cultivo utilizable en distintas rotaciones agrícolas, con capacidad de exportación. El producto comercial original era un aceite que contenía un elevado porcentaje de ácidos erúcicos y *pellets* conteniendo glucosinolatos, que resultan tóxicos para el hombre y animales. En la actualidad, las variedades cultivadas denominadas canola (de sus siglas en inglés: Canadian Oil Low Acid) no poseen ácidos erúcicos y glucosinolatos. El aceite de colza o canola registra el menor porcentaje de ácidos grasos saturados respecto de otros aceites como el oliva, de maíz o de girasol, todos con contenidos de ácidos grasos saturados por sobre el 10 % (Dirección de Mercados Agrícolas). Es el tercer aceite vegetal producido a nivel mundial: en el ciclo 2011/12 la producción mundial ascendió a 23.9 millones de toneladas, con un aumento del 1.45% con respecto al ciclo previo, siendo los principales productores la Unión Europea, China y Canadá, y el principal exportador Canadá (Dirección de Mercados Agrícolas). En nuestro país se cultivan otras plantas oleaginosas (soja, girasol, maní y otros), por lo que este cultivo es aún de importancia menor. No obstante, el cultivo de esta especie ha aumentado y se ha sostenido en los últimos años con muy buenos resultados (Tabla 1.5.1) de acuerdo al MinAgri (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca).

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### Suelos, metales y fitorremediación

**Tabla 1.5.1:** Volúmenes de siembra, cosecha, producción y valores de rendimiento para cultivos de soja, girasol y colza en las últimas cuatro campañas de cultivo. Fuente: Dirección de Información Agrícola y Forestal - Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.

Cultivo	Campaña	Sembrado (mill ha)	Cosechado (mill ha)	Producción (mill tn)	Rendimiento (tn ha <sup>-1</sup> )
Soja	2014/15	19,792	19,335	61,398	3,176
	2013/14	19,781	19,253	53,398	2,774
	2012/13	20,036	19,419	49,306	2,539
	2011/12	18,671	17,577	40,100	2,281
Girasol	2014/15	1,465	1,440	3,158	2,193
	2013/14	1,313	1,262	2,063	1,635
	2012/13	1,657	1,620	3,104	1,916
	2011/12	1,851	1,823	3,341	1,832
Colza	2014/15	0,056	0,055	0,105	1,920
	2013/14	0,072	0,070	0,112	1,615
	2012/13	0,093	0,088	0,128	1,466
	2011/12	0,030	0,029	0,051	1,718

### 1.6. Objetivo general

En base a lo planteado hasta aquí, este trabajo de Tesis se propone establecer la interacción y evolución del Pb con las distintas fracciones de un suelo pampeano, estudiando el efecto de los componentes del suelo y del clima sobre estas interacciones; analizar comparativamente el efecto de la rizosfera en la interacción del Pb con las distintas fracciones del suelo, mediante el cultivo de *Brassica napus*; estudiar su capacidad extractora y acumuladora, y analizar los posibles efectos del contaminante sobre este cultivo.

### 1.7. Bibliografía

- Alkorta, I., J. Hernández-Allica, J. M. Becerril, I. Amezaga, I. Albizu, y C. Garbisu. 2004. «Recent Findings on the Phytoremediation of Soils Contaminated with Environmentally Toxic Heavy Metals and Metalloids Such as Zinc, Cadmium, Lead, and Arsenic». *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 3 (1): 71-90. doi:10.1023/B:RESB.0000040059.70899.3d.
- Arrouays, D., M. Mench, A. Gomez, y V. Amans. 1996. «Short-range variability of fallout Pb in a contaminated soil». *Canadian Journal of Soil Science* 76 (1): 73-81. doi:10.4141/cjss96-011.
- Azimzadeh, Y., M. Shirvani, y H. Shariatmadari. 2014. «Green Manure and Overlapped Rhizosphere Effects on Pb Chemical Forms in Soil and Plant Uptake in Maize/Canola Intercrop Systems: A Rhizobox Study». *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 23 (6): 677-90. doi:10.1080/15320383.2014.861795.
- Bermudez, Gonzalo M.A., Raquel Jasan, Rita Plá, y María Luisa Pignata. 2011. «Heavy Metal and Trace Element Concentrations in Wheat Grains: Assessment of Potential Non-Carcinogenic Health Hazard through Their Consumption». *Journal of Hazardous Materials* 193 (octubre): 264-71. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.07.058.
- Bilal Shakoob, Muhammad, Shafaqat Ali, Amjad Hameed, Mujahid Farid, Sabir Hussain, Tahira Yasmeen, Ullah Najeeb, Saima Aslam Bharwana, y Ghulam Hasan Abbasi. 2014. «Citric Acid Improves Lead (pb) Phytoextraction in Brassica Napus L. by Mitigating Pb-Induced Morphological and Biochemical Damages». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 109 (noviembre): 38-47. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.07.033.
- Byers, R. K., y E. E. Lord. 1943. «Late effects of lead poisoning on mental development». *American Journal of Diseases of Children* 66 (5): 471-94. doi:10.1001/archpedi.1943.02010230003001.
- Cartier, Clément, Evelyne Doré, Laurent Laroche, Shokoufeh Nour, Marc Edwards, y Michèle Prévost. 2013. «Impact of treatment on Pb release from full and partially replaced harvested Lead Service Lines (LSLs)». *Water Research* 47 (2): 661-71. doi:10.1016/j.watres.2012.10.033.
- Dahmani-Muller, H, F van Oort, B Gélie, y M Balabane. 2000. «Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter». *Environmental Pollution* 109 (2): 231-38. doi:10.1016/S0269-7491(99)00262-6.
- Farmer, J. G., A. B. Mackenzie, C. L. Sugden, P. J. Edgar, y L. J. Eades. 1997. «A Comparison of the Historical Lead Pollution Records in Peat and Freshwater Lake Sediments from Central Scotland». *Water, Air, and Soil Pollution* 100 (3-4): 253-70. doi:10.1023/A:1018320425006.
- Ferreyra, Hebe, Marcelo Romano, y Marcela Uhart. 2009. «Recent and chronic exposure of wild ducks to lead in human-modified wetlands in Santa Fe Province, Argentina». *Journal of wildlife diseases* 45 (3): 823-27.
- Gams, Walter. 2007. «Biodiversity of Soil-Inhabiting Fungi». *Biodiversity and Conservation* 16 (1): 69-72. doi:10.1007/s10531-006-9121-y.
- Garbisu, Carlos, y Itziar Alkorta. 2001. «Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment». *Bioresource technology* 77 (3): 229-36.

- Garbisu, Carlos, J. H. Allica, Oihana Barrutia, Itziar Alkorta, y José M. Becerril. 2002. «Phytoremediation: a technology using green plants to remove contaminants from polluted areas». *Reviews on environmental health* 17 (3): 173-88.
- Gisbert, Carmina, Roc Ros, Antonio De Haro, David J Walker, M Pilar Bernal, Ramón Serrano, y Juan Navarro-Aviñó. 2003. «A Plant Genetically Modified That Accumulates Pb Is Especially Promising for Phytoremediation». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303 (2): 440-45.
- Gong, Ji-Ming, David A. Lee, y Julian I. Schroeder. 2003. «Long-Distance Root-to-Shoot Transport of Phytochelatins and Cadmium in Arabidopsis». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (17): 10118-23.
- Hamzeh, Mohammad Ali, Alijan Aftabi, y Mohammad Mirzaee. 2011. «Assessing Geochemical Influence of Traffic and Other Vehicle-Related Activities on Heavy Metal Contamination in Urban Soils of Kerman City, Using a GIS-Based Approach». *Environmental Geochemistry and Health* 33 (6): 577-94. doi:10.1007/s10653-010-9372-0.
- Hinsinger, Philippe, George R. Gobran, Peter J. Gregory, y Walter W. Wenzel. 2005. «Rhizosphere Geometry and Heterogeneity Arising from Root-Mediated Physical and Chemical Processes: Research Review». *New Phytologist* 168 (2): 293-303. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01512.x.
- Hinsinger, Philippe, Claude Plassard, Caixian Tang, y Benoît Jaillard. 2003. «Origins of Root-Mediated pH Changes in the Rhizosphere and Their Responses to Environmental Constraints: A Review». *Plant and Soil* 248 (1-2): 43-59.
- Kim, Kwon-Rae, Gary Owens, y Soon-ik Kwon. 2010. «Influence of Indian Mustard (Brassica Juncea) on Rhizosphere Soil Solution Chemistry in Long-Term Contaminated Soils: A Rhizobox Study». *Journal of Environmental Sciences* 22 (1): 98-105. doi:10.1016/S1001-0742(09)60080-2.
- Kot, Agata, y Jacek Namiesnik. 2000. «The role of speciation in analytical chemistry». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 19 (2): 69-79.
- Lavado, Raúl S. 2006. «Concentration of potentially toxic elements in field crops grown near and far from cities of the Pampas (Argentina)». *Journal of Environmental Management* 80 (2): 116-19. doi:10.1016/j.jenvman.2005.09.003.
- Lavado, Raúl S., Mónica Rodríguez, Roberto Alvarez, Miguel A. Taboada, y Marta S. Zubillaga. 2007. «Transfer of potentially toxic elements from biosolid-treated soils to maize and wheat crops». *Agriculture, Ecosystems & Environment* 118 (1-4): 312-18. doi:10.1016/j.agee.2006.06.001.
- Lavado, Raúl S., M. S. Rodríguez, J. D. Scheiner, M. A. Taboada, G. Rubio, R. Alvarez, M. Alconada, y M. S. Zubillaga. 1998. «Heavy metals in soils of Argentina: comparison between urban and agricultural soils». *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 29 (11-14): 1913-17.
- Lavado, Raúl S., M. S. Zubillaga, R. Alvarez, y M. A. Taboada. 2004. «Baseline Levels of Potentially Toxic Elements in Pampas Soils». *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 13 (5): 329-39. doi:10.1080/10588330490500383.
- Magrisso, Sagi, Shimshon Belkin, y Yigal Erel. 2009. «Lead Bioavailability in Soil and Soil Components». *Water, Air, and Soil Pollution* 202 (1-4): 315-23. doi:10.1007/s11270-009-9978-y.

- Markovac, Jasna, y Gary W. Goldstein. 1988. «Picomolar Concentrations of Lead Stimulate Brain Protein Kinase C». *Nature* 334 (6177): 71-73.
- McGrath, S. P., J. Zhao, y E. Lombi. 2002. «Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides». En , editado por BT - *Advances in Agronomy*, 75:1-56. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211302750025>.
- Merckx, Roel, J. H. Van Ginkel, J. Sinnaeve, y Adrien Cremers. 1986. «Plant-induced changes in the rhizosphere of maize and wheat». *Plant and Soil* 96 (1): 95-107.
- Mielke, Howard W., Mark A.S. Laidlaw, y Chris R. Gonzales. 2011. «Estimation of leaded (Pb) gasoline's continuing material and health impacts on 90 US urbanized areas». *Environment International* 37 (1): 248-57. doi:10.1016/j.envint.2010.08.006.
- Molina, Fernando V. 2013. *Soil Colloids: Properties and Ion Binding*. Surfactant Science Series 156. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Monferrán, Magdalena V., María L. Pignata, y Daniel A. Wunderlin. 2012. «Enhanced phytoextraction of chromium by the aquatic macrophyte *Potamogeton pusillus* in presence of copper». *Environmental Pollution, Mercury in the Laurentian Great Lakes Region*, 161 (febrero): 15-22. doi:10.1016/j.envpol.2011.09.032.
- Needleman, Herbert. 2004. «Lead Poisoning». *Annual Review of Medicine* 55 (1): 209-22. doi:10.1146/annurev.med.55.091902.103653.
- Orroño, Daniela I., y Raúl S. Lavado. 2009. «Distribution of extractable heavy metals in different soil fractions». *Chemical Speciation and Bioavailability* 21 (4): 193-98. doi:10.3184/095422909X12473204137916.
- Orroño, Daniela I., V. Schindler, y Raúl S. Lavado. 2012. «Heavy Metal Availability in *Pelargonium Hortorum* Rhizosphere: Interactions, Uptake and Plant Accumulation». *Journal of Plant Nutrition* 35 (9): 1374-86. doi:10.1080/01904167.2012.684129.
- Padmavathiamma, Prabha K., y Loretta Y. Li. 2010. «Phytoavailability and fractionation of lead and manganese in a contaminated soil after application of three amendments». *Bioresource Technology* 101 (14): 5667-76. doi:10.1016/j.biortech.2010.01.149.
- Raskin, Ilya, y Burt D. Ensley. 1999. *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*. 1.<sup>a</sup> ed. New York: Wiley-Interscience.
- Roca, Núria, Mabel Susana Pazos, y Jaume Bech. 2008. «The relationship between WRB soil units and heavy metals content in soils of Catamarca (Argentina)». *Journal of Geochemical Exploration* 96 (2-3): 77-85. doi:10.1016/j.gexplo.2007.04.004.
- Rodriguez, J.H., A. Klumpp, A. Fangmeier, y M.L. Pignata. 2011. «Effects of Elevated CO<sub>2</sub> Concentrations and Fly Ash Amended Soils on Trace Element Accumulation and Translocation among Roots, Stems and Seeds of *Glycine Max (L.) Merr.*». *Journal of Hazardous Materials* 187 (1-3): 58-66. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.11.068.
- Rodriguez, J.H., M.J. Salazar, L. Steffan, M.L. Pignata, J. Franzaring, A. Klumpp, y A. Fangmeier. 2014. «Assessment of Pb and Zn Contents in Agricultural Soils and Soybean Crops near to a Former Battery Recycling Plant in Córdoba, Argentina». *Journal of Geochemical Exploration* 145: 129-34. doi:10.1016/j.gexplo.2014.05.025.

- Romano, Marcelo, Hebe Ferreyra, Gisele V. Ferreyroa, Fernando V Molina, A. Caselli, Ignacio Barberis, Pablo Beldoménico, y Marcela Uhart. 2015. «Lead pollution from waterfowl hunting in wetlands and rice fields in Argentina». *Science of The Total Environment* Enviado.
- Salazar, María Julieta, y María Luisa Pignata. 2014. «Lead accumulation in plants grown in polluted soils. Screening of native species for phytoremediation». *Journal of Geochemical Exploration* 137 (febrero): 29-36. doi:10.1016/j.gexplo.2013.11.003.
- Salazar, María Julieta, Judith Hebelén Rodríguez, Gastón Leonardo Nieto, y María Luisa Pignata. 2012. «Effects of heavy metal concentrations (Cd, Zn and Pb) in agricultural soils near different emission sources on quality, accumulation and food safety in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]». *Journal of Hazardous Materials* 233-234 (septiembre): 244-53. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.07.026.
- Selonen, Salla, Mira Liiri, Rauni Strömmer, y Heikki Setälä. 2012. «The Fate of Lead at Abandoned and Active Shooting Ranges in a Boreal Pine Forest». *Environmental Toxicology and Chemistry* 31 (12): 2771-79. doi:10.1002/etc.1998.
- Shahid, Muhammad, Camille Dumat, Muhammad Aslam, y Eric Pinelli. 2012. «Assessment of lead speciation by organic ligands using speciation models». *Chemical Speciation and Bioavailability* 24 (4): 248-52. doi:10.3184/095422912X13495331697627.
- Torri, Silvana, y Raúl S. Lavado. 2009. «Plant absorption of trace elements in sludge amended soils and correlation with soil chemical speciation». *Journal of hazardous materials* 166 (2-3): 1459-65.
- Wierzbicka, M., y D. Antosiewicz. 1993. «How lead can easily enter the food chain — a study of plant roots». *Science of The Total Environment*, Proceedings of the 2nd European Conference on Ecotoxicology, 134, Supplement 1: 423-29.
- Wilson, Mary Ann, Michael V. Johnston, Gary W. Goldstein, y Mary E. Blue. 2000. «Neonatal Lead Exposure Impairs Development of Rodent Barrel Field Cortex». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (10): 5540-45. doi:10.1073/pnas.97.10.5540.
- Wong, C. S. C., X. Li, y I. Thornton. 2006. «Urban environmental geochemistry of trace metals». *Environmental Pollution* 142 (1): 1-16.
- Yang, Jianjun, Shaoping Hu, Xincan Chen, Mingge Yu, Jin Liu, Hang Li, Chaofeng Shen, Jiyan Shi, y Yingxu Chen. 2010. «Transformation of Lead Solid Fraction in the Rhizosphere of *Elsholtzia Splendens*: The Importance of Organic Matter». *Water, Air, and Soil Pollution* 205 (1-4): 333-42. doi:10.1007/s11270-009-0077-x.
- Youssef, Refat A., y Mitsuo Chino. 1989. «Root-Induced Changes in the Rhizosphere of Plants. I. pH Changes in Relation to the Bulk Soil». *Soil Science and Plant Nutrition* 35 (3): 461-68. doi:10.1080/00380768.1989.10434779.
- Zubillaga, M. S., y Raúl S. Lavado. 2002. «Fertilización fosfatada prolongada y contenido de elementos traza en un argiudol típico de la pampa ondulada». *Ciencia del Suelo* 20 (2): 110-13.

**PARTE II.**

**ENSAYOS PRELIMINARES**

**DE ESPECIACIÓN DEL Pb**

## **2. ENSAYOS PRELIMINARES**

## 2.1. Introducción

La contaminación de los suelos es usualmente valorada mediante determinaciones de la concentración total del metal, tal es el caso de las regulaciones existentes a nivel mundial (Normativas de la UE y de la EPA) y nacional (Gobierno Argentino 1993). Sin embargo, estos valores totales no son necesariamente representativos de su biodisponibilidad (Magrisso, Belkin, y Erel 2009; Kot y Namiesńik 2000). En un intento de superar estas limitaciones, en las últimas décadas se han desarrollado procedimientos de Extracción Secuencial Selectiva (ESS), para discriminar la presencia de los metales traza en las diferentes fracciones (componente o conjunto de componentes definidos) de los suelos. Las especies metálicas que se encuentran en las fracciones soluble en agua e intercambiable (y a veces en la fracción orgánica) son en general las consideradas como relativamente disponibles para las plantas (Orroño y Lavado 2009; Salazar et al. 2012). De todos modos, todas las fracciones se encuentran relacionadas en la evolución de las interacciones entre el metal y los componentes del suelo. Además, las determinaciones sobre la biodisponibilidad del elemento y su destino en otras fracciones del suelo pueden servir como guía general, pero para el análisis sobre un sistema particular deben realizarse estudios sobre ese mismo sistema (McLean y Bledsoe 1992).

Por lo antedicho, el método de Extracción Secuencial Selectiva a emplear debe seleccionarse teniendo en cuenta las particularidades de cada suelo y del metal que se quiera extraer. Diversos métodos de ESS han sido propuestos para ensayos de especiación de elementos que pueden encontrarse asociados a distintas fracciones del suelo (Tessier, Campbell, y Bisson 1979; Ma y Uren 1998; McGrath y Cegarra 1992; Hass y Fine 2010) y, en particular, para la determinación de especiación de metales (Gleyzes, Tellier, y Astruc 2002; Rao, Sahuquillo, y Sanchez 2008). Estos consisten en la exposición de una muestra de suelo a tratamientos químicos de modo secuencial. En los sucesivos pasos de la secuencia, la muestra es expuesta a reactivos de poder creciente dirigidos a remover o disolver un componente específico del suelo; de esta forma la especie de interés que estaba unida a éste es liberada y puede cuantificarse. Debido a la existencia de posibles limitaciones, como extracciones incompletas por el uso de

extractantes débiles, o la redistribución del analito en las distintas fases de la extracción, los resultados se caracterizan en general como semicuantitativos. Aun así, son métodos muy útiles y son aplicados en distintos suelos y condiciones (Rao, Sahuquillo, y Sanchez 2008; Torri y Lavado 2008; Orroño y Lavado 2009; Kabala et al. 2011; Garrido y Helmhart 2012; Singani y Ahmadi 2012).

## **2.2. Objetivos**

- i. Realizar la caracterización del suelo obtenido de la localidad de Solís, representativo de los suelos existentes en el este de la región pampeana (Argiudoles Vérticos).
- ii. Confeccionar suelos sintéticos enriquecidos en óxidos de hierro y ácidos húmicos con concentraciones variables de Pb.
- iii. Estudiar métodos de Extracción Secuencial en el suelo natural y en los suelos sintéticos.
- iv. Seleccionar el método de Extracción Secuencial Selectiva más apropiado de acuerdo a los componentes del suelo utilizado.

## **2.3. Hipótesis**

- i. Las concentraciones de Pb determinadas por Extracción Secuencial Selectiva dependen del método utilizado.
- ii. Las concentraciones de Pb determinadas por Extracción Secuencial Selectiva dependen de los componentes del suelo analizado y sus características físicoquímicas.

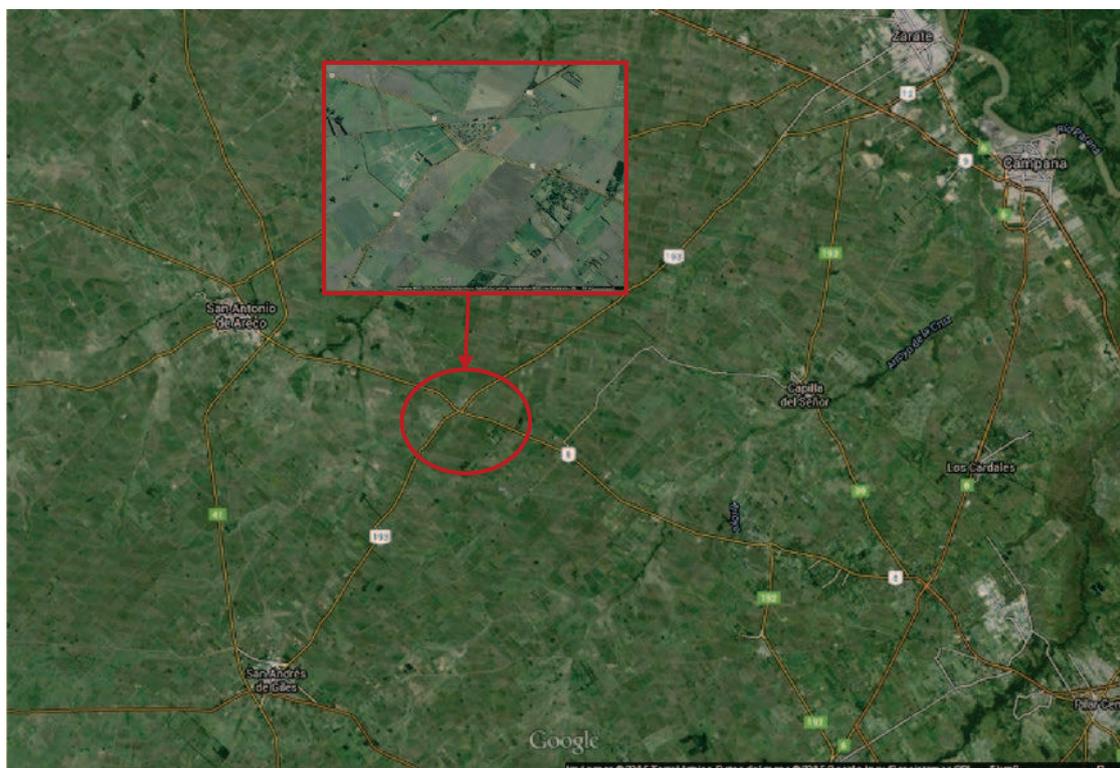
## 2.4. Caracterización del suelo

### 2.4.1. Materiales y Métodos

#### *Suelo*

El suelo utilizado en el presente trabajo es un Argiudoll Vértico (Gonzalez, Cruzate, y Panigatti 2013) de la localidad de Solís, provincia de Buenos Aires, Argentina ( $34^{\circ} 18' S$ ,  $59^{\circ} 20' W$ ). El área está destinada a diversos cultivos y cría de ganado, la división en parcelas puede observarse en la Figura 2.4.1.

La muestra obtenida corresponde al horizonte superficial del suelo. Para los análisis posteriores el suelo se secó al aire libre, se tamizó con tamiz de 2 mm de poro y se homogeneizó por cuarteo.



**Figura 2.4.1:** mapa físico político del noroeste de Buenos Aires. En detalle se presenta la zona asociada a la localidad de Solís ( $34^{\circ} 18' S$ ,  $59^{\circ} 20' W$ ) de la cual se obtuvo el suelo.

#### *Caracterización química y granulometría*

El pH se determinó según el procedimiento usado comúnmente (Thomas 1996) en agua, en  $\text{CaCl}_2$  0,01 M y en KCl 1 M.

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) se determinó mediante el método de intercambio compulsivo (Sumner y Miller 1996).

Los aniones en solución se analizaron por cromatografía iónica, luego de agitación continua por 1 hora de 1 g de suelo en 10 ml de agua; el análisis cromatográfico se realizó en columna DIONEX AS4A con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,8 mM –  $\text{NaHCO}_3$  1,7 mM, a  $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ .

El contenido de materia orgánica (MO) se determinó por diferencia de pesos mediante tres técnicas:

- i- calcinación en mufla con rampa térmica hasta un máximo de  $300^\circ\text{C}$ ,
- ii- destrucción con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% en buffer acético/acetato 0.05 M, pH 5-5,5, a  $70^\circ\text{C}$ , en plancha calefactora.
- iii- Valoración mediante titulación con dicromato.

Los volúmenes de las fracciones de arcilla-limo y de arena fueron determinadas luego de ser separadas por tamiz.

Los contenidos de Pb y de otros metales se determinaron mediante espectrometría de absorción atómica (EAA) en llama de aire/acetileno luego de digestión ácida (Wright y Stuczynski 1996) utilizando un Shimadzu AA 6800.

#### *Difracción de rayos X (DRX)*

El análisis de DRX se llevó a cabo con un difractómetro Philips X-Pert usando radiación  $\text{Cu K}_\alpha$  ( $\lambda = 0,154056 \text{ nm}$ ). Como una primera aproximación, se realizaron difractogramas del total del suelo (SCo). Luego se procedió a eliminar la materia orgánica, lo cual es sugerido para muestras que contengan más del

Estudios de especiación de Pb en suelos

1% de MO (Whittig y Allardice 1986). Se realizaron distintos tratamientos sobre la muestra original:

- i- destrucción de MO con  $H_2O_2$  (SPH),
- ii- destrucción de MO con mufla (SMu).

Además, sobre la muestra SPH se realizaron los siguientes tratamientos:

- i.a- saturación con K (SPH+K),
- i.b- saturación con K más calor (SPH+K+Q),
- i.c- saturación con Mg (SPH+Mg).

Se obtuvieron los patrones de difracción de todas las muestras resultantes.

Sobre la muestra SPH se realizó además el patrón de difracción de la fracción menor a  $62\ \mu\text{m}$ , correspondiente a limo y arcilla. Este último difractograma se analizó con la ayuda del programa MAUD, utilizando el método de refinamiento de Rietveld (Lutterotti, Matthies, y Wenk 1999).

#### *Observación microscópica*

Los distintos componentes minerales de la totalidad del suelo y de la fracción menor a  $62\ \mu\text{m}$  se estudiaron mediante microscopía óptica. Luego, se realizaron observaciones mediante microscopio electrónico de barrido (MEB), utilizando un microscopio Zeiss Supra 40 Gemini, equipado con un detector de espectroscopía de rayos X por dispersión de energía (EDE). El montaje de las muestras se realizó colocando una pequeña cantidad de la misma sobre una cinta adhesiva de carbón.

### *Espectroscopía Infrarroja*

Se analizaron muestras del suelo mediante espectroscopía infrarroja (IR) utilizando un espectrómetro FTIR Nicolet 8700, en el rango de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ . Para ello, previo a cada determinación, una parte de muestra se mezcló en mortero con KBr en proporción 0,1:30, y luego se prensó en forma de pastillas.

### *Reactivos*

Para la preparación de soluciones y lavados se utilizó agua ultra pura de un sistema Millipore MilliQ.

Se utilizaron reactivos de grado analítico.

## **2.4.2. Resultados y discusión**

Las propiedades químicas y los resultados del estudio de textura del suelo se muestran en la Tabla 2.4.1.

El suelo presenta una clase textural entre franco limoso y franco arcilloso, posee un pH entre muy fuertemente ácido y fuertemente ácido, con un contenido de MO alto (2,9%)<sup>a</sup>, y una capacidad de intercambio catiónica baja, de acuerdo a González et al. (2013). El pH se corresponde con lo informado por las cartas del INTA (<http://geointa.inta.gov.ar/visor/>). El contenido de MO es similar al determinado por otros autores para suelos pampeanos, que la estimaron en 3,3–3,9 % para el segmento superficial (Lavado y Porcelli 2000; Gonzalez, Cruzate, y Panigatti 2013); mientras que la CIC estimada por los mismos autores es mucho mayor.

---

<sup>a</sup> Debido a la precisión y repetibilidad de la técnica, se informa el contenido de MO obtenido por el método de titulación con dicromato.

**Tabla 2.4.1:** Propiedades químicas y granulométricas del suelo de estudio. r: tamaño de la partícula en dirección longitudinal.

Propiedad	Valor
pH	
Agua	5,21 ± 0,02
0,01 M CaCl <sub>2</sub>	4,84 ± 0,02
1,0 M KCl	4,40 ± 0,02
Textura (fracciones en peso)	
Arena gruesa $r > 500 \mu\text{m}$	10 %
Arena fina $500 \mu\text{m} > r > 62 \mu\text{m}$	25 %
Limo+arcilla $r < 62 \mu\text{m}$	65 %
Materia Orgánica (m/m)	2,9 %
CIC (cmol kg <sup>-1</sup> )	9,3
Aniones analizados (mg anión/kg suelo)	
Cl <sup>-</sup>	55
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	432
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	< 1
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	69

El contenido total de metales presenta valores normales para los suelos de la región. Según lo caracterizado por otros autores en profundidades entre 0 y 1 m, se han determinado valores bajos para Cd (0,64 mg kg<sup>-1</sup>), mientras que otros metales (Cr, Cu y Pb) se encontraron en valores entre 32 y 36 mg kg<sup>-1</sup> (Lavado et al. 1998; Lavado y Porcelli 2000; Lavado et al. 2004) excepto por el

## ENSAYOS PRELIMINARES

### Estudios de especiación de Pb en suelos

Cr que presenta un contenido levemente mayor. Todos los elementos determinados en el presente estudio poseen concentraciones que se hallan por debajo de los valores guía (Gobierno Argentino 1993); el contenido de Pb resultó no detectable para el método de detección utilizado (Tabla 2.4.2).

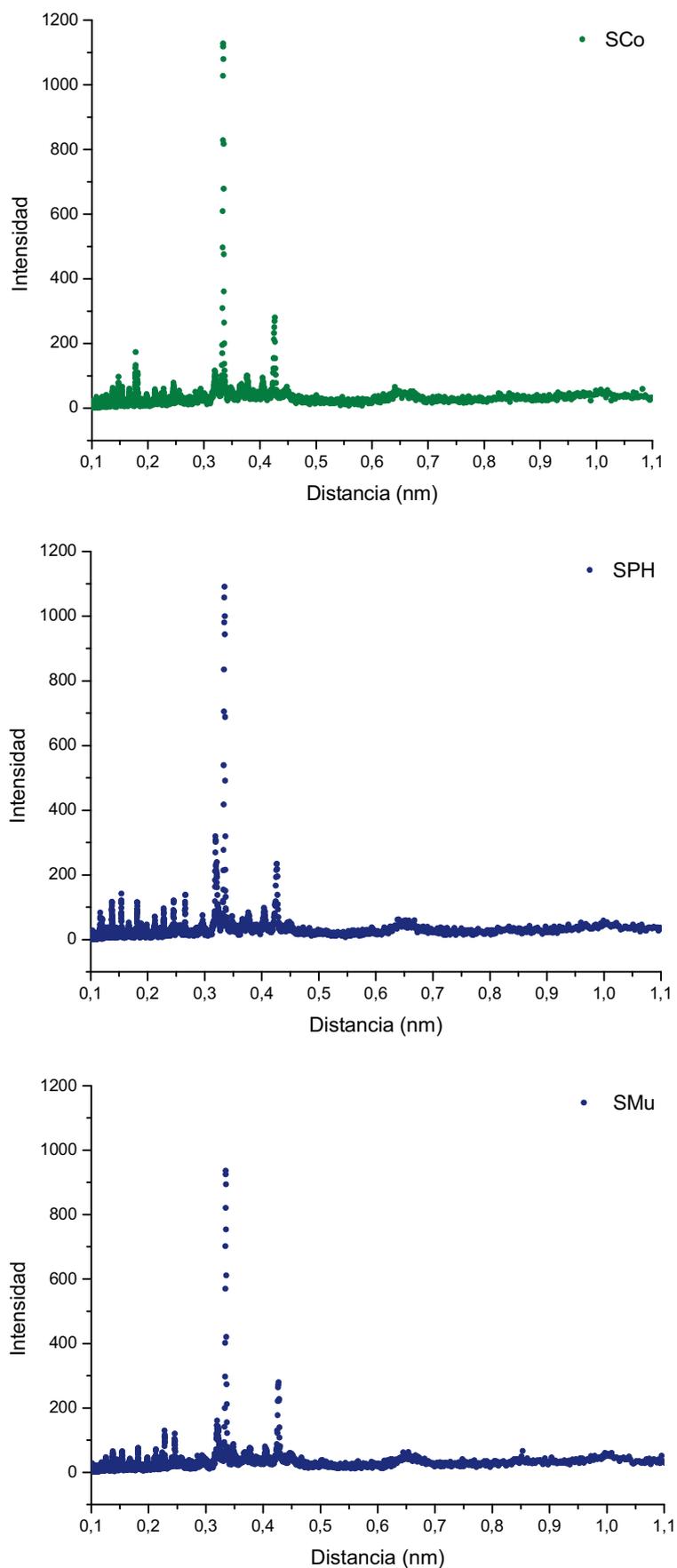
**Tabla 2.4.2:** Contenido de metales en el suelo control.

<b>Elemento (mg kg<sup>-1</sup>)</b>						
<b>Pb</b>	<b>Cu</b>	<b>Cd</b>	<b>Zn</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>	<b>Fe</b>
<10	37	<1	68	60	480	15300

En el análisis por DRX de la muestra del suelo sin tratar, realizado como una primera aproximación, se observaron señales de algunos componentes cristalinos, como cuarzo. Los difractogramas para la muestra de suelo sin tratar (SCo), y las tratadas para eliminación de MO con peróxido de hidrógeno (SPH) y con mufla (SMu) se presentan en la Figura 2.4.2. En los espectros correspondientes a SPH y SMu se observan un número mayor de picos, presentándose más agudos y con mayor intensidad. A partir del análisis cualitativo de los mismos se detectó la presencia de distintos minerales cristalinos. Los cristales con las distancias (nm) a las que se hallan sus picos de intensidad característicos (Whittig y Allardice 1986) en orden de mayor a menor intensidad son:

- Cuarzo: 0,3342, 0,4257, 0,1818, 0,2457, 0,2282 nm.
- Bernalita: 0,3760 nm.
- Cristobalita: 0,4043 nm.

Estudios de especiación de Pb en suelos



**Figura 2.4.2:** Difractogramas de rayos X del suelo bajo distintos tratamientos. SCO: suelo control, SPH: suelo con destrucción de MO por peróxido de hidrógeno, SMu: suelo con destrucción de MO por calcinación con mufla. Se observan los picos de intensidad en función de la distancia como señales de los compuestos cristalinos de la muestra.

También se observaron diferentes picos de difracción que no pudieron ser relacionados con cristales específicos, así como no se observó evidencia de minerales arcillosos.

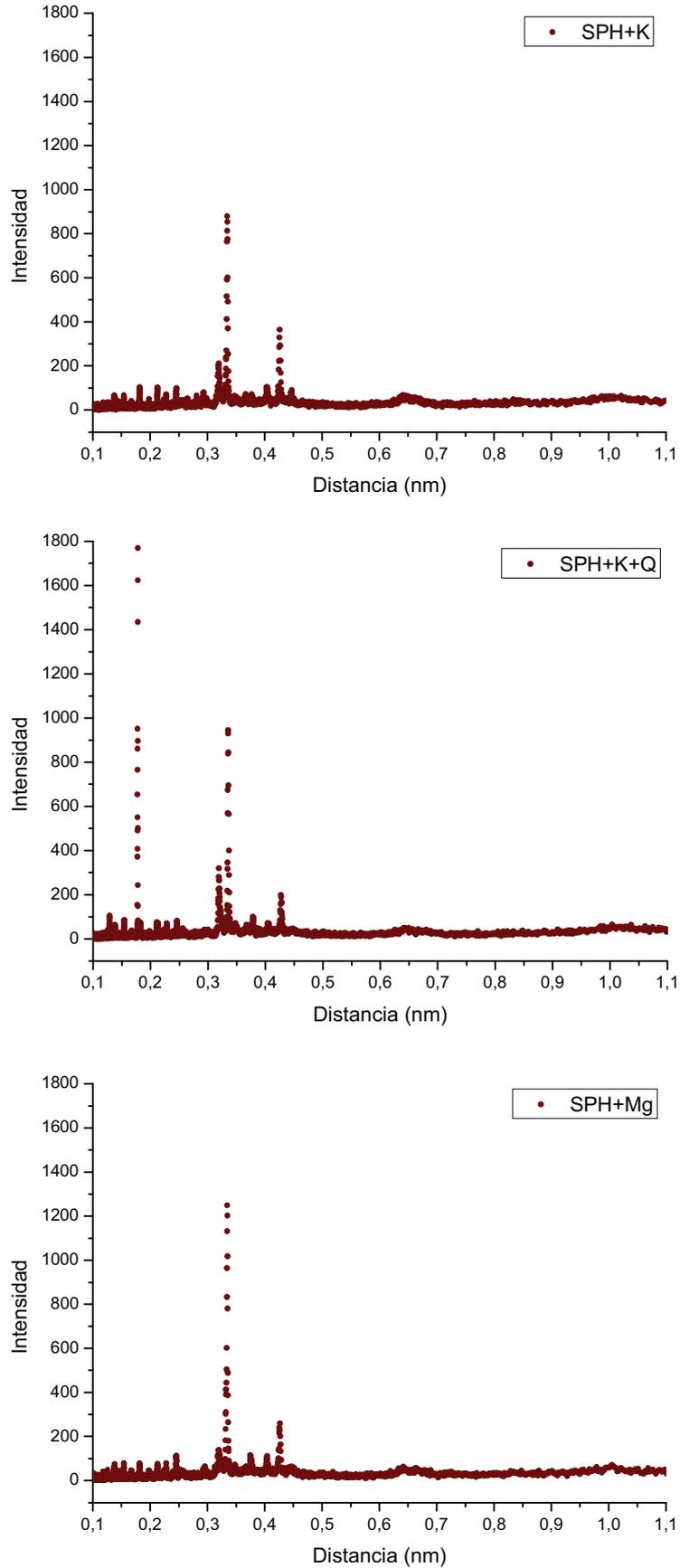
Los difractogramas resultantes de los tratamientos sobre la muestra SPH se presentan en la Figura 2.4.3. En los difractogramas de SPH+Mg y SPH+K puede observarse un pico muy suave a 1 nm de distancia. Éste podría deberse a un típico comportamiento de las micas, en particular de la Illita, las cuales sufren una separación entre sus láminas en presencia de soluciones de K y Mg (Whittig y Allardice 1986). De todos modos la señal resultó muy débil para concluir la presencia de Illita, aunque debe mencionarse que éste es un mineral abundante en los Argiudoles de la región pampeana (Gonzalez, Cruzate, y Panigatti 2013).

El estudio bajo microscopio óptico permitió reconocer algunas especies mineralógicas en las siguientes fracciones:

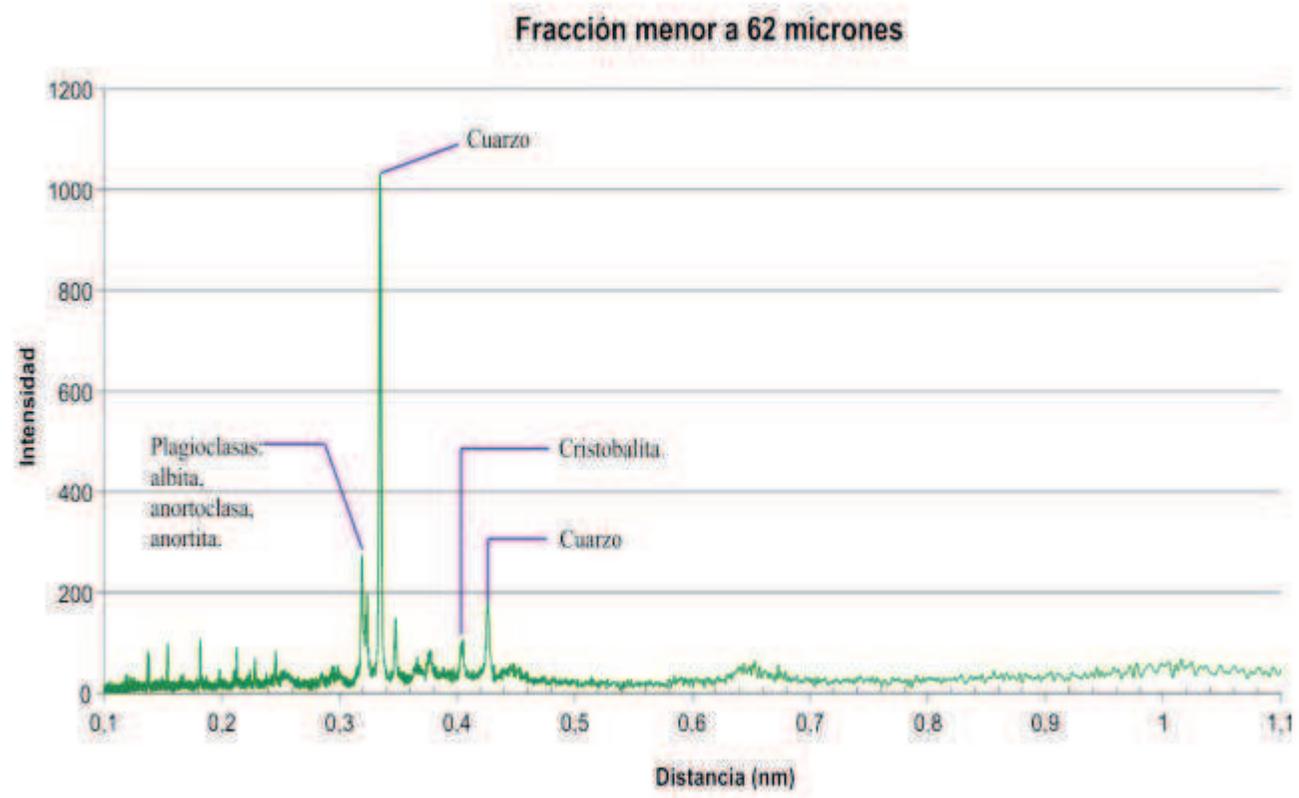
1. Fracción por debajo de los 62 micrones, 65% en peso del total de la muestra: presencia de cuarzo y arcillas mayoritariamente, minerales opacos y plagioclasas en cantidades subordinadas.
2. Fracción entre 62 y 500 micrones, 25% en peso del total de la muestra: pequeños clastos de rocas sedimentarias (líticos) y varios clastos monominerales.
3. Fracción por encima de los 500 micrones, 10% en peso del total de la muestra: sólo concentra clastos de rocas sedimentarias.

El DRX de la fracción menor a 62 micrones permitió hallar los picos de señal correspondientes a las especies mineralógicas descriptas para esa fracción, las cuales se señalan en el difractograma (Figura 2.4.4).

Estudios de especiación de Pb en suelos



**Figura 2.4.3:** Difractogramas de rayos X del suelo sin MO bajo distintos tratamientos. SPH+K: suelo sin MO tratado con solución de K, SPH+K+Q: suelo sin MO tratado con solución de K y calor, SPH+Mg: suelo sin MO tratado con solución de Mg. Se observan los picos de intensidad en función de la distancia como señales de los compuestos cristalinos de la muestra.



**Figura 2.4.4:** Difractogramas de rayos X de la fracción menor a 62µm del suelo. Se observan picos de intensidad.

Las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido a distintos aumentos se presentan en la Figura 2.4.5. Se observa una textura amorfa en general, con algunos minerales cristalinos como plagioclasas. El EDS permitió conocer el contenido elemental de la muestra ( $LD > 0,1\%$ ); los resultados (Figura 2.4.6) se corresponden con el análisis cristalográfico realizado previamente: la muestra presenta un contenido significativamente mayor de Al y de Si respecto de los otros elementos.

Por último, el suelo se caracterizó por IR (Figura 2.4.7), obteniendo un espectro donde se señalan los picos característicos encontrados (Lerot y Low 1976; Bukka, Miller, y Shabtai 1992; Fonseca et al. 2009; Musso et al. 2014):

i. A  $3620\text{ cm}^{-1}$  se observa la banda correspondiente a grupos OH en estructuras octaédricas, y a  $3400\text{ cm}^{-1}$  se localiza la banda correspondiente a los grupos OH superficiales y de agua localizada entre capas.

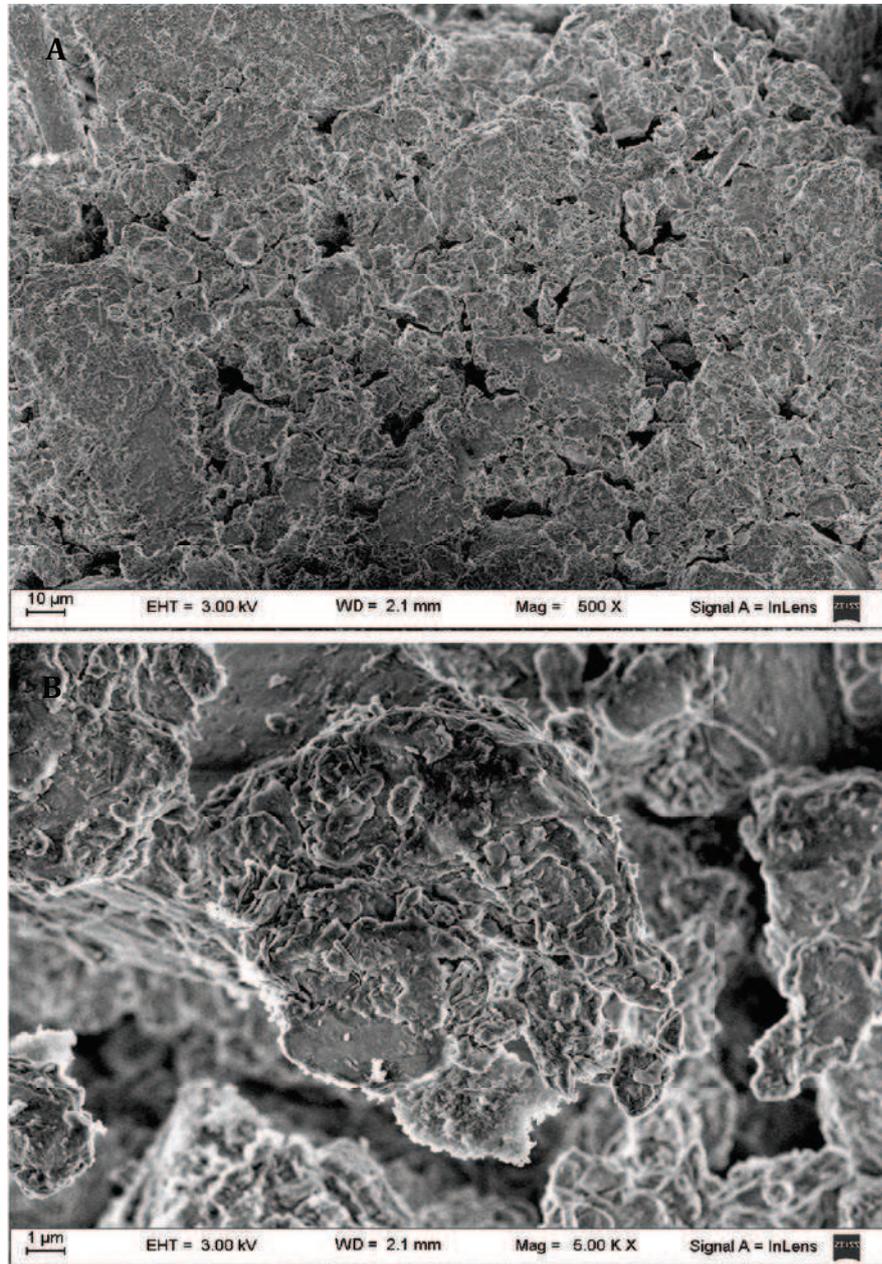
ii. La banda a  $1620\text{ cm}^{-1}$  corresponde a las vibraciones de uniones del agua.

iii. La banda más intensa entre  $1100$  y  $1000\text{ cm}^{-1}$  corresponde a vibraciones asociadas a enlaces apicales compartidos de O y a enlaces Si-O.

iv. A  $2900\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda muy chata y ancha correspondiente a vibraciones asociadas a materia orgánica.

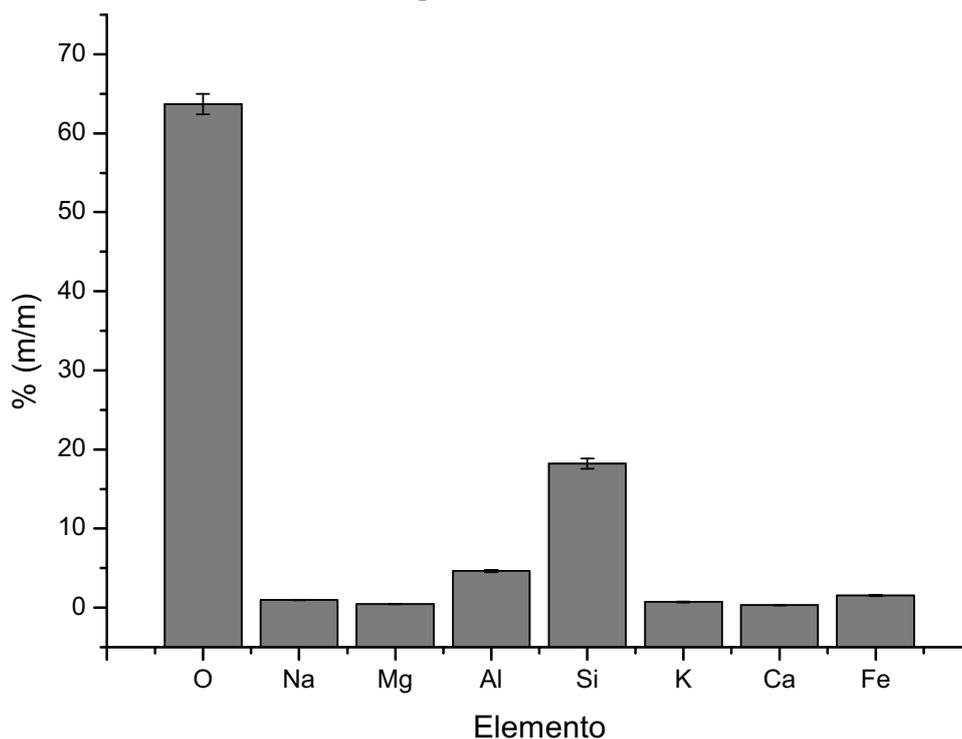
v. La banda observada a  $780\text{ cm}^{-1}$  corresponde a cuarzo.

Este espectro se utilizará como base para futuras comparaciones con muestras contaminadas.

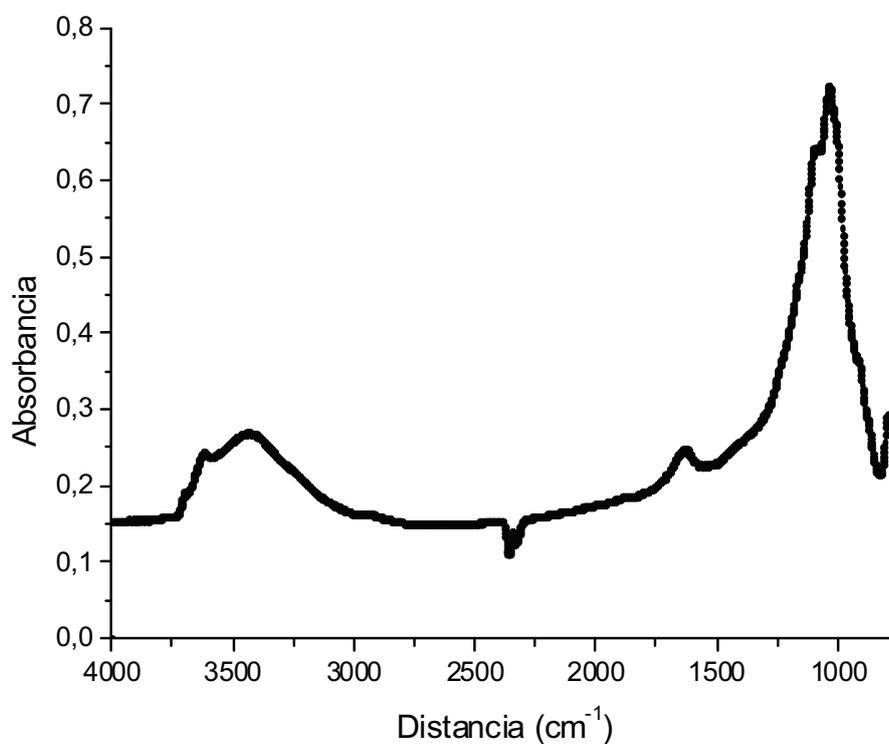


**Figura 2.4.5:** Micrografías MEB del suelo. Se observan minerales amorfos y algunos cristalinos como plagioclasas. **A:** aumento de 500X, **B:** aumento de 5000X

Estudios de especiación de Pb en suelos



**Figura 2.4.6:** Análisis elemental del suelo por EDS. Se presentan los %m/m de cada elemento con el ES asociado a la técnica.



**Figura 2.4.7:** Espectro de absorbancia de IR del suelo original.

## 2.5. Elección del método de Extracción Secuencial Selectiva

### 2.5.1. Materiales y Métodos

#### *Método de McGrath y Cegarra (1992)*

Se ensayó en una primera instancia la Extracción Secuencial Selectiva según McGrath y Cegarra (McGrath y Cegarra 1992), de ahora en adelante MGC. En la misma se definen cuatro fracciones: I, intercambiable y solubles en agua; II, asociada a materia orgánica; III, inorgánicos, carbonatos y especies asociadas a óxidos de Fe y Mn; IV, residual con contenido mayoritario de silicatos. El protocolo se describe en la siguiente tabla:

**Tabla 2.5.1:** Protocolo de ESS por el método de McGrath y Cegarra (1992).

<b>Fracción</b>	<b>Descripción en función de la especiación del Pb(II)</b>	<b>Solución extractante y tratamiento</b>
<b>I</b>	Intercambiable y soluble en agua	CaCl <sub>2</sub> , 0,1 M, agitación 16 horas
<b>II</b>	Asociado a materia orgánica.	NaOH, 0,5 M, agitación 16 horas
<b>III</b>	Asociado a componentes inorgánicos, carbonatos y a óxidos de Fe y Mn.	Na <sub>2</sub> EDTA, 0,05 M, agitación 1 hora
<b>IV</b>	En residuos, principalmente asociado a silicatos.	Digestión total con HNO <sub>3</sub> (conc.) + HCl (conc.) + HF (conc.)

#### *Método de Ma y Uren (1998)*

El segundo método estudiado fue el de Ma y Uren (Ma y Uren 1998), de ahora en adelante MMU. Este método define, originalmente, siete pasos: (i) solución del suelo, agitación con agua destilada; (ii) intercambiable, 1 M MgCl<sub>2</sub>, pH = 7,0; (iii) extractable con EDTA, NaCaHEDTA 1 %, pH 8,3; (iv) fácilmente

reducible con Mn, hidroquinona 0,1 %, pH 7,0; (v) carbonatos, buffer acético/acetato pH 4,74; (vi) materia orgánica, 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en buffer acetato pH 4,74; (vii) óxidos de Fe y Al, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> pH 3,25; (viii) formas residuales, obtenidas por diferencia entre la concentración total del metal y la suma de los pasos previos. En el presente trabajo este método fue modificándose mediante ajustes experimentales en función de las características del suelo en estudio. Las modificaciones realizadas fueron:

a. Los primeros dos pasos han sido fusionados en el paso I, en el cual se remueve la fracción soluble e intercambiable del catión del metal; se utiliza una solución 1 M de MgCl<sub>2</sub>. El uso de una sal clorada podría causar la precipitación de sales de baja solubilidad como PbCl<sub>2</sub>, PbClOH, etc.; sin embargo, el ion Cl<sup>-</sup> también forma complejos iónicos de PbCl<sub>3</sub><sup>-</sup> y PbCl<sub>4</sub><sup>2-</sup> a través de las siguientes reacciones:



La precipitación de cloruro de plomo puede ser escrita como:



Otra fase sólida que puede aparecer es el cloruro básico de plomo como:



La presencia de las especies de Pb(II) indicadas en las reacciones (1)-(6) se analizó con el programa Visual Minteq (Gustafsson et al. 2011); otras especies posibles, como complejos de Pb-OH, Pb(OH)<sub>2</sub>(s), etc. no son estables en las condiciones experimentales, por lo que *a priori* se descartaron en el análisis. Para el cálculo de los coeficientes de actividad debe tenerse en cuenta la alta fuerza iónica (hasta 1 M) presente. Se emplearon dos métodos: en el primero se utilizó la Teoría de Interacción Iónica Específica (SIT, de sus siglas en inglés) de Bronsted, Guggenheim y Scatchard (Scatchard 1936), la cual toma en cuenta las interacciones específicas entre iones en soluciones concentradas; los parámetros empleados fueron los hallados en IUPAC y NEA, más estimaciones empíricas en los casos en que los valores experimentales no se encontraban disponibles (ver Grenthe, Plyasunov, y Spahiu 1997 para más detalles). Los resultados indicaron que en las condiciones experimentales (pH 7,0 aproximadamente) la saturación respecto de PbCl<sub>2</sub> es alcanzada a una concentración total de Pb,  $c_{\text{Pb}}$ , de aproximadamente 7,5 mM, mientras que para PbClOH se encuentra cerca de 1,5 mM. Otra estimación se realizó utilizando la ecuación de Davies (Davies 1962), conocida por sobreestimar los coeficientes de actividad a altas fuerzas iónicas, lo que se traduce en una subestimación de la concentración de saturación; la saturación para PbCl<sub>2</sub> resultó a  $c_{\text{Pb}} \sim 3$  mM y para PbClOH a  $c_{\text{Pb}} \sim 1$  mM. Para 200 mg kg<sup>-1</sup> de Pb en suelo (concentración del mismo orden de magnitud que en típicos suelos contaminados), si todo el metal

estuviese disuelto en el primer paso,  $c_{Pb}$  sería alrededor de  $10^{-4}$  M, muy por debajo de las estimaciones antes realizadas.

*b.* El paso iii en el MMU es una extracción con CaEDTA que remueve los metales “adsorbidos”; este paso fue excluido ya que el EDTA es un fuerte complejante a los valores de pH experimentales, y podría formar un complejo de Pb que interfiriera con el análisis de otras fracciones (por ejemplo, removiendo el metal unido a MO, fracción de especial interés en el presente estudio).

*c.* El paso iv del método original se propone como paso II. El reactivo es la hidroquinona, un reductor que actúa sobre minerales oxidantes, como los óxidos de manganeso III y IV. La hidroquinona promueve la disolución de estos óxidos y la consecuente liberación de las especies metálicas asociadas, ya sean las incorporadas en el sólido o las adsorbidas en su superficie.

*d.* El paso v en el método original se aplica a la remoción de carbonatos; debido a que el suelo en estudio no contiene este tipo de minerales, este paso ha sido eliminado.

*e.* El paso vi corresponde al paso III. Aquí se produce un ataque oxidativo que destruye la materia orgánica (no se espera encontrar otros materiales oxidables en esta etapa) liberando los cationes metálicos unidos.

*f.* El paso vii corresponde al paso IV, descrito como la extracción de los iones asociados a óxidos de hierro y aluminio con oxalato.

*g.* Finalmente, se incluye un ataque con ácidos fuertes sobre el residuo (paso V) de modo de recuperar el Pb(II) presente en formas cristalinas estables.

El método a utilizar queda definido por las siguientes fracciones (pasos): I, intercambiable; II, asociada a óxidos de Mn y otros componentes fácilmente reducibles; III, materia orgánica; IV, extraíble con oxalato; V, residual, contenido principalmente en la estructura de los silicatos. El protocolo se describe en la Tabla 2.5.2.

ENSAYOS PRELIMINARES

Estudios de especiación de Pb en suelos

**Tabla 2.5.2:** Protocolo de ESS por el método de Ma y Uren (1998) con modificaciones en función del suelo estudiado.

<b>Fracción</b>	<b>Descripción en función de la especiación del Pb</b>	<b>Solución extractante y tratamiento</b>
<b>I</b>	Intercambiable y soluble en agua	MgCl <sub>2</sub> , 1,0 M, pH 7 agitación 1 hora
<b>II</b>	Asociado a óxidos de Mn y otros componentes fácilmente reducibles.	Hidroquinona 0,2% en CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 1,0 M, pH 7 agitación 1 hora
<b>III</b>	Asociado a materia orgánica.	Digestión con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> al 30% -agregado de 5ml hasta finalizar la reacción- en buffer CH <sub>3</sub> COONa/CH <sub>3</sub> COOH 0,5 M, pH 4,74 a 80°C, agitación adicional 1 hora
<b>IV</b>	Extraíble con oxalato.	Buffer (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 0,175 M/H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 0,1 M, pH 3,25, 15 horas en reposo más 2 horas de agitación.
<b>V</b>	Residuos, conteniendo principalmente silicatos.	Digestión total con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (conc.) + HClO <sub>4</sub> (conc.) + HNO <sub>3</sub> (conc.) + HF (conc.)

*Preparación muestras sintéticas*

Como una aproximación a los ensayos en suelo contaminado con Pb (de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), se realizaron ensayos con muestras sintéticas.

Se crearon muestras de suelo mezclando suelo control con fracciones de goetita y ácido húmico, a las cuales se les agregó previamente Pb en distintas concentraciones. De este modo se simularon suelos contaminados, con mayor contenido de MO y de óxidos de hierro que el original, con el fin de observar la capacidad extractiva de cada método en los pasos correspondientes a las interacciones del Pb(II) con estos componentes.

A partir de estas mezclas se prepararon las muestras sobre las que se realizó la extracción: suelo control (SCo), ácidos húmicos con Pb más suelo (AH+SCo), óxidos de hierro con Pb más suelo (Goe+SCo), ácidos húmicos con Pb más óxidos de hierro con Pb más suelo (AH+Goe+SCo).

#### *Primer ensayo mediante McGrath y Cegarra*

Se mezclaron 1 g de ácido húmico y otro de óxido de hierro, con 3 y 4 mmol de Pb, respectivamente. Luego se prepararon cuatro muestras (1 g) sobre las que se realizó la extracción, según lo indicado previamente, en las siguientes proporciones: 1 SCo, 0,25:0,75 AH+SCo, 0,25:0,75 Goe+SCo, 0,125:0,125:0,75 AH+Goe+SCo. Se obtuvieron concentraciones finales de Pb(II) de  $1,55 \times 10^5$ ,  $2,07 \times 10^5$  y  $1,81 \times 10^5$  mg kg<sup>-1</sup> para los preparados AH+SCo, Goe+SCo y AH+Goe+SCo, respectivamente.

#### *Segundo ensayo mediante McGrath y Cegarra*

Se realizó un segundo ensayo con suelos sintéticos similares a los usados en el primer ensayo, pero con menor concentración del contaminante: por cada gramo de ácido húmico y/o de óxido de hierro se agregaron 30 μmol de Pb. A partir de ellos se prepararon tres nuevas muestras en las siguientes proporciones: 1 SCo', 0,125:0,75 AH+SCo', 0,25:0,75 Goe+SCo', obteniendo concentraciones finales de Pb de 0, 800 y 1550 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente.

#### *Ensayo mediante Ma y Uren modificado*

El análisis se realizó sobre dos muestras de suelo sintético, preparados de la misma forma que los anteriores: por cada gramo de ácido húmico, de óxido de hierro y de suelo se agregaron 30  $\mu\text{mol}$  de Pb. A partir de ellos se prepararon las mezclas según las siguientes proporciones: 0,025:0,975 AH+SCo, 0,025:0,975 Goe+SCo, obteniendo una concentración final de 155  $\text{mg kg}^{-1}$ . Esta variación en la concentración se realizó con el fin de explorar los alcances sobre distintas concentraciones de la técnica de ESS.

#### *Determinación de Pb*

El contenido de Pb se determinó mediante espectrometría de absorción atómica con llama de aire/acetileno luego de la digestión ácida correspondiente (Wright y Stuczynski 1996), se utilizó un equipo Shimadzu AA 6800. El residuo final de la extracción fue completamente mineralizado mediante digestión en microondas en recipientes cerrados de politetrafluoretileno (CEM, MDS 2000), con el programa recomendado por el fabricante.

#### *Reactivos*

Para la preparación de soluciones y lavados se utilizó agua ultra pura de un sistema Millipore MilliQ. Las sales y soluciones son de grado analítico.

Se utilizó ácido húmico comercial Fluka y el óxido de hierro se sintetizó en el laboratorio mediante un método estándar (Schwertmann y Cornell 2000).

### **2.5.2. Resultados y Discusión**

#### *Primer ensayo mediante McGrath y Cegarra*

En la Tabla 2.5.3 se observa, para cada muestra, el contenido de Pb(II) extraído en cada fracción ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) y su porcentaje en función de la

## ENSAYOS PRELIMINARES

### Estudios de especiación de Pb en suelos

concentración total de Pb agregado ( $1,55 \times 10^5$ ,  $2,07 \times 10^5$  y  $1,81 \times 10^5$  mg kg<sup>-1</sup> para AH+S<sub>Co</sub>, Goe+S<sub>Co</sub> y AH+Goe+S<sub>Co</sub>, respectivamente). Los porcentajes de recuperación en cada fracción y totales son bajos, evidenciando una escasa recuperación del analito; el mayor porcentaje de extracción total alcanzado fue sólo de 14,7%.

En la Tabla 2.5.4 se presentan los porcentajes de Pb extraído en cada fracción relativizado al contenido de Pb obtenido en toda la extracción. No se observa una correspondencia entre el porcentaje de extracción de una fracción dada y el componente predominante de la muestra: para la muestra AH+S<sub>Co</sub> no se obtuvo una mayor recuperación en la fracción II, mientras que para la muestra Goe+S<sub>Co</sub> tampoco se obtuvo una recuperación mayor en la fracción III respecto de las otras fracciones.

Estos resultados se adjudican a que el óxido de hierro y el ácido húmico no retuvieron todo el Pb agregado al alcanzar el equilibrio debido a la alta concentración de Pb utilizada para asegurar altos niveles de metal adsorbido en los sólidos.

**Tabla 2.5.3:** Contenido de Pb extraído en ESS por método de McGrath y Cegarra (1992). Se muestran los resultados para cada fracción (mg kg<sup>-1</sup>) y el porcentaje de los mismos en función del Pb agregado teórico. Los valores totales corresponden a la suma algebraica de los resultados obtenidos en cada paso de la ESS.

Fracción Muestra		Pb extraído (mg kg <sup>-1</sup> )									
		I	%	II	%	III	%	IV	%	Total	%
<b>AH+S<sub>Co</sub></b>		2150	1,0	1090	0,7	2620	1,7	904	0,6	6764	4,4
<b>Goe+S<sub>Co</sub></b>		3430	1,7	12000	5,8	11960	5,8	3160	1,5	30550	14,7
<b>AH+Goe+S<sub>Co</sub></b>		4190	2,3	11200	6,2	6280	3,5	1360	0,8	23030	12,7

**Tabla 2.5.4:** Contenido de Pb extraído en ESS por método de McGrath y Cegarra (1992). Se muestran los porcentajes resultantes de la relación entre las concentraciones halladas para cada fracción y el total experimental extraído.

		Pb extraído (% relativizado)				
		I	II	III	IV	Total
Muestra	Fracción					
	AH+SCo	31,8	16,1	38,7	13,4	100,0
	Goe+SCo	11,2	39,3	39,2	10,3	100,0
AH+Goe+SCo		18,2	48,6	27,3	5,9	100,0

*Segundo ensayo mediante McGrath y Cegarra*

El segundo ensayo se realizó con las proporciones mencionadas en la sección 2.5.1 para AH+SCo' y Goe+SCo', con concentraciones de 800 y 1550 mg kg<sup>-1</sup> de Pb respectivamente.

En la Tabla 2.5.5 se presenta el contenido de Pb extraído en cada fracción (mg kg<sup>-1</sup>) y su porcentaje en función de la concentración total de Pb agregado. Los resultados obtenidos para esta concentración del elemento muestran un mayor porcentaje total de recuperación del Pb en la muestra AH+SCo', no así en Goe+SCo'. Además, para la muestra con AH no se observa un buen porcentaje de recuperación en la fracción correspondiente a materia orgánica (II), mientras que se observa un alto porcentaje de recuperación en la fracción correspondiente a óxidos de hierro (III). La misma tendencia se observa para la muestra con Goe, sólo que con valores más bajos de extracción del Pb.

En la Tabla 2.5.6 se presentan los porcentajes de extracción del Pb agregado en función del total extraído. En la misma se observa claramente una alta capacidad de extracción en la fracción de los óxidos y compuestos inorgánicos (III) para las muestras ensayadas, no así en la fracción de los compuestos orgánicos.

## ENSAYOS PRELIMINARES

### Estudios de especiación de Pb en suelos

**Tabla 2.5.5:** Contenido de Pb extraído en ESS por método de McGrath y Cegarra (1992). Se muestran los resultados para cada fracción ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) y el porcentaje de los mismos en función del Pb agregado teórico. Los valores totales corresponden a la suma algebraica de los resultados obtenidos en cada paso de la ESS.

Fracción Muestra		Pb extraído ( $\text{mg kg}^{-1}$ )									
		I	%	II	%	III	%	IV	%	Total	%
AH+SCo'		8,7	1,1	130,0	16,3	340,0	42,5	85,0	10,6	563,7	70,5
Goe+SCo'		28,0	1,8	16,0	1,0	230,0	14,8	49,0	3,2	323,0	20,8

**Tabla 2.5.6:** Contenido de Pb extraído en ESS por método de McGrath y Cegarra (1992). Se muestran los porcentajes resultantes de la relación entre las concentraciones halladas para cada fracción y el total experimental extraído.

Fracción Muestra		Pb extraído (% relativizado)				
		I	II	III	IV	Total
AH+SCo'		1,5	23,1	60,3	15,1	100,0
Goe+SCo'		8,7	5,0	71,2	15,2	100,0

Las concentraciones de Pb hallados en las fracciones II y III pueden explicarse si se consideran los equilibrios en solución del Pb(II). En las concentraciones experimentales, el Pb(II) podría precipitar como  $\text{Pb(OH)}_2$  en la solución de NaOH en el paso II, obteniéndose un bajo porcentaje de Pb en la solución de extracción. Luego, en el paso III este precipitado podría redisolverse por desplazamiento del equilibrio debido a la acción del EDTA, obteniendo un alto porcentaje de recuperación del Pb(II).

*Ensayo mediante Ma y Uren modificado*

En la Tabla 2.5.7 se muestran los valores totales de extracción para las muestras estudiadas con concentración final de 155 mg kg<sup>-1</sup> de Pb. Para la muestra Goe+SCo los valores de extracción fueron muy bajos o no detectables con la técnica utilizada. Para la muestra AH+SCo, el porcentaje de recuperación total fue satisfactorio en todas las fracciones. En la Tabla 2.5.8 se presentan los porcentajes de Pb extraído en cada fracción respecto del total extraído. Puede observarse que si bien el porcentaje de Pb recuperado en la fracción III (asociado a MO) es menor que el recuperado en la fracción IV (óxidos de hierro), la diferencia entre estos valores es menor que con el otro método ensayado. El alto valor de extracción obtenido en la fracción IV, se vincula al fuerte poder complejante del oxalato, ya que esta diferencia se presenta tanto en la muestra con agregados de ácidos húmicos como en la muestra con agregados de óxidos de hierro. Los resultados de todos los ensayos muestran que existe desplazamiento entre las distintas fracciones; no obstante, se utilizará este último método a los fines comparativos en el desarrollo posterior de esta tesis.

**Tabla 2.5.7:** Contenido de Pb extraído en ESS por método de Ma y Uren (1998) modificado. Se muestran los resultados para cada fracción (mg kg<sup>-1</sup>) y el porcentaje de los mismos en función del Pb agregado teórico. Los valores totales corresponden a la suma algebraica de los resultados obtenidos en cada paso de la ESS. ND: no detectado.

Fracción Muestra		Pb extraído (mg kg <sup>-1</sup> )											
		I	%	II	%	III	%	IV	%	V	%	Total	%
<b>AH+SCo</b>		24	15,5	10	6,5	67	43,2	83	53,5	46	29,7	230	148,4
<b>Goe+SCo</b>		ND	ND	ND	ND	6	3,9	30	19,4	<10	ND	36	23,2



## ENSAYOS PRELIMINARES

### Estudios de especiación de Pb en suelos

**Tabla 2.5.9:** Contenido de Pb extraído por el método de Ma y Uren (1998) modificado, para el análisis de repetibilidad. Se muestran los resultados para cada fracción (mg kg<sup>-1</sup>). Los valores totales corresponden a la suma algebraica de los resultados obtenidos en cada paso de la ESS. ND: no detectado.

		<b>Pb extraído (mg kg<sup>-1</sup>)</b>					
<b>Fracción</b>	<b>Muestra</b>	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>Total</b>
	<b>AH+SCo a</b>	20,0	2,1	7,2	33,0	ND	62,3
	<b>AH+SCo b</b>	25,0	2,0	7,7	39,0	ND	73,7
	<b>AH+SCo c</b>	29,0	2,1	4,8	43,0	ND	78,9
	<b>Goe+SCo a</b>	15,0	6,0	17,0	71,0	ND	109,0
	<b>Goe+SCo b</b>	12,0	5,7	11,0	68,0	ND	96,7
	<b>Goe+SCo c</b>	15,0	6,3	14,0	63,0	ND	98,3
	Media AH	24,7	2,1	6,60	38,3	--	71,6
	Desvío AH	4,5	0,1	1,6	5,0	--	8,5
	ES AH	2,6	0,0	0,9	2,9	--	4,9
	Media Goe	14,0	6,0	14,0	67,3	--	101,3
	Desvío Goe	1,7	0,3	3,0	4,0	--	6,7
	ES Goe	1,0	0,2	1,7	2,3	--	3,9

### 2.6. Conclusiones

El Argiudol Vértico estudiado posee una importante proporción de plagioclasas y cuarzo, con un contenido relativamente alto de materia orgánica.

Mediante el ensayo sobre muestras sintéticas puede concluirse que el método seleccionado (Ma y Uren modificado) permite una recuperación satisfactoria del contaminante dentro de los límites de este tipo de métodos, consistente con la composición de la muestra y la concentración agregada de Pb.

### Estudios de especiación de Pb en suelos

El método de McGrath y Cegarra (1992) no resultó satisfactorio para el suelo estudiado. Esta diferencia en la efectividad de los métodos ensayados verifica las hipótesis planteadas.

Además, para este método se encontró un alto porcentaje de extracción en la fracción que estaría asociada a óxidos de hierro y aluminio (F IV). Esto se debe al poder complejante del oxalato, reactivo utilizado para la extracción, como se discute en el próximo capítulo.

## 2.7. Bibliografía

- Bukka, K., J.D. Miller, y J. Shabtai. 1992. «FTIR Study of Deuterated Montmorillonites: Structural Features Relevant to Pillared Clay Stability». *Clays and Clay Minerals* 40 (1): 92-102. doi:10.1346/CCMN.1992.0400110.
- Davies, Cecil W. 1962. *Ion association*. London: Butterworths.
- Fonseca, B., H. Maio, C. Quintelas, A. Teixeira, y T. Tavares. 2009. «Retention of Cr(VI) and Pb(II) on a loamy sand soil: Kinetics, equilibria and breakthrough». *Chemical Engineering Journal* 152 (1): 212-19. doi:10.1016/j.cej.2009.04.045.
- Garrido, Fernando, y Martin Helmhart. 2012. «Lead and soil properties distributions in a roadside soil: Effect of preferential flow paths». *Geoderma* 170 (enero): 305-13. doi:10.1016/j.geoderma.2011.10.017.
- Gleyzes, Christine, Sylvaine Tellier, y Michel Astruc. 2002. «Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 21 (6-7): 451-67. doi:10.1016/S0165-9936(02)00603-9.
- Gobierno Argentino. 1993. *Régimen de desechos peligrosos, Niveles guía de calidad suelos. Decreto*. Vol. 831/93.
- Gonzalez, J., G. G. Cruzate, y J. L. Panigatti. 2013. *Suelos de la costa NE del Río Paraná (prov. de Bs. As.)*. 1ª ed. San Pedro, pcia. Bs. As., Argentina: INTA ediciones.
- Grenthe, Ingmar, Andrey V. Plyasunov, y Kastriot Spahiu. 1997. «Estimations of Medium Effects on Thermodynamic Data». En *Modelling in Aquatic Chemistry*, editado por Ingmar Grenthe y Ignasi Puigdomenech, 325-426. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Gustafsson, Jon Petter, Charlotta Tiberg, Abubaker Edkymish, y Dan Berggren Kleja. 2011. «Modelling lead(II) sorption to ferrihydrite and soil organic matter». *Environmental Chemistry* 8 (5): 485-92.
- Hass, Amir, y Pinchas Fine. 2010. «Sequential Selective Extraction Procedures for the Study of Heavy Metals in Soils, Sediments, and Waste Materials—a Critical Review». *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 40 (5): 365-99. doi:10.1080/10643380802377992.
- Kabala, Cezary, Anna Karczewska, Katarzyna Szopka, y Jaroslaw Wilk. 2011. «Copper, Zinc, and Lead Fractions in Soils Long-Term Irrigated with Municipal Wastewater». *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 42 (8): 905-19. doi:10.1080/00103624.2011.558960.
- Kot, Agata, y Jacek Namiesnik. 2000. «The role of speciation in analytical chemistry». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 19 (2): 69-79.
- Lavado, Raúl S., y Claudia A. Porcelli. 2000. «Contents and Main Fractions of Trace Elements in Typic Argiudolls of the Argentinean Pampas». *Chemical Speciation and Bioavailability* 12 (2): 67-70. doi:10.3184/095422900782775553.
- Lavado, Raúl S., M. S. Rodríguez, J. D. Scheiner, M. A. Taboada, G. Rubio, R. Alvarez, M. Alconada, y M. S. Zubillaga. 1998. «Heavy metals in soils of Argentina: comparison between urban and agricultural soils». *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 29 (11-14): 1913-17.

- Lavado, Raúl S., M. S. Zubillaga, R. Alvarez, y M. A. Taboada. 2004. «Baseline Levels of Potentially Toxic Elements in Pampas Soils». *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 13 (5): 329-39. doi:10.1080/10588330490500383.
- Lerot, Luc, y Philip F. Low. 1976. «Effect of swelling on the infrared absorption spectrum of montmorillonite». *Clays and Clay minerals* 24 (4): 191-99.
- Lutterotti, L., S. Matthies, y H. R. Wenk. 1999. «MAUD: a friendly Java program for material analysis using diffraction». *IUCr: Newsletter of the CPD* 21 (14-15).
- Magrisso, Sagi, Shimshon Belkin, y Yigal Erel. 2009. «Lead Bioavailability in Soil and Soil Components». *Water, Air, and Soil Pollution* 202 (1-4): 315-23. doi:10.1007/s11270-009-9978-y.
- Ma, Y. B., y N. C. Uren. 1998. «Transformations of heavy metals added to soil -- application of a new sequential extraction procedure». *Geoderma* 84 (1-3): 157-68. doi:16/S0016-7061(97)00126-2.
- McGrath, S.P., y J. Cegarra. 1992. «Chemical extractability of heavy metals during and after long-term applications of sewage sludge to soil». *Journal of Soil Science* 43 (2): 313-21.
- McLean, Joan E., y Bert E. Bledsoe. 1992. «Ground water issue». *Behaviour of metals in soils. United States Environmental Protection Agency Office of Solid Waste and Emergency Response. EPA/540/S-92/018.* <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.384.7159&rep=rep1&type=pdf>.
- Musso, T.B., M.E. Parolo, G. Pettinari, y F.M. Francisca. 2014. «Cu(II) and Zn(II) Adsorption Capacity of Three Different Clay Liner Materials». *Journal of Environmental Management* 146 (diciembre): 50-58. doi:10.1016/j.jenvman.2014.07.026.
- Orroño, Daniela I., y Raúl S. Lavado. 2009. «Distribution of extractable heavy metals in different soil fractions». *Chemical Speciation and Bioavailability* 21 (4): 193-98. doi:10.3184/095422909X12473204137916.
- Rao, C. R. M., A. Sahuquillo, y J. F. Lopez Sanchez. 2008. «A Review of the Different Methods Applied in Environmental Geochemistry For Single and Sequential Extraction of Trace Elements in Soils and Related Materials». *Water, Air, and Soil Pollution* 189 (1-4): 291-333. doi:10.1007/s11270-007-9564-0.
- Salazar, M.J., J.H. Rodriguez, G.L. Nieto, y M.L. Pignata. 2012. «Effects of Heavy Metal Concentrations (Cd, Zn and Pb) in Agricultural Soils near Different Emission Sources on Quality, Accumulation and Food Safety in Soybean [Glycine Max (L.) Merrill]». *Journal of Hazardous Materials* 233-234: 244-53. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.07.026.
- Scatchard, George. 1936. «Concentrated Solutions of Strong Electrolytes.» *Chemical Reviews* 19 (3): 309-27. doi:10.1021/cr60064a008.
- Schwertmann, Udo, y Rochelle M. Cornell. 2000. *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*. 2nd, Completely Revised and Enlarged Edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Singani, Ali Akbar Safari, y Paria Ahmadi. 2012. «Manure Application and Cannabis Cultivation Influence on Speciation of Lead and Cadmium by Selective Sequential Extraction». *Soil and Sediment Contamination: An*

- International Journal* 21 (3): 305-21.  
doi:10.1080/15320383.2012.664186.
- Sumner, Malcolm E., y William P. Miller. 1996. «Cation exchange capacity and exchange coefficients». En *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*, editado por Donald L. Sparks, 1201-30. Soil Science Society of America Book Series 5. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy-Soil Science Society of America.
- Tessier, A., P. G. C. Campbell, y M. Bisson. 1979. «Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals». *Analytical Chemistry* 51 (7): 844-51. doi:10.1021/ac50043a017.
- Thomas, G. W. 1996. «Soil pH and Soil Acidity». En *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*, editado por Donald L. Sparks, 475-90. Soil Science Society of America Book Series 5. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy-Soil Science Society of America.
- Torri, Silvana, y Raúl S. Lavado. 2008. «Dynamics of Cd, Cu and Pb added to soil through different kinds of sewage sludge». *Waste Management* 28 (5): 821-32. doi:10.1016/j.wasman.2007.01.020.
- Whittig, L. D., y W. R. Allardice. 1986. «X-Ray Diffraction Techniques». En *Methods of Soil Analysis: Part 1—Physical and Mineralogical Methods*, 331-62.  
<https://dl.sciencesocieties.org/publications/books/abstracts/sssabooks/eries/methodsofsoilan1/331>.
- Wright, R. J., y T. Stuczynski. 1996. «Atomic Absorption and Flame Emission Spectrometry». En *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*, editado por Donald L. Sparks, 65-90. Soil Science Society of America Book Series 5. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy-Soil Science Society of America.

# **3. INTERACCIÓN DE Pb CON LOS COMPONENTES DEL SUELO**

#### **3.1. Introducción**

##### *Biodisponibilidad y evolución de Pb(II) en suelo*

Numerosos estudios muestran que la biodisponibilidad de los metales traza depende de las características del suelo y de la interacción del metal con los componentes del mismo. El pH (Youssef and Chino 1989), el contenido de materia orgánica (Yang et al. 2010), los óxidos de hierro y aluminio, y el contenido de arcillas (Magrisso, Belkin, and Erel 2009; Shahid, Pinelli, and Dumat 2012) son parámetros a tener en cuenta al momento de estudiar la especiación de un metal en un suelo determinado.

La especiación del Pb en el suelo, es decir las distintas formas que toma el ión metálico desde su incorporación en forma soluble hasta las formas más estables, ha sido estudiada en diversas condiciones y en comparación con otros metales traza, donde, mayormente, el primer estado y el más lábil es el catión  $Pb^{2+}$  (Orroño and Lavado 2009; Padmavathiamma and Li 2010). Es en este estado que el Pb puede ser absorbido desde el suelo por las plantas, y luego ser translocado a distintos órganos como raíz, tallo, hojas y granos (Liu et al. 2000; Orroño, Schindler, and Lavado 2012; Salazar et al. 2012; Karak et al. 2013; Rodriguez et al. 2014). Así, se incorpora a los eslabones primarios de la cadena alimentaria, habilitando su potencial incorporación en animales y humanos (Wierzbicka and Antosiewicz 1993). Es importante entonces estudiar la evolución del Pb en suelos pampeanos y su interacción con los distintos componentes de los mismos.

##### *Efectos de la temperatura ambiente sobre la especiación del Pb(II) en suelo*

Como queda antedicho, la mayoría de los estudios sobre el Pb se focalizan en su origen, propiedades de la fuente e interacción con componentes del suelo. No ha sido estudiada la evolución del Pb en función del tiempo que ha permanecido en el suelo o por la influencia de las condiciones ambientales (Jensen, Ottosen, and Pedersen 2006; Ndzangou, Richer-LaFLèche, and Houle 2006; Kaplan and Yaman 2009; Yang et al. 2010; Malandrino et al. 2011). En la presente

## INTERACCIÓN DE Pb CON LOS COMPONENTES DEL SUELO

### Evolución en función del tiempo en un suelo pampeano

tesis se estudió, por lo tanto, la evolución en invernáculo de la especiación en suelos contaminados con Pb, se consideró la variabilidad estacional de la temperatura de la región noroeste de Buenos Aires (Tabla 3.1.1), y su relación con los resultados de especiación del metal.

**Tabla 3.1.1:** Temperaturas mínimas, medias y máximas (°C) correspondientes a los meses de invierno (agosto-septiembre) y de verano (diciembre-febrero) del año 2013 de la zona noroeste de la provincia de Buenos Aires. Los datos se obtuvieron de la base de datos del Centro de Información Meteorológica del Servicio Meteorológico Nacional.

Mes	Temperatura (°C)		
	Mínima	Media	Máxima
Agosto	1,1	11,2	23,1
Septiembre	4,0	15,9	28,8
Diciembre	10,6	22,6	33,7
Enero	14,2	25,7	38,8
Febrero	13,6	24,5	35,4

### 3.2. Objetivos

Los objetivos de este estudio son:

- i) Caracterizar el suelo luego del agregado de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ .
- ii) Estudiar la especiación del Pb(II) en el suelo en función del tiempo, inmediatamente después de ocurrida la contaminación.
- iii) Estudiar la influencia de la temperatura ambiente en dicha especiación.

### 3.3. Hipótesis

Las hipótesis planteadas para dichos objetivos son:

i) La asociación del Pb con los componentes del suelo depende del tiempo de interacción entre el suelo y el metal.

ii) La asociación del Pb con los componentes del suelo es influenciada por la temperatura ambiente.

### 3.4. Materiales y Métodos

#### *Suelo*

El suelo utilizado y sus características se describieron en el Capítulo 2 de la presente tesis.

#### *Dispositivo experimental*

Se realizaron dos experimentos de especiación y sorción de Pb en suelo. El primero se realizó entre los meses de agosto y septiembre, bajo condiciones de bajas temperaturas (típicas de invierno avanzado en nuestra región); el segundo se realizó entre los meses de diciembre y febrero, con las temperaturas altas típicas del verano.

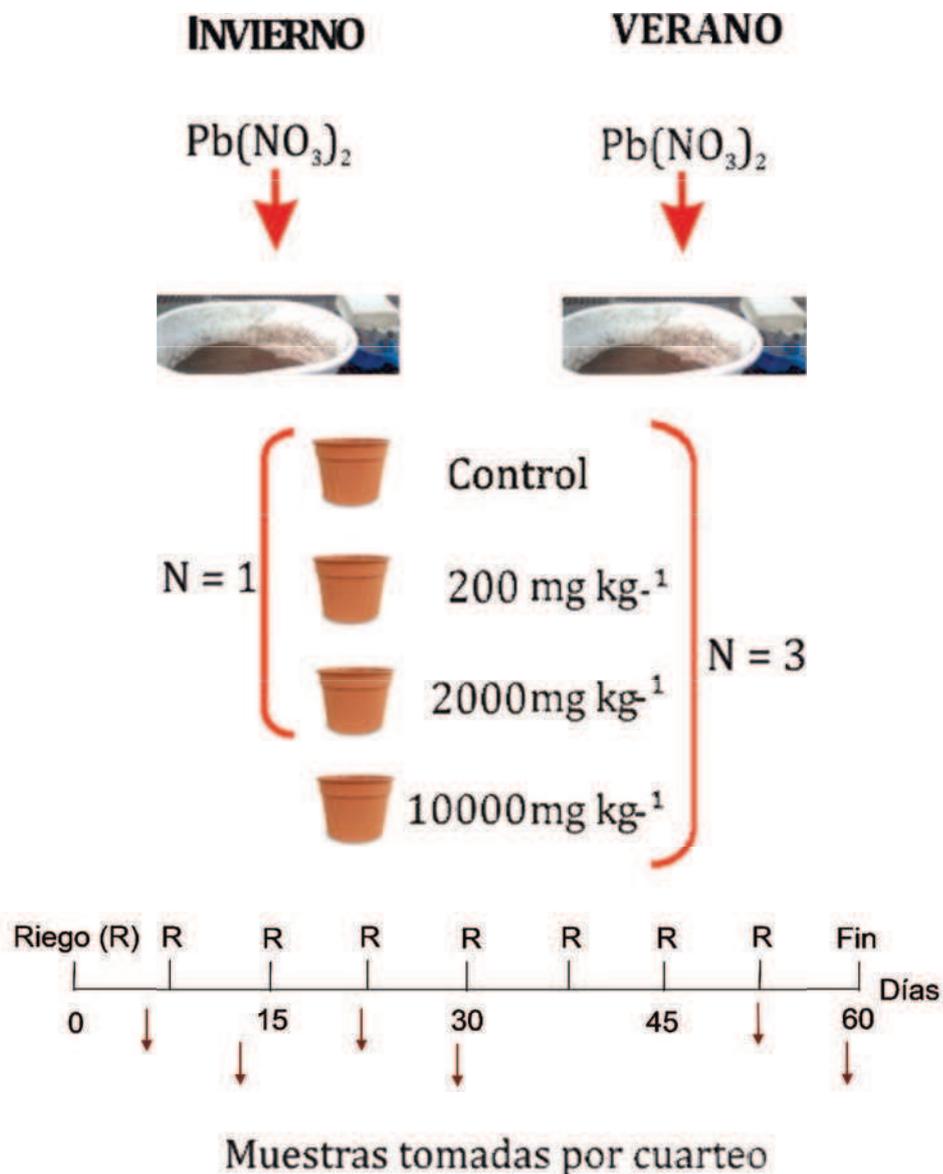
Para ello se contaminó el suelo con solución de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  hasta llegar a concentraciones de 200, 2000 o 10000  $\text{mg kg}^{-1}$  de suelo. Se dispusieron 2 kg del mismo en macetas de 2 L. Las macetas se colocaron en un invernáculo y fueron regadas cada 7 días al 70% de su capacidad de campo. Las muestras se colectaron a distintos tiempos durante los 60 días del ensayo (Figura 3.4.1).

## INTERACCIÓN DE Pb CON LOS COMPONENTES DEL SUELO

Evolución en función del tiempo en un suelo pampeano

*Microscopio de Barrido Electrónico y Espectroscopía de rayos X por dispersión de energía*

Sobre muestras del suelo contaminado con Pb se realizaron observaciones mediante microscopio electrónico de barrido (MEB). Se utilizó un microscopio Zeiss Supra 40 Gemini, equipado con detector de espectroscopía de rayos X por dispersión de energía (EDE) para la determinación del contenido elemental del suelo. El montaje de las muestras se realizó colocando una pequeña cantidad de la misma sobre una cinta adhesiva de carbón.



**Figura 3.4.1:** Diseño experimental del ensayo de especiación de Pb en invernáculo.

#### *Espectroscopía Infrarroja*

Se analizaron muestras del suelo contaminado con 0, 2000 y 10000 mg kg<sup>-1</sup> de Pb mediante espectroscopía infrarroja (IR). Se utilizó un espectrofotómetro FTIR Nicolet 8700, en el rango de 400-4000 cm<sup>-1</sup>. La preparación de las muestras se realizó mezclando las mismas con KBr en mortero en proporción 1:300 (en masa); luego se prensaron obteniendo pastillas.

#### *Extracción Secuencial Selectiva (ESS)*

Las muestras de 200 mg kg<sup>-1</sup> de Pb (que corresponden a los valores hallados típicamente en ambientes contaminados) fueron analizadas mediante ESS, según el método seleccionado de (Ma and Uren 1998) con las modificaciones descritas en el Capítulo 2, donde se describen las fracciones definidas operacionalmente. Las extracciones se realizaron por duplicado o triplicado.

El análisis sobre la especiación química se estudió sobre los resultados de la ESS, y se complementó con un análisis computacional mediante el programa Visual Minteq (Gustafsson 2011).

#### *Determinación de Pb*

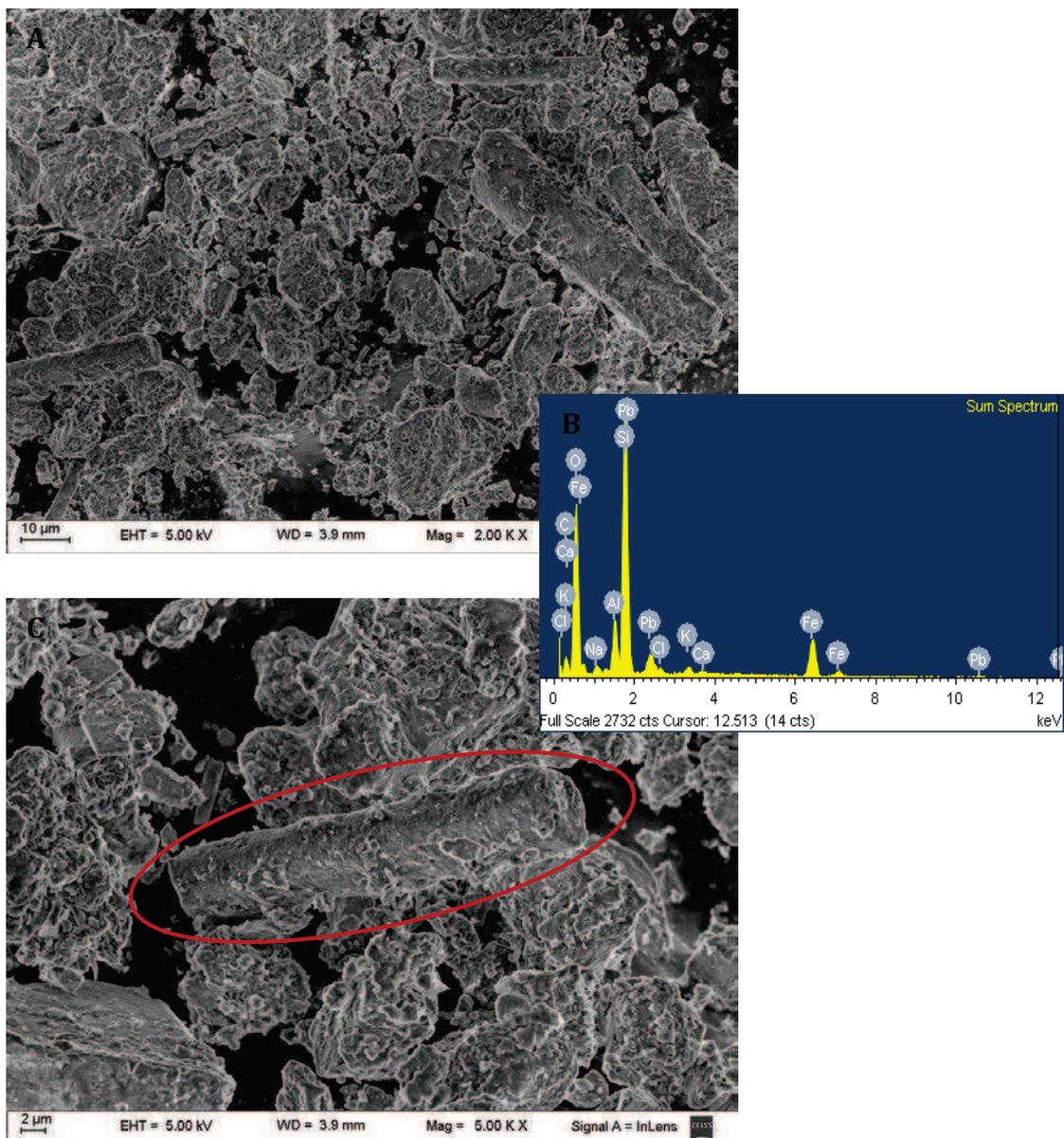
El contenido de Pb se determinó mediante espectrometría de absorción atómica (EAA) en llama de aire/acetileno luego de digestión ácida (Wright and Stuczynski 1996) utilizando un equipo Shimadzu AA 6800.

Además, se realizaron estudios sobre la determinación de Pb en solución de KNO<sub>3</sub> 0,2 M mediante la técnica de voltametría de redisolución anódica. Se ensayaron concentraciones entre 4 µg kg<sup>-1</sup> y 2,0 mg kg<sup>-1</sup> de Pb. Debido a interferencias de componentes del agua con la determinación electroanalítica, no pudo extenderse el rango de concentraciones ni ensayar muestras de suelo contaminadas.

### 3.5. Resultados y discusión

#### *Caracterización del suelo*

Las micrografías obtenidas en el análisis por MEB permiten observar la estructura del suelo contaminado con  $10000 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb (Figura 3.5.1). Se distinguen plagioclasas y minerales amorfos, cubiertos parcialmente con materia orgánica. El espectro del EDE permite apreciar el contenido de Pb en la muestra, con una señal mayor respecto de otros elementos, como Ca y K. También se observa el alto contenido de Si, Fe y Al ya descrito en la muestra control.

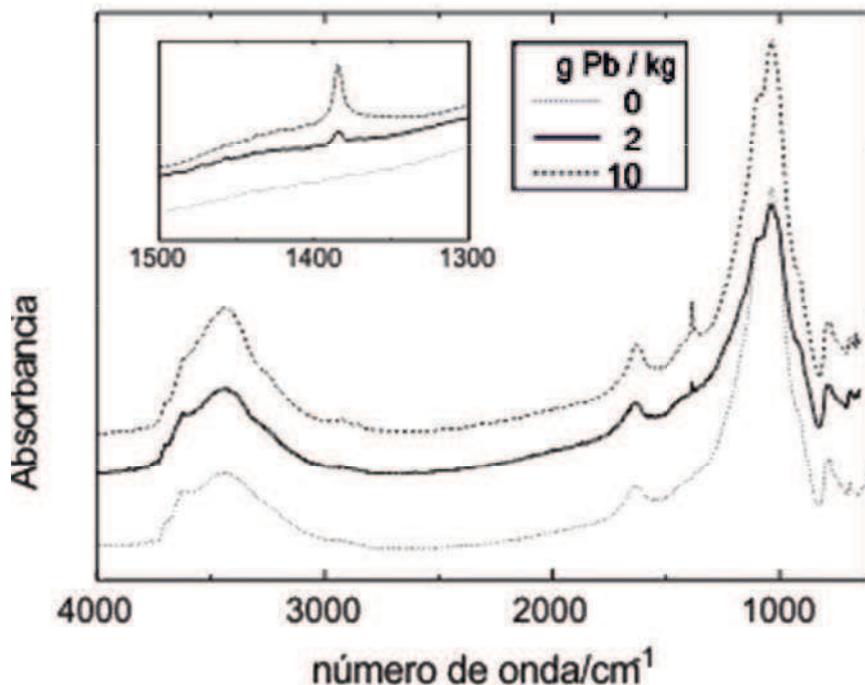


**Figura 3.5.1:** Micrografías MEB (A: aumento de 2000X, C: aumento 5000X) y EDE (B) de muestras de suelo con  $10000 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb, luego de 60 días de ocurrida la contaminación. Ensayo de verano.

## INTERACCIÓN DE Pb CON LOS COMPONENTES DEL SUELO

### Evolución en función del tiempo en un suelo pampeano

El espectro IR sobre muestras de suelo con 0, 2000 y 10000 mg kg<sup>-1</sup> de Pb se presenta en la Figura 3.5.2. Se observan los picos correspondientes a las interacciones entre el Pb (II) y los grupos carboxilatos de la materia orgánica del suelo (1384 cm<sup>-1</sup>). En el detalle de dicha Figura puede distinguirse un marcado incremento de la absorbancia que se corresponde con el aumento de la concentración del metal en la muestra. Esta interacción de los grupos carboxilatos con metales como Hg(II) y Pb(II) ya ha sido reportada anteriormente por otros autores (Orsetti, Quiroga, and Andrade 2006; Zhang et al. 2009). Las otras bandas que se observan en el espectro son típicas de estructuras de suelos, como se indicó en la Figura 2.4.7.



**Figura 3.5.2:** Espectro de IR de muestras de suelo con 0, 2000 y 10000 mg kg<sup>-1</sup> de Pb, luego de 60 días del agregado de la solución de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. El detalle muestra la región de 1300-1500 cm<sup>-1</sup>. Se observan las bandas asociadas a carboxilatos a 1384 cm<sup>-1</sup> y su incremento correspondiente con las concentraciones del metal.

#### *Extracción Secuencial Selectiva*

Los resultados de la ESS de Pb se muestran en la Figura 3.5.3, tanto para la temporada de invierno como de verano. Los valores se expresan como porcentajes del cociente entre el Pb extraído en una fracción dada (Fracción I: intercambiable, Fracción II: asociado a óxidos de Mn, Fracción III: asociado a MO, Fracción IV: asociado a óxidos de hierro y aluminio, Fracción V: mineral) y el total (sumatoria del Pb extraído en cada fracción). Las regresiones lineales muestran la evolución de la distribución del metal en relación a las fracciones definidas.

Sobre los resultados del ensayo de invierno se observó que la fracción V aumentó en tanto la fracción III decreció, las otras fracciones permanecieron constantes. Sobre el ensayo de verano se observó un comportamiento distinto: la fracción I tuvo un decrecimiento, mientras que las fracciones III, IV y V presentaron un leve incremento y la fracción II permaneció constante en el tiempo.

Sobre los gráficos de ambos ensayos y realizando un recorrido temporal se observó que la fracción IV fue la más importante, con valores de 50-60% del total de Pb. En el punto de partida, la fracción I fue la más baja en invierno, mientras que en verano fue la segunda con mayor contenido de Pb. Transcurridos los 60 días del experimento, la fracción V fue la segunda más importante en ambas temporadas, alcanzando un 20% de contenido de Pb.

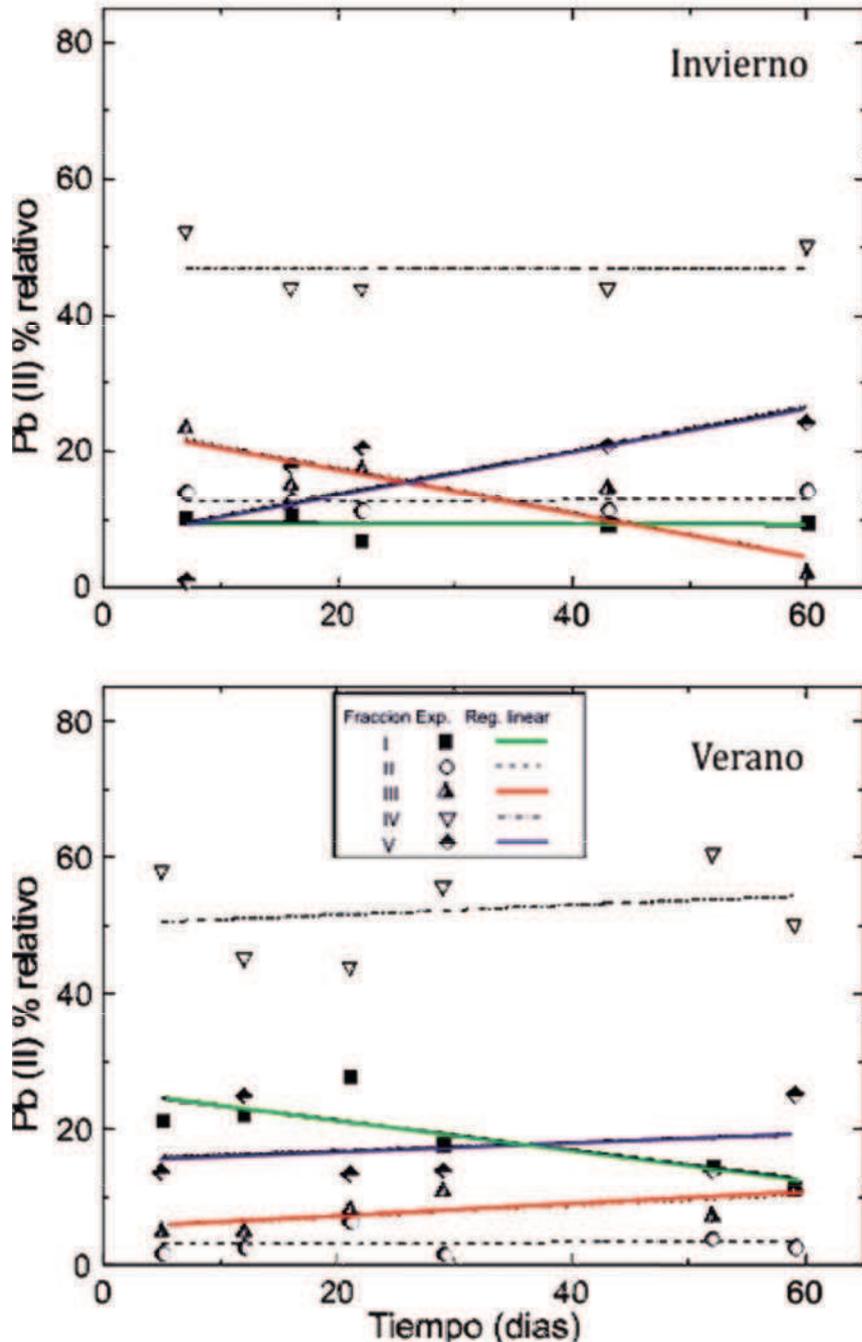
#### *Especiación del Pb y componentes del suelo*

Los resultados obtenidos muestran una alta proporción de Pb en la fracción IV (extractable mediante el buffer de oxalato), originalmente descrita como asociada a óxidos de Fe y Al, aunque en el presente estudio se ha encontrado una baja proporción de estos minerales. Los resultados se atribuyen entonces a Pb(II) adsorbido sobre cuarzos y aluminosilicatos, los cuales constituyen la mayor proporción de los minerales (como revelaron los análisis de DRX y MEB); también podría encontrarse una parte del metal adsorbida

## INTERACCIÓN DE Pb CON LOS COMPONENTES DEL SUELO

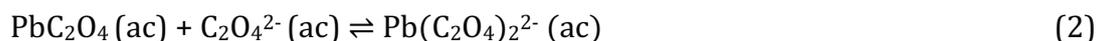
Evolución en función del tiempo en un suelo pampeano

sobre materiales amorfos. Esto se basa en que el ion oxalato ( $C_2O_4^{2-}$ ) es un fuerte complejante que permite la remoción de las especies metálicas adsorbidas.



**Figura 3.5.3:** Especiación de Pb en invierno y verano, de acuerdo a las fracciones definidas por la ESS ensayada. Se informan los valores medios.  $N_{\text{ensayo}}=2-3$ . Contenido de Pb total:  $200 \text{ mg kg}^{-1}$ . Las líneas indican regresiones lineales.

Las reacciones implicadas para la complejación del Pb(II) son:



La precipitación del oxalato de Pb podría alcanzarse, según:



Una estimación de la especiación de Pb(II), utilizando el programa Visual Minteq, de acuerdo a las reacciones (1)-(3) en presencia de ácido oxálico y oxalato de amonio (paso IV) muestra que la saturación de  $\text{PbC}_2\text{O}_4(\text{s})$  se alcanza a una concentración de Pb total de aproximadamente 0,8 mM, consecuentemente no debería ocurrir tal precipitación en las condiciones experimentales (0,965 mM si el Pb total inicial se disolviera totalmente en ese paso). Más aún: debido a que aproximadamente la mitad del total del Pb (100 mg kg<sup>-1</sup> en suelo) se encuentra en la fracción IV, debería resultar de la extracción con oxalato una concentración total de Pb(II) disuelto de aproximadamente  $5 \times 10^{-6}$  M; la concentración de equilibrio de Pb(II) libre resultó aproximadamente  $c = 1,9 \times 10^{-8}$  M, para las condiciones mencionadas. Dado este bajo valor, si el Pb está adsorbido a minerales se esperaría que, bajo estas condiciones, sea removido.

Considerando la situación con mayor nivel de detalle se observa que los principales minerales hallados son feldespatos y cuarzo. Ambos poseen una baja capacidad de adsorción, siendo el cuarzo el que tiene la menor capacidad (Wu et al. 2003). Los estudios de adsorción del Pb (y metales traza en general) sobre feldespatos son escasos. A continuación se analizan los casos de algunos aluminosilicatos con el fin de estimar la cantidad remanente de Pb adsorbido en equilibrio con la concentración  $c$  calculada arriba, en la fracción IV. En un estudio de adsorción de metales sobre minerales del suelo, con tamaño de partícula y propiedades consistentes con la fracción limosa (Frimmel and Huber 1996), la adsorción de Pb sobre cuarzo, ortoclasas y albitas (entre otros minerales) fue interpretada mediante la isoterma de Freundlich:

$$q = Kc^n \quad (4)$$

donde  $q$  es la cantidad de Pb adsorbido,  $K$  es el coeficiente de adsorción y  $n$  es un parámetro empírico; del ajuste de los parámetros (a pH = 8,4 como el empleado en el estudio citado) resulta que la cantidad de Pb adsorbido en presencia de oxalato en la fracción IV es: para cuarzo ( $K = 0,14 \text{ mmol kg}^{-1}$ ,  $n = 1,8$ )  $q \approx 0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ ; para ortoclasas ( $K = 0,17 \text{ mmol kg}^{-1}$ ,  $n = 1,2$ )  $q \approx 0,11 \text{ mg kg}^{-1}$  y para albita ( $K = 0,27 \text{ mmol kg}^{-1}$ ,  $n = 1,1$ )  $q \approx 0,26 \text{ mg kg}^{-1}$ . En otra investigación, Sepehrian et al. (Sepehrian et al. 2011) estudiaron la adsorción de Pb sobre aluminosilicatos mesoporosos (con un área superficial  $A = 834 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) interpretando los resultados en términos de la isoterma de Henry (ecuación (4) con  $n = 1$ ); de varios aluminosilicatos estudiados, el más adsorbente posee un  $K = 763 \text{ L kg}^{-1}$ . Por lo tanto, para el valor de  $c$  hallado anteriormente, este coeficiente predice una cantidad adsorbida  $q = 1,4 \times 10^{-6} \text{ mol kg}^{-1} \approx 0,1 \text{ mg kg}^{-1}$  (determinado para las condiciones experimentales del presente trabajo, pH = 3,5). En todos los casos, el nivel de Pb(II) adsorbido es muy bajo frente al valor inicial ( $\sim 100 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Estas consideraciones apoyan la suposición de que el Pb(II) se encuentra mayormente desorbido en presencia del reactivo oxalato/ácido oxálico. Por lo tanto, puede concluirse que el contenido relativamente alto de Pb(II) hallado en la fracción IV proviene principalmente de especies adsorbidas sobre silicatos y/o sobre otras fases sólidas amorfas.

Otro hecho a destacar es la diferencia observada en la fracción II en las temporadas estudiadas, siendo ésta mayor en el caso del experimento de invierno; también, puede observarse que las sumas de las fracciones II y IV en ambos casos es similar. El reactivo utilizado en el paso II contiene acetato de amonio 1 M, y el ion acetato puede coordinar iones  $Pb^{2+}$ , aunque con menor poder que el oxalato, por lo que puede remover las especies de Pb(II) débilmente unidas. Las diferencias de los resultados entre los ensayos de invierno y verano para la fracción II puede atribuirse al hecho de que, en verano, las condiciones de sequedad del suelo favorecieron la evolución desde formas débilmente adsorbidas (complejos de esfera externa) a formas más fuertemente adsorbidas (complejos de esfera interna), lo que deja en verano menos Pb(II) disponible para la complejación con acetato. En este sentido, la mayor parte del Pb se encuentra en formas relativamente estables y evolucionando a formas aún más estables, por lo que es de suponer que no se encontrarán biodisponibles. Un comportamiento similar al del Pb ha sido reportado para otros metales (Cajuste, Cruz - Díaz, and García - Osorio 2000; Shrivastava and Banerjee 2004; Zhao et al. 2009; Favas et al. 2011; Kabala et al. 2011).

#### *Efecto de las condiciones ambientales*

Las condiciones ambientales fueron diferentes entre los dos ensayos debido a la variabilidad estacional de la región. El efecto de esta variabilidad se consideró en función de dos parámetros: precipitación y temperatura. El uso de agua de riego del invernáculo permitió independizarse de la primera variable, pero la temperatura no fue controlada: entre los meses en que se realizaron ambos experimentos su valor medio varió alrededor de 10 °C (Tabla 3.1.1). Esto tuvo influencia en los procesos cíclicos de humedad-secado del suelo, provocando que durante el invierno el suelo permaneciera predominantemente húmedo, y en verano sufriera períodos de sequía. Debido a que todos los procesos químicos son más lentos e incluso pueden detenerse por la ausencia de agua, puede inferirse que la evolución de la especiación del Pb fue considerablemente más lenta durante el ensayo de verano respecto del de

invierno. Si se toma como referencia la fracción I (forma más lábil del Pb) se observa que en el experimento de verano decreció, mientras que las otras fracciones crecieron, indicando una progresiva incorporación del metal en formas minerales más estables. Durante el experimento de invierno el contenido de Pb en la fracción I permaneció estable, y la fracción III disminuyó en relación con el crecimiento de formas más estables (fracción V). Por lo tanto se considera que la evolución de la especiación del Pb observada durante los meses de verano corresponde a etapas iniciales del experimento de invierno, y que, en éste último, dicha evolución se ha desarrollado a una velocidad mayor. Estas evidencias se corroboran con el contenido de Pb determinado en la fracción I, donde el porcentaje observado en invierno es menor (casi en un 10%) que en el ensayo de verano, y se mantiene prácticamente constante.

### **3.6. Conclusiones**

La presencia de Pb en el suelo de estudio pudo observarse mediante EDE y espectroscopía IR, pudiendo caracterizar también la interacción del catión metálico con los grupos carboxilatos presentes en la materia orgánica del suelo.

La evolución de la especiación de Pb(II) en el tiempo estudiado muestra que el Pb(II) recientemente adicionado al suelo se adsorbe mayormente a la fracción mineral (con pequeñas cantidades distribuidas en formas soluble/intercambiable), pudiendo encontrarse asociado a formas reducibles, fijado en formas estables y asociado a material orgánica; estas últimas dos fracciones varían complementariamente en el tiempo a favor de la fracción mineral. De hecho es posible que parte de la proporción del metal hallada en la fracción extraíble con oxalato pudiese ser desplazada desde fracciones anteriores en el curso de la ESS, por adsorción por parte del Pb(II) liberado en los pasos II y III; desafortunadamente, al momento de realización del estudio, no hay información experimental que permita analizar este punto. Se verifica entonces la hipótesis *i*.

Comparando los resultados de los ensayos de invierno y de verano se observó que la especiación del Pb(II) es afectada por los procesos de evaporación de humedad del suelo. La temperatura ambiente es la variable que juega un rol de mayor importancia en dichos procesos. En verano la especiación del Pb(II) en el tiempo es más lenta, por lo que se considera que los resultados obtenidos para esas condiciones de humedad y temperatura se corresponden con la especiación del Pb en suelo en invierno inmediatamente después la incorporación de la sal de Pb al medio. Por lo tanto, la hipótesis *ii* resulta verdadera.

### 3.7. Bibliografía

- Cajuste, L.J., J. Cruz - Díaz, and C. García - Osorio. 2000. "Extraction of Heavy Metals from Contaminated Soils: I. Sequential Extraction in Surface Soils and Their Relationships to DTPA Extractable Metals and Metal Plant Uptake." *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 35 (7): 1141–52. doi:10.1080/10934520009377024.
- Favas, Paulo J.C., João Pratas, M. Elisa P. Gomes, and V. Cala. 2011. "Selective Chemical Extraction of Heavy Metals in Tailings and Soils Contaminated by Mining Activity: Environmental Implications." *Journal of Geochemical Exploration* 111 (3): 160–71. doi:10.1016/j.gexplo.2011.04.009.
- Frimmel, F.H., and L. Huber. 1996. "Influence of Humic Substances on the Aquatic Adsorption of Heavy Metals on Defined Mineral Phases." *Environment International* 22 (5): 507–17. doi:10.1016/0160-4120(96)00040-2.
- Gustafsson, Jon Petter. 2011. *Visual Minteq* (version 3.0). Visual Basic. Stockholm, Sweden: KTH, Department of Land and Water Resources Engineering.
- Jensen, Pernille E., Lisbeth M. Ottosen, and Anne J. Pedersen. 2006. "Speciation Of Pb In Industrially Polluted Soils." *Water, Air, and Soil Pollution* 170 (1-4): 359–82. doi:10.1007/s11270-005-9008-7.
- Kabala, Cezary, Anna Karczewska, Katarzyna Szopka, and Jaroslaw Wilk. 2011. "Copper, Zinc, and Lead Fractions in Soils Long-Term Irrigated with Municipal Wastewater." *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 42 (8): 905–19. doi:10.1080/00103624.2011.558960.
- Kaplan, O., and M. Yaman. 2009. "Selective and Sequential Extraction of Lead in Soil Samples and Plant Parts Taken from a Serpentine and Copper Mining Area." *Atomic Spectroscopy* 30 (1): 1–9.
- Karak, Tanmoy, Pradip Bhattacharyya, Ranjit Kumar Paul, and D.K. Das. 2013. "Metal Accumulation, Biochemical Response and Yield of Indian Mustard Grown in Soil Amended with Rural Roadside Pond Sediment." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 92 (June): 161–73. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.03.019.
- Liu, Donghua, Wusheng Jiang, Changjun Liu, Changhong Xin, and Wenqiang Hou. 2000. "Uptake and Accumulation of Lead by Roots, Hypocotyls and Shoots of Indian Mustard [Brassica Juncea (L.).]" *Bioresource Technology* 71 (3): 273–77.
- Magrisso, Sagi, Shimshon Belkin, and Yigal Erel. 2009. "Lead Bioavailability in Soil and Soil Components." *Water, Air, and Soil Pollution* 202 (1-4): 315–23. doi:10.1007/s11270-009-9978-y.
- Malandrino, Mery, Ornella Abollino, Sandro Buoso, Agnese Giacomino, Carmela La Gioia, and Edoardo Mentasti. 2011. "Accumulation of Heavy Metals from Contaminated Soil to Plants and Evaluation of Soil Remediation by Vermiculite." *Chemosphere* 82 (2): 169–78. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.10.028.
- Ma, Y. B., and N. C. Uren. 1998. "Transformations of Heavy Metals Added to Soil -- Application of a New Sequential Extraction Procedure." *Geoderma* 84 (1-3): 157–68. doi:10.1016/S0016-7061(97)00126-2.
- Ndzangou, Sabary Omer, Marc Richer-LaFlèche, and Daniel Houle. 2006. "Anthropogenic Pb Accumulation in Forest Soils from Lake Clair Watershed:

- Duchesnay Experimental Forest (Québec, Canada).” *Applied Geochemistry* 21 (12): 2135–47. doi:10.1016/j.apgeochem.2006.06.018.
- Orroño, Daniela I., and Raúl S. Lavado. 2009. “Distribution of Extractable Heavy Metals in Different Soil Fractions.” *Chemical Speciation and Bioavailability* 21 (4): 193–98. doi:10.3184/095422909X12473204137916.
- Orroño, Daniela I., V. Schindler, and Raúl S. Lavado. 2012. “Heavy Metal Availability in Pelargonium Hortorum Rhizosphere: Interactions, Uptake and Plant Accumulation.” *Journal of Plant Nutrition* 35 (9): 1374–86. doi:10.1080/01904167.2012.684129.
- Orsetti, S., M. M. Quiroga, and E.M. Andrade. 2006. “Binding of Pb(II) in the System Humic Acid/goethite at Acidic pH.” *Chemosphere* 65 (11): 2313–21.
- Padmavathiamma, Prabha K., and Loretta Y. Li. 2010. “Phytoavailability and Fractionation of Lead and Manganese in a Contaminated Soil after Application of Three Amendments.” *Bioresource Technology* 101 (14): 5667–76. doi:10.1016/j.biortech.2010.01.149.
- Rodriguez, J.H., M.J. Salazar, L. Steffan, M.L. Pignata, J. Franzaring, A. Klumpp, and A. Fangmeier. 2014. “Assessment of Pb and Zn Contents in Agricultural Soils and Soybean Crops near to a Former Battery Recycling Plant in Córdoba, Argentina.” *Journal of Geochemical Exploration* 145: 129–34. doi:10.1016/j.gexplo.2014.05.025.
- Salazar, M.J., J.H. Rodriguez, G.L. Nieto, and M.L. Pignata. 2012. “Effects of Heavy Metal Concentrations (Cd, Zn and Pb) in Agricultural Soils near Different Emission Sources on Quality, Accumulation and Food Safety in Soybean [Glycine Max (L.) Merrill].” *Journal of Hazardous Materials* 233-234: 244–53. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.07.026.
- Sepehrian, Hamid, Ramin Cheraghali, Hojjat alla Abdi, and Peyman Rezaei. 2011. “Adsorption Studies of Lead on Modified Mesoporous Al-MCM-41.” *Ion Exchange Letters* 4: 1–6. doi:10.3260/iel.2011.03.001.
- Shahid, M., E. Pinelli, and C. Dumat. 2012. “Review of Pb Availability and Toxicity to Plants in Relation with Metal Speciation; Role of Synthetic and Natural Organic Ligands.” *Journal of Hazardous Materials* 219–220 (June): 1–12. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.01.060.
- Shrivastava, Sujeet K., and Dipak K. Banerjee. 2004. “Speciation of Metals in Sewage Sludge and Sludge-Amended Soils.” *Water, Air, and Soil Pollution* 152 (1-4): 219–32. doi:10.1023/B:WATE.0000015364.19974.36.
- Wierzbicka, M., and D. Antosiewicz. 1993. “How Lead Can Easily Enter the Food Chain — a Study of Plant Roots.” *Science of The Total Environment*, Proceedings of the 2nd European Conference on Ecotoxicology, 134, Supplement 1: 423–29. doi:10.1016/S0048-9697(05)80043-9.
- Wright, R. J., and T. Stuczynski. 1996. “Atomic Absorption and Flame Emission Spectrometry.” In *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*, edited by Donald L. Sparks, 65–90. Soil Science Society of America Book Series 5. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy-Soil Science Society of America.
- Wu, Zhenghua, Zhimang Gu, Xiaorong Wang, Les Evans, and Hongyan Guo. 2003. “Effects of Organic Acids on Adsorption of Lead onto Montmorillonite, Goethite and Humic Acid.” *Environmental Pollution* 121 (3): 469–75. doi:10.1016/S0269-7491(02)00272-5.

- Yang, Jianjun, Shaoping Hu, Xincan Chen, Mingge Yu, Jin Liu, Hang Li, Chaofeng Shen, Jiyan Shi, and Yingxu Chen. 2010. "Transformation of Lead Solid Fraction in the Rhizosphere of *Elsholtzia Splendens*: The Importance of Organic Matter." *Water, Air, and Soil Pollution* 205 (1-4): 333–42. doi:10.1007/s11270-009-0077-x.
- Youssef, Refat A., and Mitsuo Chino. 1989. "Root-Induced Changes in the Rhizosphere of Plants. I. pH Changes in Relation to the Bulk Soil." *Soil Science and Plant Nutrition* 35 (3): 461–68. doi:10.1080/00380768.1989.10434779.
- Zhang, J., J. Dai, R. Wang, F. Li, and W. Wang. 2009. "Adsorption and Desorption of Divalent Mercury (Hg<sup>2+</sup>) on Humic Acids and Fulvic Acids Extracted from Typical Soils in China." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 335 (1-3): 194–201.
- Zhao, Xingmin, Deming Dong, Xiuyi Hua, and Shuofei Dong. 2009. "Investigation of the Transport and Fate of Pb, Cd, Cr(VI) and As(V) in Soil Zones Derived from Moderately Contaminated Farmland in Northeast, China." *Journal of Hazardous Materials* 170 (2–3): 570–77. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.05.026.

**PARTE III.**

**ESPECIACIÓN DE Pb EN**

**CULTIVO DE *BRASSICA NAPUS***

**Y**

**SU EFECTO SOBRE LA PLANTA**

## **4. ESPECIACIÓN DE Pb**

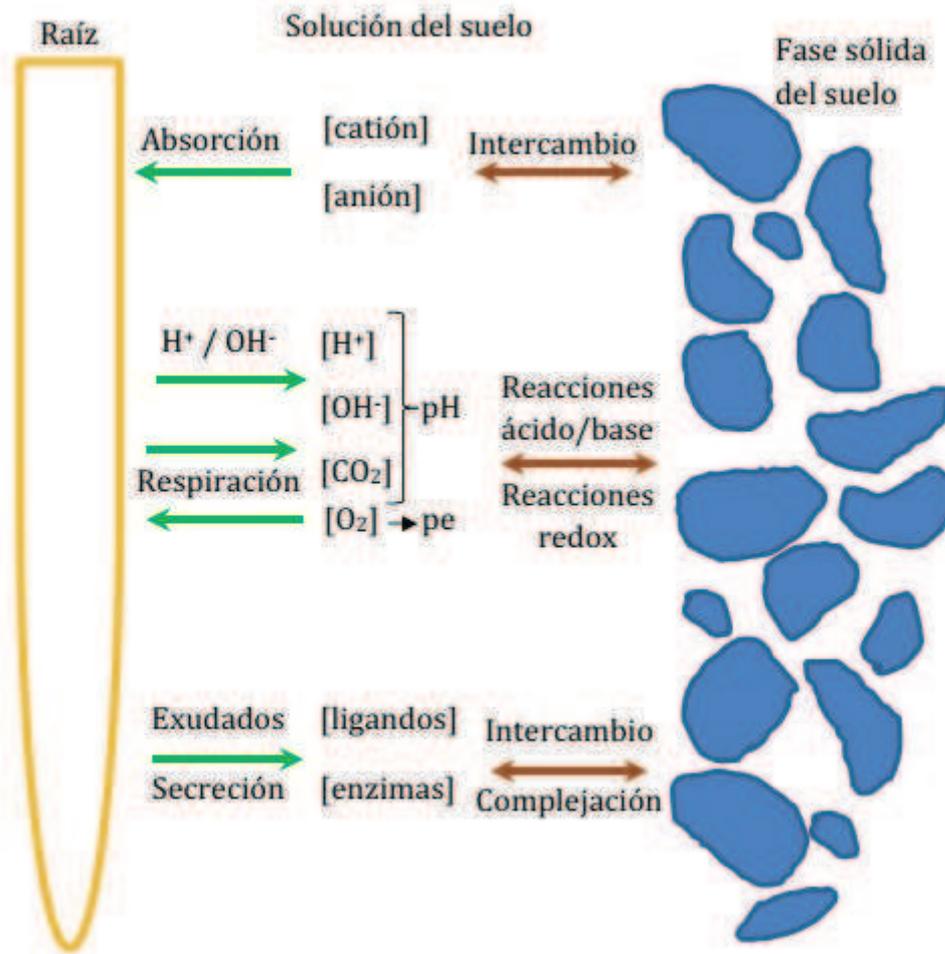
**EN SUELO RIZOSFÉRICO Y NO RIZOSFÉRICO**

**EN CULTIVO DE *BRASSICA NAPUS***

#### 4.1. Introducción

##### *La rizosfera: interacción entre la raíz y el suelo*

La rizosfera, definida como el ecosistema del suelo que rodea la raíz y se expande unos milímetros de ésta, posee características físicas y químicas distintas a las del volumen de suelo en el que no hay presencia de raíces. Es de amplio conocimiento que distintas funciones biológicas de las raíces, como absorción de nutrientes, respiración y exudación, pueden alterar considerablemente las propiedades químicas de la rizosfera: concentración de nutrientes, concentración de elementos tóxicos, complejación de compuestos, pH y potencial redox, entre otros (Figura 4.1.1) (Hinsinger et al. 2005). En diversos trabajos se estudiaron las variaciones en el pH, y se encontró un gradiente (positivo o negativo) entre el suelo rizosférico y el no rizosférico (Youssef y Chino 1989; Kim, Owens, y Kwon 2010; Orroño, Schindler, y Lavado 2012; Azimzadeh, Shirvani, y Shariatmadari 2014). El carbono orgánico disuelto (COD) presentó un gradiente negativo en función de la distancia desde la rizosfera (Azimzadeh, Shirvani, y Shariatmadari 2014); esto ha sido atribuido a que los ácidos orgánicos de bajo peso molecular, exudados por las raíces, contribuyen en una alta proporción al COD (Wenzel et al. 2001; Wang, Shan, y Zhang 2002). También se han descrito variaciones en la disponibilidad de nutrientes, como P, N, Ca, Mg, Mn y Na. Numerosos estudios muestran una zona de reducción de la concentración del P cerca de la raíz, para luego recuperarse con la distancia (Kuchenbuch y Jungk 1982), o gradientes dependientes de la absorción por las plantas y de la acidez del suelo para todos los nutrientes (Hinsinger y Gilkes 1996; Schöttelndreier y Falkengren-Grerup 1999). Estas variaciones, se encuentran afectadas directamente por los equilibrios ácido-base y reacciones de óxido-reducción (Hinsinger y Gilkes 1996; Schöttelndreier y Falkengren-Grerup 1999; Hinsinger 2001).



**Figura 4.1.1:** Representación esquemática de las funciones de la raíz asociadas a cambios en las propiedades químicas y bioquímicas en la rizosfera. Se observan procesos de adsorción-desorción de iones en el suelo, y absorción de iones por la planta; reacciones ácido base y redox en la superficie del suelo debido a cambios en las concentraciones de protones, oxidrilos, dióxido de carbono y oxígeno, asociados a la liberación de iones y respiración de la raíz; procesos de intercambio y complejación de ligandos y enzimas con partículas del suelo, producidos por la excreción y secreción de la raíz (Figura adaptada de Hinsinger et al. 2005).

#### *Acción de la rizosfera sobre la biodisponibilidad de metales pesados*

Las concentraciones de metales biodisponibles en el suelo también son afectadas por la rizosfera, debido a los cambios químicos y biológicos mencionados anteriormente. La cantidad de metal que se encuentre en la fracción intercambiable, como parte de lo biodisponible, es de importancia al momento de analizar la potencial acumulación de metales en plantas, además,

no todos los metales y especies vegetales interactúan del mismo modo (Lavado 2006; Lavado et al. 2007).

Se ha observado un decrecimiento en las solubilidades de Cu y Zn en suelo rizosférico de cebada, mientras que las concentraciones de Mn y Fe biodisponible aumentaron (Youssef y Chino 1989). Otros autores informaron variaciones en las solubilidades de Cr, Ni, Zn, Cu, Pb y Cd (Wang, Shan, y Zhang 2002; Kim, Owens, y Kwon 2010; Azimzadeh, Shirvani, y Shariatmadari 2014). Krishnamurti y colaboradores han estudiado ampliamente la relación entre la biodisponibilidad de Cu, Cd y Zn y las concentraciones de compuestos orgánicos en la rizosfera, concluyendo que los complejos de ácidos fúlvicos y metales aumentan la biodisponibilidad de estos últimos para las plantas (Krishnamurti y Naidu 2002; Krishnamurti et al. 2007).

En particular, la especiación de Pb ha sido estudiada en suelos rizosféricos de diversas especies de plantas. Yang et al. (Yang et al. 2010) han estudiado la especiación de Pb en la rizosfera de *Elsholtzia splendens* (familia Lamiaceae). Sus resultados indicaron un enriquecimiento de la materia orgánica en la rizosfera debido a la actividad microbiana y a los exudados de la planta, lo cual produce un aumento en las concentraciones de Pb asociado a ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y compuestos orgánicos, con un potencial aumento en las cantidades de Pb biodisponible a largo plazo. Resultados similares se han observado en la rizosfera de trigo en suelos irrigados con agua con altas concentraciones de Pb (Khan et al. 2006). Pocos autores han estudiado el efecto de la rizosfera de *Brassica napus* en la especiación de Pb, y no se han encontrado antecedentes de estos estudios en suelos pampeanos. Azimzadeh et al (Azimzadeh, Shirvani, y Shariatmadari 2014) estudiaron la especiación de Pb en suelos arcillosos en las rizosferas de *B. napus*, *Zea mays* y ambas especies asociadas; encontraron que el agregado de abono orgánico aumenta la concentración de Pb en fracciones asociadas a carbonatos, materia orgánica e intercambiable, debido al aumento de COD, aumentando así su biodisponibilidad para las plantas.

Por todo lo dicho, es de importancia considerar el suelo rizosférico al momento de estudiar la especiación de un metal y su biodisponibilidad (Wang, Shan, y Zhang 2002).

#### 4.2. Objetivos

i) Estudiar el efecto de la rizosfera de *Brassica napus* en el contenido de Pb en suelo, discriminando el medio rizosférico del no asociado a la rizosfera.

ii) Evaluar el contenido de Pb en el suelo rizosférico y no rizosférico de *Brassica napus* en las fracciones: intercambiable/biodisponible, asociado a materia orgánica, y mineral.

iii) Analizar ambos efectos en dos etapas ontogénicas de *B. napus*: al inicio de la fructificación (IFr) y en la madurez fisiológica (MF).

#### 4.3. Hipótesis

Las hipótesis planteadas para los objetivos propuestos en este capítulo son:

i) El contenido de Pb en suelo en las fracciones intercambiable-biodisponible, asociado a materia orgánica y mineral, es afectado por la rizosfera de *Brassica napus*.

ii) El contenido de Pb en suelo rizosférico y no rizosférico de *Brassica napus* varía entre las etapas ontogénicas IFr y MF de la planta.

#### 4.4. Materiales y Métodos

##### *Suelo*

Para el bioensayo de cultivo de *Brassica napus* se realizaron los tratamientos que se describen a continuación:

## ESPECIACIÓN DE Pb EN SUELO RIZOSFÉRICO Y NO RIZOSFÉRICO

### Cultivo en invernáculo de *Brassica napus*

- Suelo control (C0): sin agregado de Pb, Argiudoll Vértico (Gonzalez, Cruzate, y Panigatti 2013) proveniente de la localidad de Solís (ver Capítulo 2 de esta tesis).

- Suelo contaminado recientemente (CR): al suelo control se lo dejó secar a temperatura ambiente, luego se le agregó  $Pb(NO_3)_2$  en solución inmediatamente antes del montaje de las macetas, de manera de obtener suelos con concentraciones de 50, 100 y 200  $mg\ kg^{-1}$  de Pb.

- Suelo con contaminación preestablecida de Pb (CP): la presencia de Pb se debe a la disolución de municiones de Pb provenientes de actividades de caza furtiva; las muestras se colectaron en el centro-este de la Provincia de Santa Fe; las concentraciones del metal en el suelo fueron 17 y 32  $mg\ kg^{-1}$ . El suelo es un Natraqualf Típico y sus características se presentan en la Tabla 4.4.1 (<http://geointa.inta.gov.ar/visor/>).

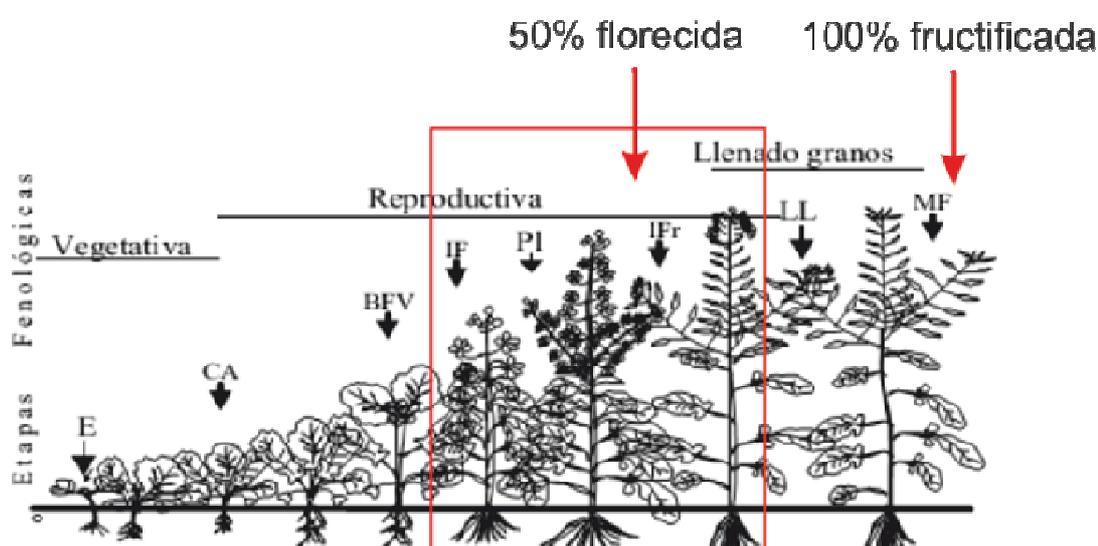
Previo a la disposición de los suelos en macetas los mismos fueron homogeneizados mediante cuarteo.

**Tabla 4.4.1:** Características fisicoquímicas de un Natraqualf Típico. CIC: Capacidad de Intercambio Catiónico.

<b>Características del suelo (Clasificación de USDA Soil taxonomy)</b>	<b>Natraqualf Típico</b>
pH (agua 1:2.5)	10,2
CIC (cmol/kg)	12,6
CaCO <sub>3</sub> %	1,1
Materia Orgánica %	0,82
Arcilla %	15,0
Limo %	50,5
Arena %	34,5

*Brassica napus*

Las semillas de *Brassica napus* utilizadas corresponden a la variedad Legacy, cultivar primaveral, del semillero Don Atilio. Las mismas no recibieron ningún tratamiento previo a la siembra. El desarrollo fenológico y las etapas ontogénicas de colza se describieron según la escala indicada por Miralles (Miralles, Windauer, y Gómez 2003), las cuales se representan en la Figura 4.4.1. Para la estimación de la fecha de siembra se tuvieron en cuenta los datos informados por la Red de Colza (Coll 2011) campaña 2011 (Tabla 4.4.2).



**Figura 4.4.1:** Desarrollo fenológico de la colza-canola. Se indican las distintas etapas ontogénicas: (E) emergencia, (CA) cambio de ápice, (BFV) botón floral visible, (IF) inicio de floración, (PI) plena floración, (IFr) inicio de fructificación, (LL) inicio de llenado de granos, (MF) madurez fisiológica. Las flechas rojas señalan los momentos de muestreo. El recuadro señala la ventana crítica para la definición del rendimiento. Extraído de Miralles, 2003.

**Tabla 4.4.2:** Información experimental sobre cultivar de primavera de *Brassica napus* (Colza) de las estaciones experimentales Barrow y Paraná de INTA, campaña 2011.

Estación experimental	Fecha de siembra	Fecha de emergencia	Evaluación fenológica (días desde)			Rendimiento (kg ha <sup>-1</sup> )
			Em - IF	IF - MF	Ciclo total	
CEI Barrow	16/mayo	10/junio	103	59	162	2344
EEA Paraná	12/mayo	Sin datos	103	45	148	2486

#### *Dispositivo experimental*

El cultivo de *Brassica napus* se realizó en macetas en invernáculo, con condiciones de temperatura, luz y humedad ambientales. Se utilizaron macetas plásticas de 3 L de capacidad. Las mismas se acondicionaron con un dispositivo denominado *rizopot*, que constó de una malla plástica revestida por una malla de nylon (Figura 4.4.2), y cuyo fin fue separar el suelo rizosférico (Riz) del suelo no rizosférico (NoR). Dentro de las macetas se colocaron 2 kg de suelo según el tratamiento correspondiente, dentro y fuera del *rizopot* (Figura 4.4.3).

En los tratamientos C0 y CR se prepararon 10 réplicas, mientras que en los tratamientos CP el volumen de suelo obtenido sólo permitió preparar 4 y 6 réplicas para las concentraciones de 17 y 32 mg kg<sup>-1</sup> de Pb, respectivamente. El diagrama de los tratamientos realizados y sus réplicas se muestran en la Tabla 4.4.3.

Luego se sembraron cuatro semillas de *Brassica napus* por maceta. Para ello se colocaron pequeños tubos de papel en el suelo dentro del *rizopot*, se los llenó de suelo control y se colocaron las semillas a 1 cm de profundidad aproximadamente. Todas las macetas se regaron con agua destilada al 30% de la capacidad de campo del suelo inmediatamente después del montaje del ensayo. Posteriormente, durante todo el cultivo, se regaron con 70 o 100 ml de agua destilada, de acuerdo a la demanda hídrica de las plantas y manteniendo el suelo con humedad aproximadamente constante.

Una vez que las plántulas adquirieron un número de cuatro hojas, se las raleó, dejando finalmente una planta por maceta.

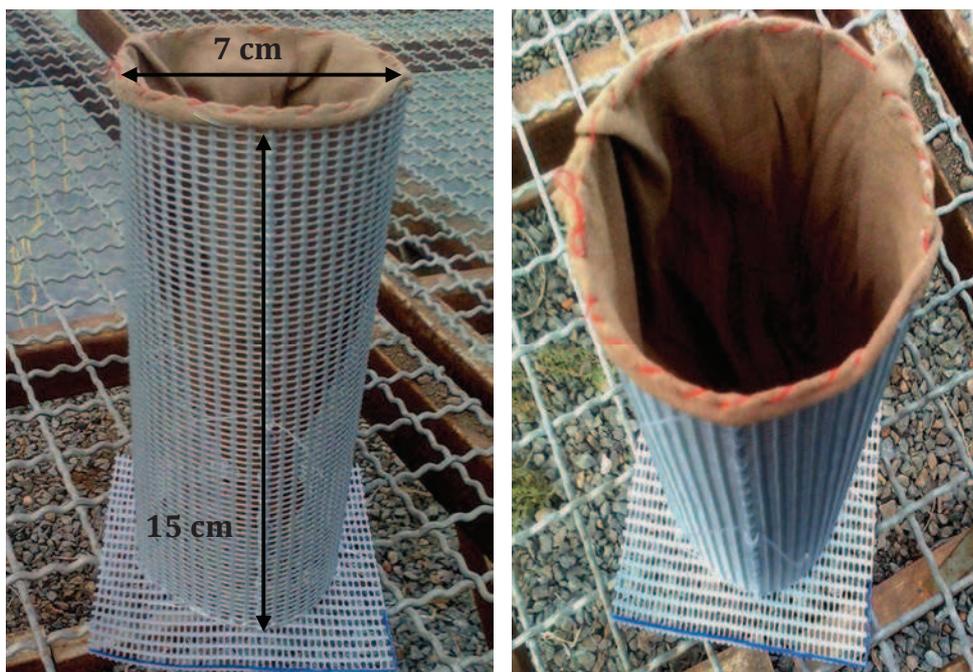
Todas las herramientas utilizadas para el montaje del ensayo fueron de plástico, para evitar contaminaciones del material.

ESPECIACIÓN DE Pb EN SUELO RIZOSFÉRICO Y NO RIZOSFÉRICO

Cultivo en invernáculo de *Brassica napus*

**Tabla 4.4.3:** Tratamientos realizados en el ensayo de especiación de Pb en suelo en cultivo de *B. napus*. Para cada tratamiento se indica el suelo utilizado y el número de réplicas.

Suelo utilizado	Tratamiento	Nro. de réplicas
Argiudol Vértico, Pcia. Bs. As., sin Pb	C0, 0 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	10
Argiudol Vértico, Pcia. Bs. As., con Pb	CR, 50 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	10
Argiudol Vértico, Pcia. Bs. As., con Pb	CR, 100 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	10
Argiudol Vértico, Pcia. Bs. As., con Pb	CR, 200 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	10
Natracualf Típico, Pcia. Sta. Fe, con Pb	CP, 17 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	4
Natracualf Típico, Pcia. Sta. Fe, con Pb	CP, 32 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	6



**Figura 4.4.2:** Rizopot, confeccionado con malla plástica y malla de nylon. Se muestran el diámetro y la altura.



**Figura 4.4.3:** Maceta con suelo y rizopot. Las semillas se encuentran sembradas dentro del rizopot.

## ESPECIACIÓN DE Pb EN SUELO RIZOSFÉRICO Y NO RIZOSFÉRICO

### Cultivo en invernáculo de *Brassica napus*

#### *Siembra, cultivo y muestreo*

Teniendo en cuenta la información agronómica sobre *B. napus*, las semillas se sembraron el 31 de mayo. Posteriormente se realizaron dos cosechas, tomando la mitad de las réplicas en cada una de ellas. La primera se realizó entre el 4 y el 13 de septiembre (100 días luego de la siembra, en promedio), en la etapa ontogénica inicio de fructificación (IFr), con las plantas en un 50% florecidas; la segunda se realizó entre el 9 de octubre y el 1ro de noviembre (140 días luego de la siembra, en promedio), durante la etapa ontogénica madurez fisiológica (MF), con el 100% de llenado de granos. Las fechas relacionadas con las etapas fenológicas del cultivo se muestran en la Tabla 4.4.4.

En todos los casos se recuperó y separó suelo rizosférico del no rizosférico, así como los distintos órganos de la planta para estudios posteriores (Capítulos 5 y 6). El suelo obtenido de cada maceta se secó en estufa a 70 ° C durante 72 h. Se conservó en contenedores plásticos.

**Tabla 4.4.4:** Información experimental sobre el cultivo de *Brassica napus*. Em: emergencia, IF: Iniciación de la floración, MF: madurez fisiológica.

Localización Invernáculo	Fecha de siembra	Fecha de emergencia	Evaluación fenológica (días desde)		
			Em - IF	IF - MF	Ciclo total
Facultad de Agronomía UBA	31/may	13/jun	79	60	139

#### *Determinación total de Pb en suelo Riz y NoR*

Se determinó el contenido total de Pb en las etapas ontogénicas IFr y MF para los suelos CR-200.

Del suelo rizosférico y no rizosférico obtenido de cada maceta, se separaron submuestras de 1 g mediante el método del cuarteo. El contenido de Pb se determinó mediante espectrometría de absorción atómica (EAA) en llama de aire/acetileno luego de digestión ácida (Wright y Stuczynski 1996) utilizando un equipo Shimadzu AA 6800.

#### *Extracción Secuencial Selectiva*

Se analizó la especiación del Pb mediante ESS, según el método seleccionado (Ma y Uren 1998) con las modificaciones descritas en el Capítulo 2. Para este ensayo el método fue acotado a tres fracciones, definidas operacionalmente como: (IC) intercambiable, correspondiente a FI del método descrito en la Tabla 2.5.2; (MO) asociado a materia orgánica, correspondiente a FII y FIII del mismo método; (MI) mineral, correspondiente a FIV y FV del mismo método. Estas tres fracciones son las de mayor relevancia para el bioensayo diseñado y el posterior estudio sobre bioacumulación.

Sobre las muestras de suelo CR-200 correspondientes a las etapas ontogénicas IFr y MF, se realizaron las extracciones por sextuplicado. Además, se realizó la extracción sobre los suelos CP-17 y CP-32, por duplicado, al inicio del ensayo a modo de caracterización. El contenido de Pb se determinó como se especificó en la sección anterior.

#### *Reactivos*

Para la preparación de soluciones y lavados se utilizó agua ultra pura de un sistema Millipore MilliQ. Las sales y soluciones son de grado analítico.

### *Estadística*

Se utilizó el programa GraphPad Prism 5, con el que se obtuvieron los datos estadísticos descriptivos y se realizaron pruebas de ANOVA de dos vías y pruebas *post hoc* de Bonferroni.

## 4.5. Resultados y discusión

### *Efectividad del rizopot*

El uso del rizopot no resultó 100% efectivo para la contención de la raíz. Raíces laterales de diámetro muy pequeño lograron traspasar la barrera de nylon y plástico. En la Figura 4.5.1 se muestra el desarrollo de la raíz, dentro y fuera del rizopot, en la etapa ontogénica IFr (aproximadamente a los 90 días de la emergencia de los brotes). De todos modos, el efecto de la raíz sobre el suelo NoR se considera despreciable frente al efecto de la raíz en el suelo Riz, dada la relación entre la superficie de la raíz y el volumen del suelo en cada compartimento.

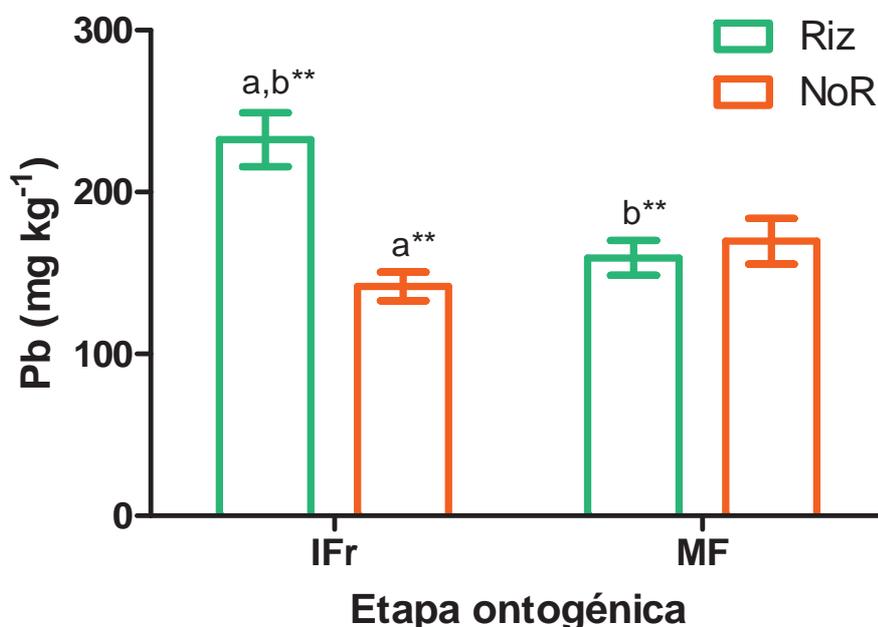


**Figura 4.5.1:** Imágenes del suelo fuera del rizopot, con la presencia de raíces laterales. En la foto de la derecha se muestra la raíz contenida dentro del rizopot.

*Contenido de Pb total*

El contenido total de Pb en suelo se estudió en función de la etapa ontogénica y de su relación con la rizosfera (Figura 4.5.2). En la etapa IFr el contenido medio de Pb en suelo rizosférico resultó de  $233 \pm 17$  mg kg<sup>-1</sup> (N = 3), mientras que en suelo no rizosférico fue de  $142 \pm 9$  mg kg<sup>-1</sup> de Pb (N = 3). En la etapa MF, el contenido de Pb determinado en suelo rizosférico fue de  $159 \pm 11$  mg kg<sup>-1</sup> (N = 4) y en suelo no rizosférico de  $170 \pm 14$  mg kg<sup>-1</sup> de Pb (N = 4). La interacción entre el suelo Riz o NoR y las etapas IFr o MF, resultó estadísticamente significativa ( $p < 0,005$ ) para las diferencias halladas entre las medias (Ntotal = 14). En la etapa IFr el contenido de Pb en suelo Riz fue significativamente mayor que en suelo NoR ( $p < 0,01$ , prueba *post hoc* de Bonferroni). En la etapa MF no se hallaron diferencias entre el suelo Riz y NoR.

Además, el contenido total de Pb en suelo Riz en la etapa IFr fue significativamente mayor que el contenido hallado en suelo Riz en la etapa MF ( $p < 0,01$ , prueba *post hoc* de Bonferroni).

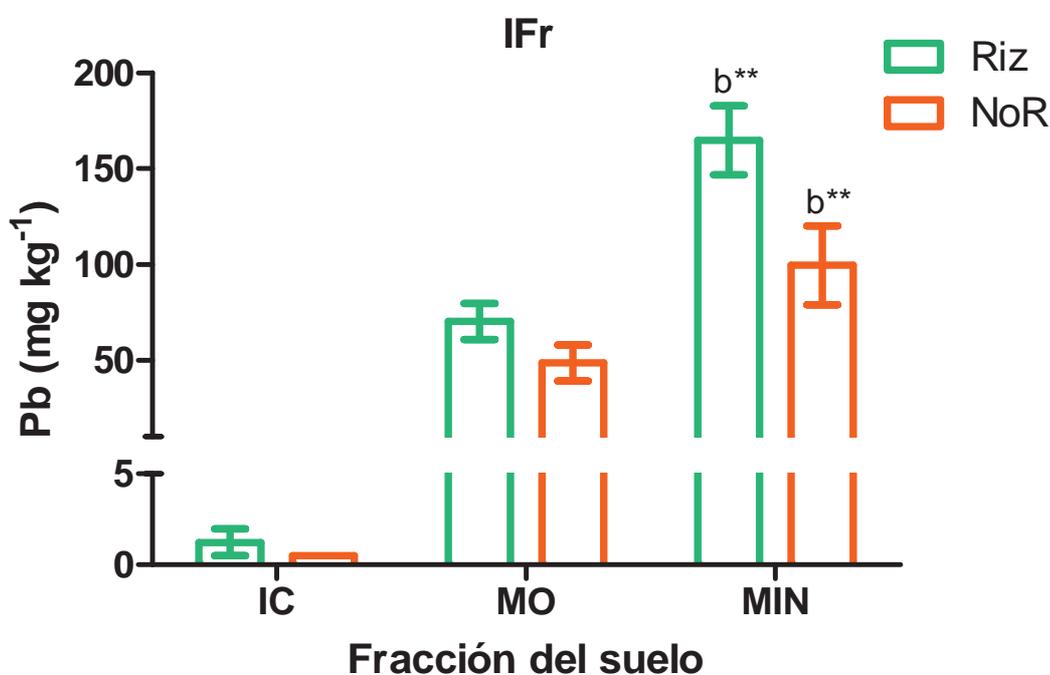


**Figura 4.5.2:** Contenido medio de Pb total y su error estándar en suelo Riz y NoR en las etapas ontogénicas IFr (Ntotal = 6) y MF (Ntotal = 8). Letras iguales señalan tratamientos con diferencias estadísticamente significativas y \*\* señala  $p < 0,01$ .

*Extracción Secuencial Selectiva*

En la Figura 4.5.3 se muestran los resultados correspondientes a la etapa IFr del tratamiento con  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb en suelo CR ( $N_{\text{total}} = 18$ ). La interacción entre el suelo Riz/NoR y las fracciones del suelo no resultó estadísticamente significativa.

En particular, en las fracciones IC y MO no se encontraron diferencias significativas entre el suelo rizosférico y no rizosférico, mientras que en la fracción MIN el contenido de Pb en suelo Riz fue significativamente mayor que en suelo NoR ( $p < 0,01$ ). Además el contenido de Pb en las distintas fracciones resultó en el siguiente orden:  $\text{IC} < \text{MO} < \text{MIN}$ . Los valores medios y su error estándar junto a los resultados estadísticos de las comparaciones realizadas se muestran en la Tabla 4.5.1. Es importante destacar que se determinó la presencia de Pb en la fracción IC, intercambiable; es decir que en esta etapa inicial del bioensayo (IFr) aún se encontraba Pb biodisponible en el suelo rizosférico.



**Figura 4.5.3:** Contenido medio de Pb, y su error estándar, en suelo Riz y NoR en las fracciones IC, MO y MIN. Etapa ontogénica IFr.  $N_{\text{total}} = 18$ . \*\* señala  $p < 0,01$ .

ESPECIACIÓN DE Pb EN SUELO RIZOSFÉRICO Y NO RIZOSFÉRICO

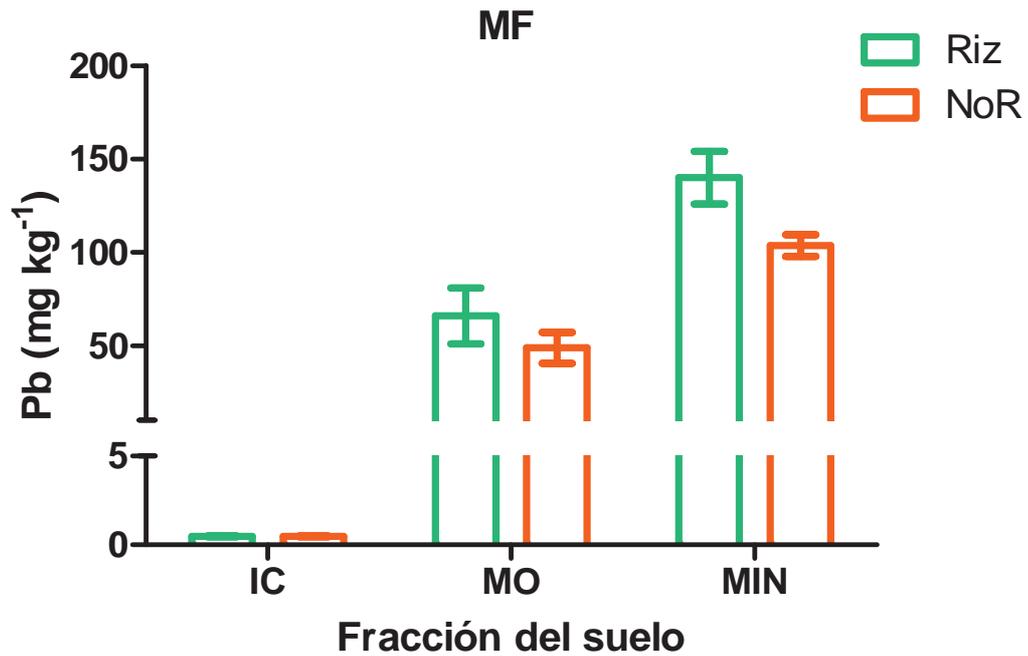
Cultivo en invernáculo de *Brassica napus*

**Tabla 4.5.1:** Resultados estadísticos de las comparaciones del contenido medio de Pb en suelo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en fracciones de la ESS. Suelos CR-200, Riz y NoR. Etapa ontogénica IFr. Se informan valores medios  $\pm$  error estándar (excepto en IC NoR donde se informa error instrumental). Ntotal = 18. ns: diferencias no significativas.

	<b>IC Riz</b> 1,2 $\pm$ 0,7	<b>MO Riz</b> 70 $\pm$ 9	<b>MIN Riz</b> 164 $\pm$ 18	<b>IC NoR</b> 0,50 $\pm$ 0,03	<b>MO NoR</b> 49 $\pm$ 9	<b>MIN NoR</b> 100 $\pm$ 21
<b>IC Riz</b> 1,2 $\pm$ 0,7		** p < 0,01	*** p < 0,001	ns		
<b>MO Riz</b> 70 $\pm$ 9	** p < 0,01		*** p < 0,001		ns	
<b>MIN Riz</b> 164 $\pm$ 18	*** p < 0,001	*** p < 0,001				** p < 0,01
<b>IC NoR</b> 0,50 $\pm$ 0,03	ns				* p < 0,05	*** p < 0,001
<b>MO NoR</b> 48 $\pm$ 9		ns		* p < 0,05		* p < 0,05
<b>MIN NoR</b> 100 $\pm$ 21			** p < 0,01	*** p < 0,001	* p < 0,05	

En la Figura 4.5.4 se muestra el contenido de Pb en las distintas fracciones de suelo CR-200, obtenida por ESS, para las muestras correspondientes a la etapa ontogénica MF (Ntotal = 18). Las variaciones encontradas entre las fracciones fueron estadísticamente iguales para el suelo Riz y el NoR; las variaciones en el contenido de Pb entre el suelo Riz y NoR fueron estadísticamente iguales en cada fracción analizada. En el suelo Riz, las comparaciones entre las fracciones IC, MO y MIN presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$  en todos los casos). En el suelo NoR, la fracción IC tuvo diferencias estadísticamente significativas con las fracciones MO y MIN ( $p < 0,001$ ), mientras que el contraste entre las fracciones MO y MIN también arrojó diferencias significativas ( $p < 0,01$ ). La presencia y distribución del catión metálico en las fracciones analizadas se dispuso en el mismo orden

que en la etapa ontogénica IFr, con excepción de la fracción intercambiable, que resultó no detectable. Los valores medios y su error estándar junto a los resultados estadísticos de las comparaciones realizadas se muestran en la Tabla 4.5.2.



**Figura 4.5.4:** Contenido medio de Pb, y su error estándar, en suelo rizosférico (Riz) y no rizosférico (NoR) sobre las fracciones biodisponible e intercambiable (IC), asociada a materia orgánica (MO) y mineral (MIN). Etapa ontogénica MF. N = 3.

## ESPECIACIÓN DE Pb EN SUELO RIZOSFÉRICO Y NO RIZOSFÉRICO

### Cultivo en invernáculo de *Brassica napus*

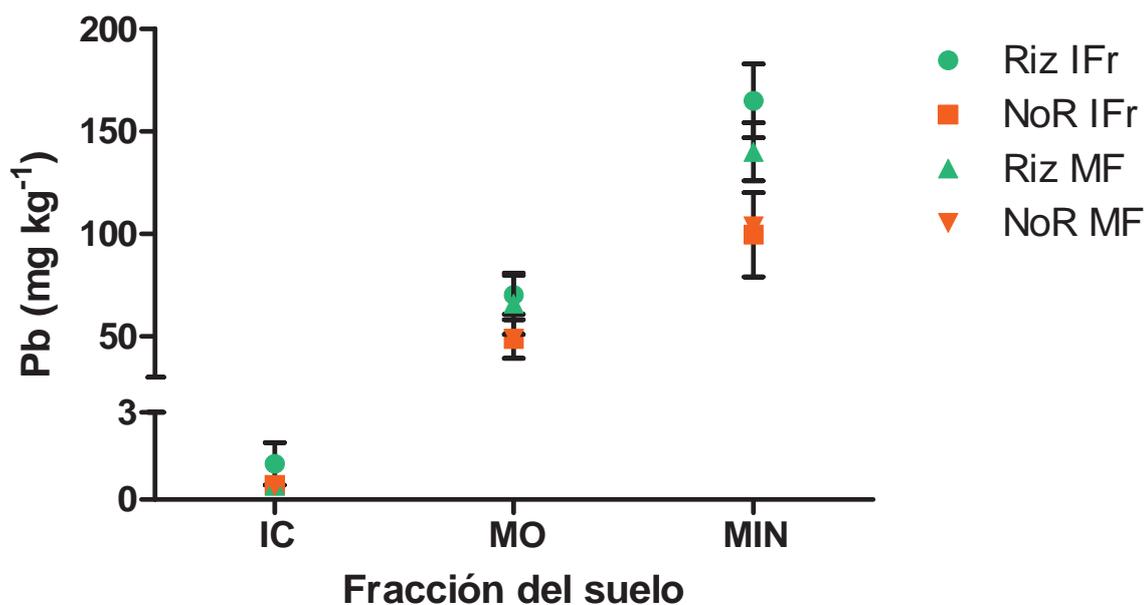
**Tabla 4.5.2:** Resultados estadísticos (prueba ANOVA y *post hoc* de Bonferroni) de las comparaciones sobre el contenido de Pb en suelo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en las fracciones de la ESS. Suelos CR-200, Riz y NoR. Etapa ontogénica MF. Se informan los valores medios  $\pm$  error estándar (excepto en IC donde se informa error instrumental). Ntotal = 18. ns: diferencias no significativas.

	<b>IC Riz</b> 0,50 $\pm$ 0,03	<b>MO Riz</b> 66 $\pm$ 15	<b>MIN Riz</b> 140 $\pm$ 14	<b>IC NoR</b> 0,50 $\pm$ 0,03	<b>MO NoR</b> 49 $\pm$ 8	<b>MIN NoR</b> 104 $\pm$ 7
<b>IC Riz</b> 0,05 $\pm$ 0,03		*** p < 0,001	*** p < 0,001	ns		
<b>MO Riz</b> 66 $\pm$ 15	*** p < 0,001		*** p < 0,001		ns	
<b>MIN Riz</b> 140 $\pm$ 14	*** p < 0,001	*** p < 0,001				ns
<b>IC NoR</b> 0,50 $\pm$ 0,03	ns				*** p < 0,001	*** p < 0,001
<b>MO NoR</b> 49 $\pm$ 8		ns		*** p < 0,001		** p < 0,01
<b>MIN NoR</b> 104 $\pm$ 7			ns	*** p < 0,001	** p < 0,01	

En la Figura 4.5.5 se muestran los valores medios obtenidos para las fracciones de ESS estudiadas en suelo CR-200. Se compararon los contenidos medios en suelo Riz y NoR entre ambas etapas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los suelos rizosférico o no rizosféricos entre ambas etapas, es decir que el contenido de Pb en los mismos no cambió entre una etapa y otra. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los suelos Riz y NoR para cada fracción y etapa estudiada, excepto para la fracción MIN en IFR.

Los resultados obtenidos para la extracción secuencial de los suelos CP-17 y CP-32 no fueron consistentes con el método utilizado. Además, no son comparables con los resultados obtenidos para el suelo pampeano, debido a la

diferencia en las características de cada uno de ellos. Aun así se debe destacar que el contenido de Pb en la fracción IC no fue detectable, mientras que sí se detectó presencia de Pb en las fracciones MO y MIN.



**Figura 4.5.5:** Contenido medio de Pb, y su error estándar, en suelo Riz y NoR sobre las fracciones IC, MO y MIN, para las etapas ontogénicas IFr y MF. Ntotal = 36.

Numerosos trabajos describen los cambios en las características químicas del suelo en función de la distancia a la zona rizosférica. Azimzadeh et al. (Azimzadeh, Shirvani, y Shariatmadari 2014) observaron el incremento del pH desde la zona rizosférica del suelo hacia la zona no rizosférica (a 8 mm, 16 mm y 60 mm de distancia) en cultivos de colza, de maíz y de la combinación de ambos con agregado de abono orgánico; además, determinaron la correlación entre: i) el incremento del pH y el decrecimiento de contenido de Pb en la fracción intercambiable, ii) el incremento del pH y el decrecimiento del carbono orgánico disuelto en el suelo. Estos cambios se atribuyeron a los ácidos orgánicos liberados por la raíz y por los microorganismos presentes en la rizosfera, y a la respiración de ambos. En la presente tesis, el suelo determinado

como Riz se ubicó hasta una distancia de 35 mm de la raíz principal (aproximadamente); por lo tanto, es posible que en el suelo Riz el pH haya sido menor al del suelo NoR, posibilitando una mayor solubilidad del catión metálico Pb(II). Esto explicaría el contenido de Pb determinado para la fracción IC en la etapa IFr. Otros autores han hallado que el pH aumenta en la rizosfera de *Brassica juncea* cuando se la cultiva en suelos alcalinos o ácidos con altas concentraciones de metales traza (Kim, Owens, y Kwon 2010). Los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuyen al conocimiento del comportamiento del Pb en la rizosfera de *B. napus*, aunque deberían realizarse estudios sobre los cambios en el pH del suelo para fortalecer la explicación propuesta.

El menor contenido de Pb en la fracción MIN del suelo NoR, respecto del suelo Riz, en la etapa IFr, puede deberse a la migración del metal desde el suelo no rizosférico y al rizosférico. Kim et al. (Kim, Owens, y Kwon 2010) observaron una disminución de Cd en solución en cercanías de la rizosfera de *B. juncea* respecto del suelo alejado de la misma. En su trabajo proponen que esta disminución se debe a la migración del metal desde zonas no rizosféricas cercanas a la raíz hacia la rizosfera, donde la concentración de Cd en solución era baja debido al alto pH y a la absorción de especies solubles por la planta, generándose un gradiente de concentración del metal. Este comportamiento también se observó para el Zn en suelo cultivado con *Thlaspi caerulescens* (familia Brassicaceae); los autores registraron un aumento de Zn intercambiable producto de la disolución del Zn menos soluble, la cual adjudicaron al efecto de las raíces dispuestas en alta densidad en el suelo rizosférico debido al uso del rizopot (Whiting et al. 2001). En la presente tesis se propone que la migración del Pb en solución desde el suelo NoR hacia el suelo Riz durante el crecimiento de la planta se debió a la incorporación del metal por parte de la planta, generando un gradiente de concentración que resultó en una disminución de la concentración de Pb en el suelo NoR. Consecuentemente, a largo plazo se produjo una disminución en las especies de Pb que se incorporaron a las formas estables, es decir a la fracción mineral. El rol de la fracción orgánica no pudo ser clarificado en el experimento realizado, a pesar de los numerosos trabajos que

informan sobre la interacción entre los metales pesados y compuestos orgánicos. No se han registrado diferencias estadísticamente significativas en el contenido de Pb entre el suelo Riz y NoR en la fracción asociada a materia orgánica, ni entre la etapa IFr y MF para dicha fracción. En el Capítulo 3 de la presente tesis, se informa una disminución del contenido de Pb en la fracción orgánica del suelo a lo largo de 60 días; por lo que es posible que en el ensayo con *B. napus* no se hayan detectado estas variaciones debido a que se alcanzó una situación de relativa estabilidad, ya que el primer muestreo se realizó luego de aproximadamente 100 días de realizada la contaminación.

Por último, la disminución del contenido de Pb en suelo Riz de la etapa IFr a la etapa MF podría sugerir que durante el crecimiento de la planta el metal fue absorbido por la misma. En el Capítulo 5 se analiza esta posibilidad.

#### 4.6. Conclusiones

En la etapa de iniciación de la fructificación, el contenido total de Pb determinado en suelo rizosférico de *Brassica napus* fue mayor al registrado en el suelo no rizosférico. Además, el contenido del metal en el suelo rizosférico disminuyó entre las etapas de iniciación de la fructificación y de madurez fisiológica. Esto valida la hipótesis planteada sobre las variaciones en el contenido de Pb en el suelo en las distintas etapas ontogénicas de la planta, sugiriendo la incorporación del metal en la biomasa de *B. napus*.

Además, es importante destacar que en el suelo con agregado de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  inmediatamente antes del comienzo del ensayo, se han determinado concentraciones de Pb biodisponible en el suelo rizosférico luego de 100 días, y que éste no se encontró en suelo no rizosférico, lo cual puede deberse a un efecto de la raíz sobre el entorno del suelo. En los suelos con contaminación pre-establecida no se halló Pb biodisponible al inicio del ensayo ni en las etapas ontogénicas estudiadas.

Por último, se observó que en la fracción mineral el contenido de Pb en la etapa IFr fue menor en el suelo NoR que en el suelo Riz. Esto se adjudica a una

migración del metal en sus formas intercambiables, debido al gradiente generado por la incorporación del metal por parte de la planta, disminuyendo así la concentración de Pb que luego se incorporaría a formas más estables en la zona NoR del suelo. El contenido de Pb en el suelo no rizosférico no presentó diferencias entre dichas etapas ontogénicas en ninguna de las fracciones del suelo estudiadas. Por lo tanto, se concluye que la especiación del Pb en suelo es afectada por la rizosfera de *Brassica napus*, en las fracciones intercambiables y mineral del suelo, pero no en la fracción asociada a materia orgánica, entre las etapas de inicio de fructificación y de madurez fisiológica. Resulta así que la hipótesis que propone que el contenido de Pb en suelo Riz y NoR de *Brassica napus* varía entre las etapas ontogénicas de la planta se verificó parcialmente.

#### 4.7. Bibliografía

- Azimzadeh, Y., M. Shirvani, y H. Shariatmadari. 2014. «Green Manure and Overlapped Rhizosphere Effects on Pb Chemical Forms in Soil and Plant Uptake in Maize/Canola Intercrop Systems: A Rhizobox Study». *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 23 (6): 677-90. doi:10.1080/15320383.2014.861795.
- Coll, L. 2011. «Evaluación de cultivares de colza Campaña 2011». Buenos Aires: INTA.
- Gonzalez, J., G. G. Cruzate, y J. L. Panigatti. 2013. *Suelos de la costa NE del Río Paraná (prov. de Bs. As.)*. 1ª ed. San Pedro, pcia. Bs. As., Argentina: INTA ediciones.
- Hinsinger, Philippe. 2001. «Bioavailability of Soil Inorganic P in the Rhizosphere as Affected by Root-Induced Chemical Changes: A Review». *Plant and Soil* 237 (2): 173-95. doi:10.1023/A:1013351617532.
- Hinsinger, Philippe, y R. J. Gilkes. 1996. «Mobilization of phosphate from phosphate rock and alumina-sorbed phosphate by the roots of ryegrass and clover as related to rhizosphere pH». *European Journal of Soil Science* 47 (4): 533-44.
- Hinsinger, Philippe, George R. Gobran, Peter J. Gregory, y Walter W. Wenzel. 2005. «Rhizosphere Geometry and Heterogeneity Arising from Root-Mediated Physical and Chemical Processes: Research Review». *New Phytologist* 168 (2): 293-303. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01512.x.
- Khan, Sardar, Qing Cao, Bao-dong Chen, y Yong-Guan Zhu. 2006. «Humic Acids Increase the Phytoavailability of Cd and Pb to Wheat Plants Cultivated in Freshly Spiked, Contaminated Soil (7 Pp)». *Journal of Soils and Sediments* 6 (4): 236-42. doi:10.1065/jss2006.08.178.
- Kim, Kwon-Rae, Gary Owens, y Soon-Ik Kwon. 2010. «Influence of Indian Mustard (*Brassica Juncea*) on Rhizosphere Soil Solution Chemistry in Long-Term Contaminated Soils: A Rhizobox Study». *Journal of Environmental Sciences* 22 (1): 98-105. doi:10.1016/S1001-0742(09)60080-2.
- Krishnamurti, Gummuluru S. R., y Ravendra Naidu. 2002. «Solid-solution speciation and phytoavailability of copper and zinc in soils». *Environmental science & technology* 36 (12): 2645-51.
- Krishnamurti, Gummuluru S. R., M. Pigna, M. Arienzo, y A. Violante. 2007. «Solid-Phase Speciation and Phytoavailability of Copper in Representative Soils of Italy». *Chemical Speciation and Bioavailability* 19 (2): 57-67. doi:10.3184/095422907X211891.
- Kuchenbuch, R., y A. Jungk. 1982. «A method for determining concentration profiles at the soil-root interface by thin slicing rhizospheric soil». *Plant and Soil* 68 (3): 391-94.
- Lavado, R. S. 2006. «Concentration of potentially toxic elements in field crops grown near and far from cities of the Pampas (Argentina)». *Journal of environmental management* 80 (2): 116-19.

- Lavado, R. S., Mónica Rodríguez, Roberto Alvarez, Miguel A. Taboada, y Marta S. Zubillaga. 2007. «Transfer of Potentially Toxic Elements from Biosolid-Treated Soils to Maize and Wheat Crops». *Agriculture, Ecosystems & Environment* 118 (1-4): 312-18. doi:10.1016/j.agee.2006.06.001.
- Ma, Y. B., y N. C. Uren. 1998. «Transformations of heavy metals added to soil -- application of a new sequential extraction procedure». *Geoderma* 84 (1-3): 157-68. doi:16/S0016-7061(97)00126-2.
- Miralles, Daniel J., L. B. Windauer, y N. V. Gómez. 2003. «Factores que regulan el desarrollo de los cultivos de granos». En *Producción de Granos. Bases Funcionales para su Manejo*, editado por Emilio H. Satorre, Roberto L. Benech Arnold, Gustavo A. Slafer, Elba B. de la Fuente, Daniel J. Miralles, María E. Otegui, y Roxana Savin. Buenos Aires: Editorial Facultad de Agronomía.
- Orrño, Daniela I., V. Schindler, y Raúl S. Lavado. 2012. «Heavy Metal Availability in Pelargonium Hortorum Rhizosphere: Interactions, Uptake and Plant Accumulation». *Journal of Plant Nutrition* 35 (9): 1374-86.
- Schöttelndreier, Marion, y Ursula Falkengren-Grerup. 1999. «Plant induced alteration in the rhizosphere and the utilisation of soil heterogeneity». *Plant and Soil* 209 (2): 297-309.
- Wang, Zhongwen, Xiao-quan Shan, y Shuzhen Zhang. 2002. «Comparison between fractionation and bioavailability of trace elements in rhizosphere and bulk soils». *Chemosphere* 46 (8): 1163-71. doi:10.1016/S0045-6535(01)00206-5.
- Wenzel, Walter W., Gottfried Wieshammer, Walter J. Fitz, y Markus Puschenreiter. 2001. «Novel rhizobox design to assess rhizosphere characteristics at high spatial resolution». *Plant and soil* 237 (1): 37-45.
- Whiting, Steven N., Jonathan R. Leake, Stephen P. McGrath, y Alan JM Baker. 2001. «Zinc accumulation by *Thlaspi caerulescens* from soils with different Zn availability: a pot study». *Plant and Soil* 236 (1): 11-18.
- Wright, R. J., y T. Stuczynski. 1996. «Atomic Absorption and Flame Emission Spectrometry». En *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*, editado por Donald L. Sparks, 65-90. Soil Science Society of America Book Series 5. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy-Soil Science Society of America.
- Yang, Jianjun, Shaoping Hu, Xincan Chen, Mingge Yu, Jin Liu, Hang Li, Chaofeng Shen, Jiyan Shi, y Yingxu Chen. 2010. «Transformation of Lead Solid Fraction in the Rhizosphere of *Elsholtzia Splendens*: The Importance of Organic Matter». *Water, Air, and Soil Pollution* 205 (1-4): 333-42. doi:10.1007/s11270-009-0077-x.
- Youssef, Refat A., y Mitsuo Chino. 1989. «Root-Induced Changes in the Rhizosphere of Plants. II. Distribution of Heavy Metals across the Rhizosphere in Soils». *Soil Science and Plant Nutrition* 35 (4): 609-21. doi:10.1080/00380768.1989.10434796.

# **5. BIOABSORCIÓN DE Pb**

**POR *BRASSICA NAPUS***

### 5.1. Introducción

Las plantas poseen en sus tejidos 14 elementos esenciales; el C, H y O, que proporcionan la mayor parte de la biomasa, no se consideran en este aspecto. Los nutrientes esenciales permiten el crecimiento y la división celular. Los macronutrientes son definidos por su gran contenido en las plantas (> 0,1 % de la masa seca), mientras que los micronutrientes son mucho menos abundante (< 0,01 % de la masa seca). N, P, K, S, Ca y Mg se consideran macronutrientes. Los micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn, B, Mo, Ni y Cl) son mucho más heterogéneos con respecto a sus características químicas y la función biológica que cumplen. Los metales se encuentran en ambos grupos con múltiples funciones en las células (Hell y Mendel 2010). Algunos de estos elementos metálicos, como el zinc, el cobre y el molibdeno, son esenciales para los sistemas biológicos en determinado rango de concentración, pero a altas concentraciones pueden resultar fuertemente tóxicos, provocando la activación de mecanismos oxidativos o incluso genotóxicos (Briat y Lebrun 1999).

Las plantas pueden absorber los elemento traza desde la rizosfera con mediación de los organismos del suelo o por pasaje al plasmalema en la interface suelo-raíz (Iskandar y Kirkham 2001). Algunas especies del género *Brassica*, como *B. nigra* L. y *B. juncea*, han sido ampliamente estudiadas como acumuladoras de metales pesados en suelos con altas concentraciones de estos elementos tóxicos. Han sido reportadas como tolerantes a altas cantidades de metales como Pb, Cr, Cd, entre otros, y como acumuladoras en raíces, tallos y hojas (Liu et al. 2000; Bharagava, Chandra, y Rai 2008; Karak et al. 2013). *Brassica napus* ha sido estudiada en menor medida en cuanto a su capacidad de acumulación de metales (Solhi, Shareatmadari, y Hajabbasi 2005; Azimzadeh, Shirvani, y Shariatmadari 2014; Bilal Shakoor et al. 2014), y no se han registrado trabajos sobre remediación utilizando esta especie en suelos pampeanos.

## 5.2. Objetivos

i) Estudiar el efecto del Pb sobre *Brassica napus* en dos etapas ontogénicas: inicio de la fructificación y madurez fisiológica.

ii) Estudiar la absorción y bioacumulación de Pb en hojas de *Brassica napus* en las dos etapas ontogénicas mencionadas.

iii) Analizar la relación entre la acumulación de Pb en la planta y el contenido de Pb en los distintos tipos de suelo estudiados (control, recientemente contaminado y con contaminación consolidada).

## 5.3. Hipótesis

i) El crecimiento y desarrollo de *Brassica napus* es afectado negativamente por su cultivo en suelo con Pb.

ii) *Brassica napus* posee la capacidad de incorporar y acumular Pb del suelo, y ésta es distinta en las distintas etapas de desarrollo de la planta.

iii) La acumulación de Pb en órganos de *B. napus* se incrementa con el aumento de la concentración de Pb en suelo en forma lineal.

## 5.4. Materiales y Métodos

### *Dispositivo experimental*

El dispositivo experimental se describió en la sección 4.4 de la presente tesis; en la Tabla 4.4.3 se sintetiza el diseño experimental.

## BIOABSORCIÓN DE Pb POR *BRASSICA NAPUS*

Crecimiento, desarrollo y capacidad de bioacumulación.

**Tabla 4.4.3:** Tratamientos realizados en el ensayo de especiación de Pb en suelo en cultivo de *B. napus*. Para cada tratamiento se indica el suelo utilizado y el número de réplicas.

Tratamiento	Suelo utilizado	Nro. de réplicas
C0, 0 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	Argiudol Vértico, Pcia. Bs. As., sin Pb	10
CR-50, 50 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	Argiudol Vértico, Pcia. Bs. As., con Pb	10
CR-100, 100 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	Argiudol Vértico, Pcia. Bs. As., con Pb	10
CR-200, 200 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	Argiudol Vértico, Pcia. Bs. As., con Pb	10
CP-17, 17 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	Natracualf Típico, Pcia. Sta. Fe, con Pb	4
CP-32, 32 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	Natracualf Típico, Pcia. Sta. Fe, con Pb	6

### *Siembra, cultivo, muestreo*

La siembra y cultivo de *Brassica napus* se describió en la sección 4.4 de la presente tesis.

En la etapa de inicio de la fructificación (IFr) se cosechó una parte de las plantas crecidas en suelos C0 y CR (N = 3). En la madurez fisiológica (MF) se cosechó otra parte de las plantas crecidas en suelos C0 y CR (N = 4) y,

adicionalmente, una parte de las plantas crecidas en suelo CP ( $N_{CP17} = 1$ ,  $N_{CP32} = 4$ ).

Los órganos de las plantas cosechadas se conservaron en bolsas de papel. Según la etapa de desarrollo se obtuvieron:

- raíz, tallo, hojas, flores y silicuas, en IFr.
- raíz, tallo, hojas y fruto, en MF.

#### *Determinación de biomasa*

El peso seco de los órganos cosechados fue determinado mediante el secado en estufa a 70 °C hasta alcanzar peso constante.

#### *Determinación del contenido de Pb sobre hojas de Brassica napus*

Se determinó el contenido de Pb sobre la totalidad de las hojas de cada planta cosechada en cada muestreo. En IFr el número de réplicas fue de tres plantas ( $N = 3$ ), y en MF se conformaron *pools* de hojas de distintas plantas de la misma concentración, debido a que las hojas de una sola planta no alcanzaban la masa necesaria para las determinaciones analíticas ( $N = 1$ ).

Además se determinó el contenido de Pb en hojas caídas, y luego colectadas, de las plantas crecidas en suelo CR de 200 mg kg<sup>-1</sup> de Pb. Las mismas fueron colectadas durante todo el período de cultivo entre los muestreos ( $N = 2$ ).

El protocolo de digestión se basó en el método 3050B de USEPA, modificado para el material digerido (Figura 5.4.1).

El contenido de Pb se determinó por espectrometría de absorción atómica en llama de aire/acetileno, en equipo Perkin Elmer 3110.

#### *Determinación del contenido de Pb en granos de Brassica napus*

Los granos analizados correspondieron a las plantas cultivadas en el suelo que recibió  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb, cosechadas en la etapa MF. El protocolo de digestión utilizado fue el mismo que el descrito para la digestión de hojas, exceptuando el paso de molienda.

El contenido de Pb se determinó por espectrometría de absorción atómica en llama de aire/acetileno, en equipo Perkin Elmer 3110.

#### *Factor de Bioconcentración*

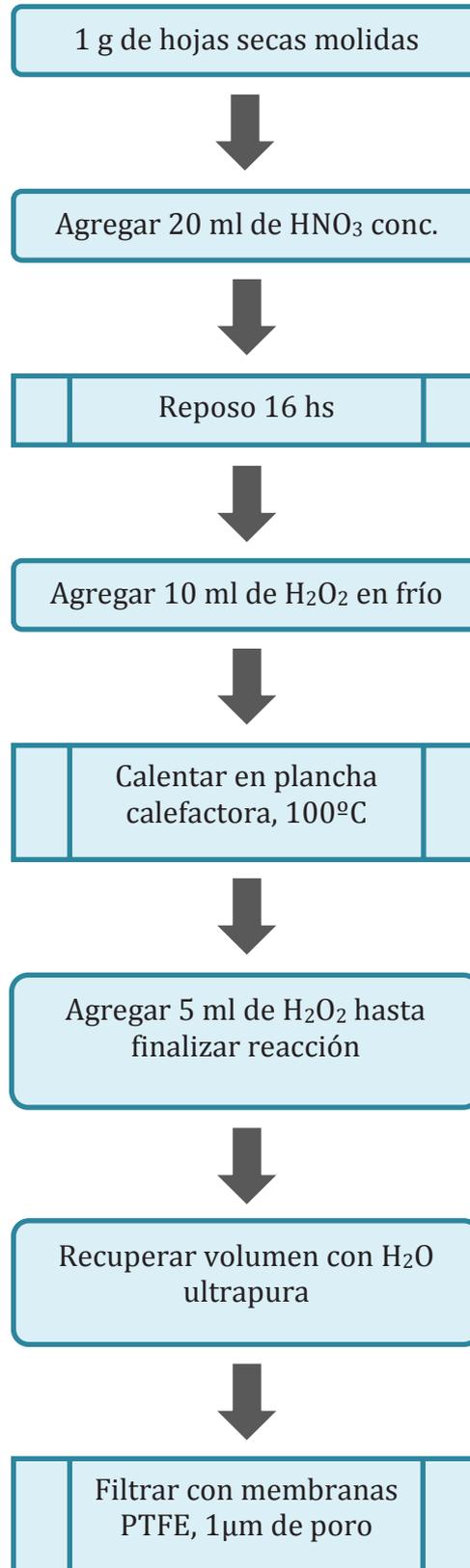
Se determinó el Factor de Bioconcentración (FBC) de las hojas. El FBC se define como la relación entre la concentración del metal en la planta respecto de la concentración del metal en el suelo (Salazar et al. 2012).

#### *Reactivos*

Se utilizaron reactivos de calidad analítica y agua ultrapura.

#### *Estadística*

La estadística descriptiva y los análisis estadísticos con el método de ANOVA se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.



**Figura 5.4.1:** Protocolo de digestión utilizado para hojas y granos. Adaptado del método 3050B (USEPA).

## 5.5. Resultados y discusión

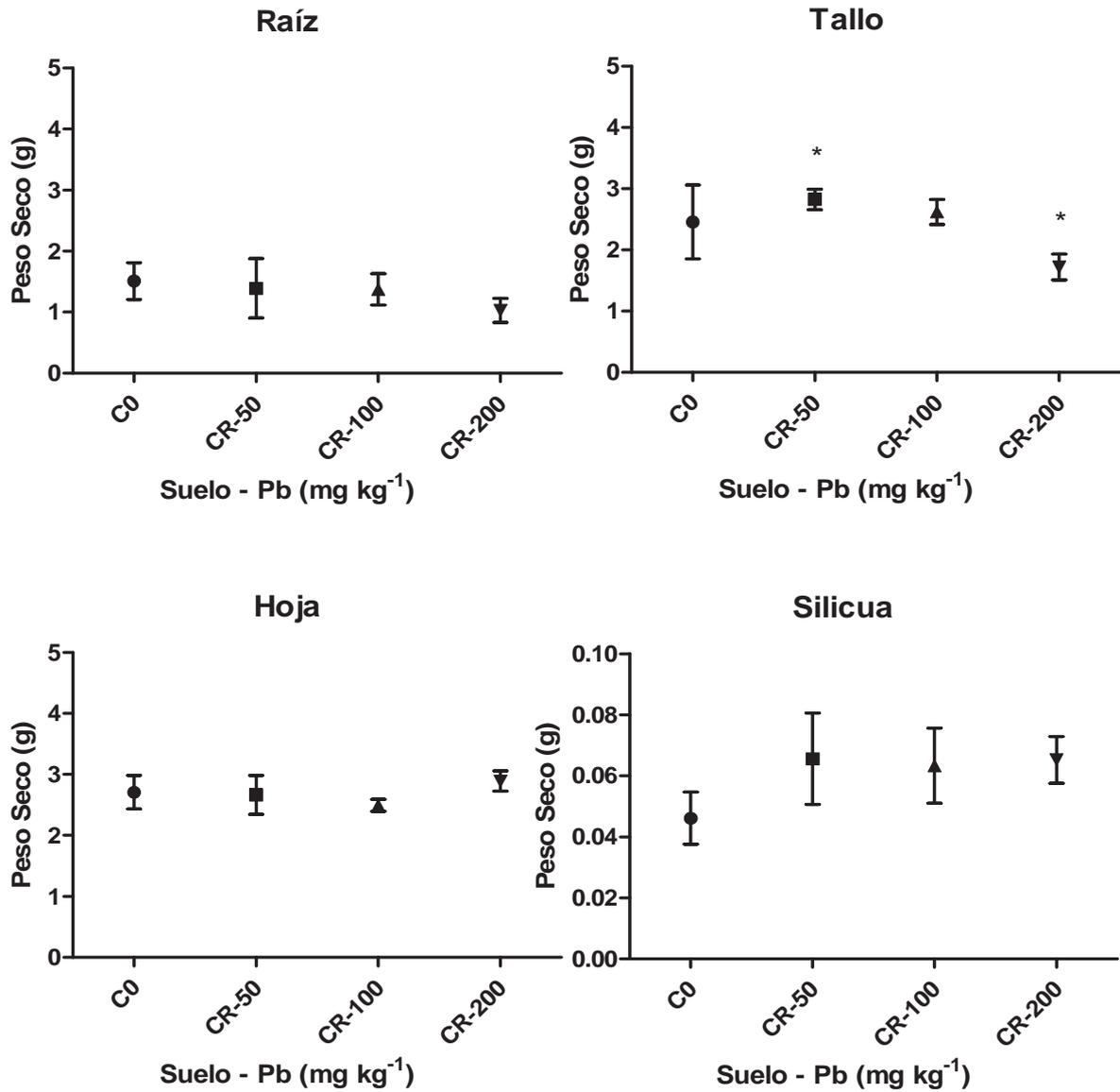
### *Peso seco en IFr*

Los pesos secos de los órganos de las plantas cosechadas en la etapa ontogénica IFr se muestran en la Figura 5.5.1 y en la Tabla 5.5.1. El peso seco medio más alto de las raíces se registró en el tratamiento C0 ( $1,51 \pm 0,17$  g) mientras que el peso seco medio más bajo se registró en CR-200 ( $1,03 \pm 0,11$  g). Las diferencias entre los tratamientos no resultaron estadísticamente significativas. El peso seco medio menor de los tallos también se encontró en el tratamiento CR-200 ( $1,72 \pm 0,12$  g), mientras que el mayor se registró en el tratamiento CR-50 ( $2,83 \pm 0,10$  g); las diferencias entre todos los tratamientos fueron estadísticamente significativas; en particular el peso seco de tallos en el tratamiento CR-200 resultó menor que en CR-50 con la prueba *post hoc* de Tukey ( $p < 0,025$ ), pero no resultó significativamente menor al peso seco de las plantas crecidas en C0. Los pesos secos de las hojas y de las silicuas no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

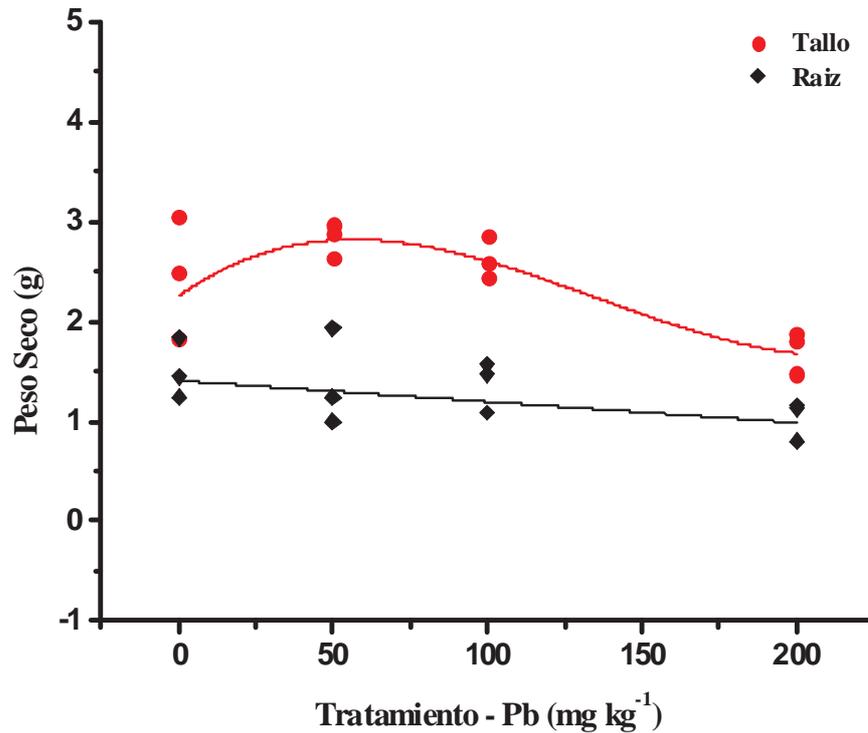
Las variaciones observadas en tallos y en raíces se analizaron con regresión cúbica y lineal (Figura 5.5.2). La distribución de los pesos secos de los tallos se ajustó a una función cúbica ( $R^2 = 0,6316$ ). Se observa un leve incremento en el peso con el tratamiento de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb, luego una disminución en el tratamiento de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , y los valores más bajos en las plantas crecidas en suelos con  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb. La distribución de los pesos de las raíces no presentó un buen ajuste a la regresión lineal ( $R^2 = 0,24838$ ). Estos resultados muestran un efecto negativo en el crecimiento del tallo para las plantas crecidas en suelo CR-200 respecto de las plantas que crecieron en suelos con menores concentraciones de Pb.

## BIOABSORCIÓN DE Pb POR *BRASSICA NAPUS*

Crecimiento, desarrollo y capacidad de bioacumulación.



**Figura 5.5.1:** Peso seco medio  $\pm$  EEM (g) de órganos de las plantas crecidas en suelo con distintas concentraciones de Pb, durante la etapa ontogénica IFr. N = 3. \* señala diferencias significativas con ANOVA y prueba de Tukey ( $p < 0,025$ ).



**Figura 5.5.2:** Peso seco (g) de tallos y raíces de las plantas crecidas en suelos CR con 0, 50, 100 y 200 mg kg<sup>-1</sup> de Pb. Etapa ontogénica IFr. Las curvas corresponden a las distribuciones de pesos secos de tallos con ajuste a una función cúbica ( $R^2 = 0,6316$ ) y de pesos secos de raíces con ajuste a una función lineal ( $R^2 = 0,24838$ ). Cada punto corresponde a una planta ( $N_{\text{tratamiento}} = 3$ ).

#### *Peso seco en MF*

Los pesos secos medios de raíces, tallos, hojas y granos de las plantas crecidas en suelo C0 o en suelo CR reciente se muestran en la Figura 5.5.3. Los mismos no presentaron diferencias estadísticamente significativas y tampoco se observó una tendencia definida en función de la concentración de Pb en suelo. En la Tabla 5.5.1 se muestran los valores medios  $\pm$  EEM, máximos y mínimos de los pesos secos de cada órgano.

Las plantas crecidas en suelo CP se analizaron sólo a modo descriptivo, debido al número de réplicas insuficiente y a la falta de muestras control para el mismo tipo de suelo. Los valores medios y el error estándar de la media se presentan en la Tabla 5.5.2.

BIOABSORCIÓN DE Pb POR *BRASSICA NAPUS*

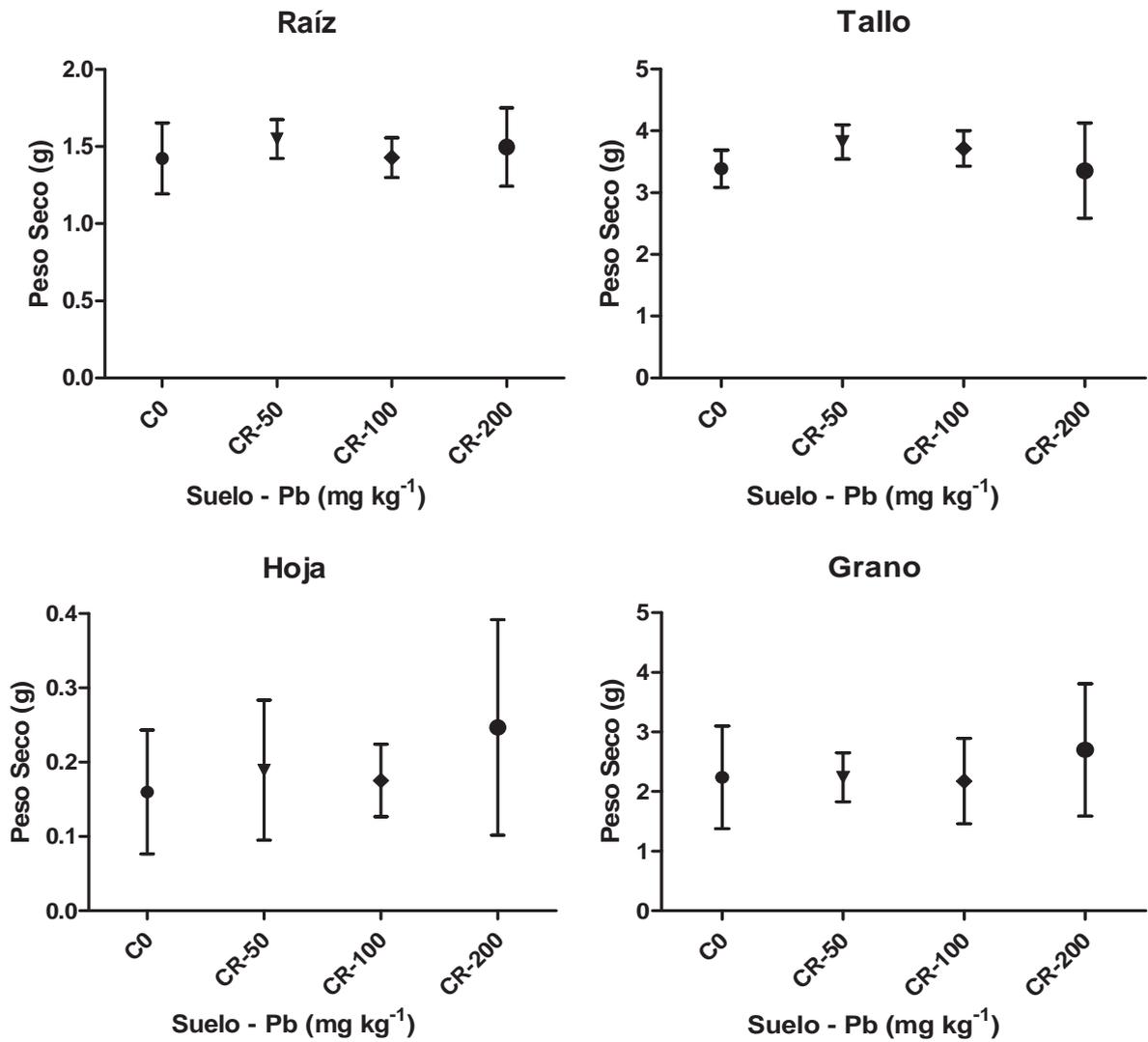
Crecimiento, desarrollo y capacidad de bioacumulación.

**Tabla 5.5.1:** Valores medios  $\pm$  EEM, máximos y mínimos del peso seco (g) de raíces, tallos, hojas, silicuas y granos de las plantas crecidas en suelo C0 y en suelo CR con concentraciones de 50, 100 y 200 mg kg<sup>-1</sup>. Etapas ontogénicas: IFr y MF. PS: peso seco.

	SUELO-Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	PS Raíz (g)			PS Tallo (g)			PS Hojas (g)			PS Silicuas ó Granos (g)			
		Media $\pm$ ESM	Mín.	Máx.	Media $\pm$ ESM	Mín.	Máx.	Media $\pm$ ESM	Mín.	Máx.	Media $\pm$ ESM	Mín.	Máx.	
		Etapa Ontogénica	IFr	C0	1,5 $\pm$ 0,2	1,24	1,84	2,5 $\pm$ 0,4	1,84	3,05	2,7 $\pm$ 0,3	2,22	3,16	0,05 $\pm$ 0,01
		CR-50	1,4 $\pm$ 0,3	1,00	1,93	2,8 $\pm$ 0,1	2,64	2,96	2,7 $\pm$ 0,3	2,06	3,16	0,07 $\pm$ 0,01	0,04	0,08
		CR-100	1,4 $\pm$ 0,2	1,08	1,57	2,6 $\pm$ 0,1	2,44	2,85	2,5 $\pm$ 0,1	2,31	2,66	0,06 $\pm$ 0,01	0,05	0,09
		CR-200	1,0 $\pm$ 0,1	0,80	1,16	1,7 $\pm$ 0,1	1,48	1,88	2,9 $\pm$ 0,2	2,58	3,14	0,07 $\pm$ 0,01	0,05	0,08
	MF	C0	1,4 $\pm$ 0,2	1,06	2,10	3,4 $\pm$ 0,3	2,83	4,16	0,16 $\pm$ 0,08	0,03	0,32	2,2 $\pm$ 0,4	1,03	3,05
		CR-50	1,6 $\pm$ 0,1	1,30	1,78	3,8 $\pm$ 0,3	3,07	4,39	0,19 $\pm$ 0,09	0,01	0,33	2,2 $\pm$ 0,2	1,65	2,58
		CR-100	1,4 $\pm$ 0,3	1,18	1,77	3,7 $\pm$ 0,3	2,99	4,26	0,18 $\pm$ 0,05	0,08	0,23	2,2 $\pm$ 0,4	1,35	3,10
		CR-200	1,5 $\pm$ 0,5	1,06	2,13	3,4 $\pm$ 0,8	2,17	4,60	0,3 $\pm$ 0,1	0,04	0,53	2,7 $\pm$ 0,6	1,34	3,70

## BIOABSORCIÓN DE Pb POR *BRASSICA NAPUS*

Crecimiento, desarrollo y capacidad de bioacumulación.



**Figura 5.5.3:** Peso seco medio  $\pm$  EEM (g) de hojas, tallos, raíces y granos de las plantas crecidas en suelo C0 y en suelo CR con 50, 100 y 200 mg kg<sup>-1</sup> de Pb. Etapa ontogénica MF. N = 4.

BIOABSORCIÓN DE Pb POR *BRASSICA NAPUS*

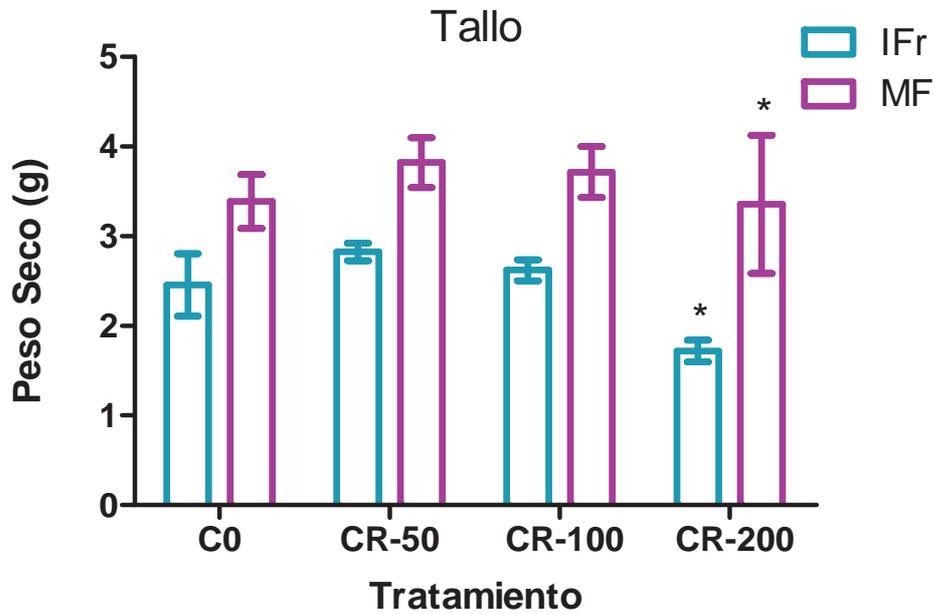
Crecimiento, desarrollo y capacidad de bioacumulación.

**Tabla 5.5.2:** Valores medios y su desviación estándar del peso seco (g) de raíz, tallo, hojas y granos de las plantas crecidas en suelo CP-17 (N = 1) y CP-32 (N = 2 - 4).

SUELO-Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	Media ± EEM			
	Raíz (g)	Tallo (g)	Hojas (g)	Granos (g)
CP-17	1,69	2.54	0,16	0,38
CP-32	1,9 ± 0,4	2,9 ± 0,9	0,11 ± 0,01	1,4 ± 0,5

*Evaluación del crecimiento de raíces y tallos*

Las diferencias entre los crecimientos de las raíces entre las etapas ontogénicas estudiadas no resultaron significativas para los tratamientos realizados (ANOVA de dos factores,  $p > 0,05$ ). Contrariamente, el crecimiento de tallos entre IFr y MF presentó diferencias estadísticamente significativas para las plantas crecidas en suelos CR-200, mientras que no resultaron significativas para los otros tratamientos estudiados (prueba *post hoc* de Bonferroni,  $p < 0,05$ ). Este resultado refuerza los análisis ya descritos, los cuales indicaron que el efecto negativo en el crecimiento del tallo se encontró en las plantas cosechadas en la etapa de inicio de fructificación crecidas en suelo CR-200, y que luego las mismas alcanzaron una masa igual a las crecidas en suelos con concentraciones menores de Pb (Figura 5.5.4).



**Figura 5.5.4:** Peso seco medio  $\pm$  EEM (g) de tallos de las plantas crecidas en suelo C0 y en suelo CR con 50, 100 y 200 mg kg<sup>-1</sup> de Pb. Etapas ontogénicas IFr y MF. \* señala diferencias significativas con ANOVA de dos factores y prueba *post hoc* de Bonferroni,  $p < 0,05$ .

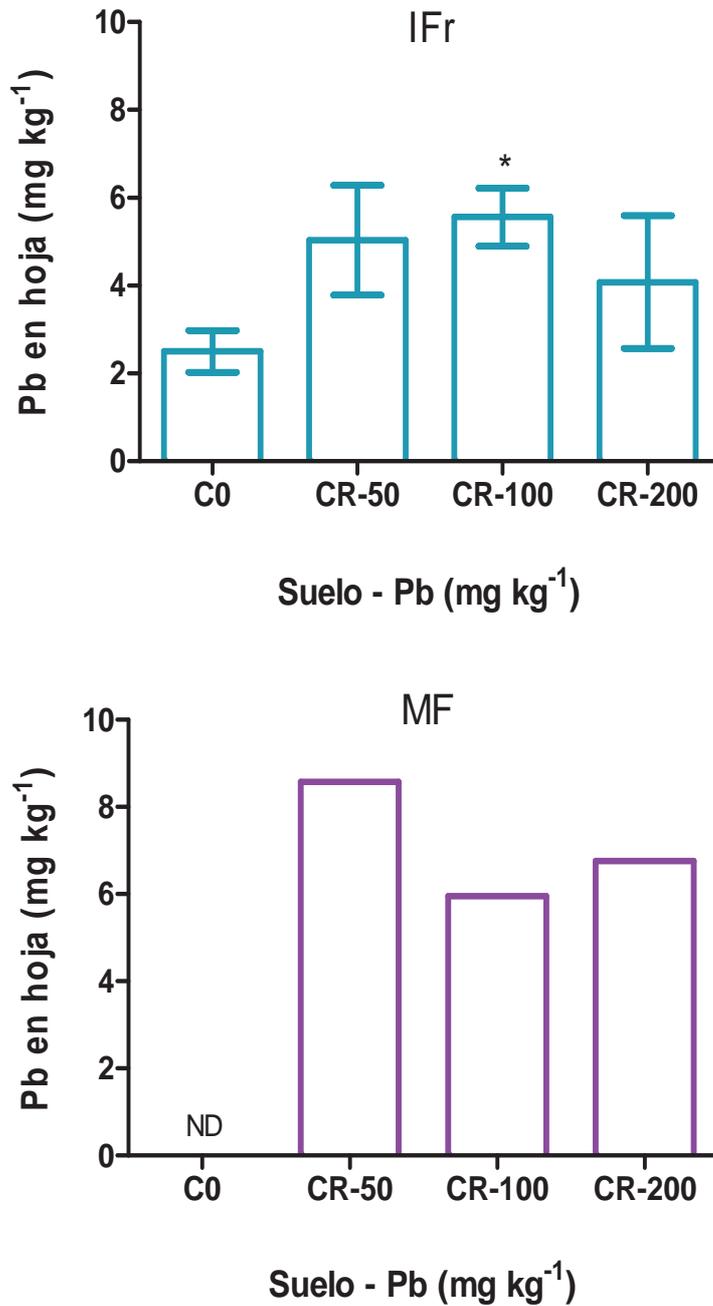
Bilal Shakoor et al. (2014), obtuvieron resultados que indican una disminución en el peso seco de tallos y raíces de *Brassica napus* crecidas en solución con altas concentraciones de Pb tras 45 días de cultivo, también encontraron diferencias similares en peso seco de hojas pero sólo respecto del control. Ghani (2011) estudió el efecto de Cd en suelos sobre el crecimiento de distintas variedades de *Brassica napus*; registró que el peso seco de tallos aumentó a lo largo de 80 días de cultivo, resultando menor para concentraciones altas de Cd en suelo. Esto se corresponde con el efecto determinado para el Pb en la presente tesis para los primeros 100 días de cultivo. Liu et al. (2000) investigaron el crecimiento de tallos y raíces en plántulas de *Brassica juncea* crecidas durante 15 días en soluciones con concentraciones crecientes de Pb, obteniendo evidencias de decrecimiento de masa seca en tallos. No se han encontrado trabajos que analicen el efecto del Pb en suelo sobre el crecimiento de *Brassica napus* en distintas etapas ontogénicas, por lo que los resultados de la presente tesis son novedosos.

*Contenido de Pb en hojas de B. napus*

En la Figura 5.5.5 se grafican los resultados de las determinaciones de Pb en hojas de las plantas crecidas en suelos C0 y CR cosechadas en las etapas ontogénicas IFr y MF. En la etapa IFr se detectó Pb en los análisis correspondientes al tratamiento control ( $2,50 \pm 0,47$  mg kg<sup>-1</sup> de Pb), lo que se adjudicó a una contaminación de la muestra en el momento de la digestión. El contenido medio de Pb en hojas de plantas crecidas en suelo CR se contrastó con el contenido medio de Pb de las plantas control (crecidas en C0), presentando diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). La prueba *post hoc* de Tukey mostró además diferencias significativas entre las plantas control y las plantas crecidas en CR-100 ( $5,56 \pm 0,38$  mg kg<sup>-1</sup> de Pb). En la etapa MF no se encontró contenido de Pb en hojas de plantas crecidas en suelo C0. En las plantas crecidas en suelos CR-50 y cosechadas en la etapa MF se encontró el contenido más alto de Pb en hojas ( $8,58$  mg kg<sup>-1</sup> de Pb), incluso considerando la etapa IFr. Estos resultados no fueron analizados estadísticamente debido a la ausencia de réplicas. Distintas especies de brasicáceas han sido identificadas como potenciales incorporadoras de Pb, aunque la mayor parte de los resultados reportados son sobre *B. juncea* y *B. nigra* (USEPA 2000). Karak et al. (2013) han determinado la acumulación de Pb en hojas de *Brassica juncea* tras 90 días de cultivo de la planta en suelos con concentraciones entre 31 y 58 mg kg<sup>-1</sup> de Pb, alcanzando concentraciones de 6 mg kg<sup>-1</sup> aproximadamente, valor similar a los hallados en el presente trabajo en hojas de *B. napus* para concentraciones de 50 y 100 mg kg<sup>-1</sup> de Pb en suelo. Los resultados de la presente tesis aportan al conocimiento sobre la capacidad acumuladora de Pb de *Brassica napus*, y muestran que posee potencialidad como remediadora de suelos, comparable con la de *B. juncea*.

El contenido de Pb en hojas de las plantas crecidas en suelo CP-17 y CP-32 no fue detectable con el método utilizado. Esto se vincula con la ausencia de Pb biodisponible en el suelo (ver sección III.1). En concordancia con lo observado, Torri y Lavado (2009) han determinado que *Lolium perenne* L. no acumuló Pb en su biomasa aérea en suelos Argiudoles Típicos en los que no se encontró Pb en las fracciones intercambiable y unida a materia orgánica.

En la Tabla 5.5.3 se muestra el contenido medio  $\pm$  EEM de Pb en hojas colectadas y en hojas cosechadas de plantas crecidas en suelo CR-200. Los valores determinados en las hojas colectadas en IFr resultaron significativamente mayores que los determinados en hojas cosechadas en la misma etapa ontogénica con prueba de t ( $p < 0,05$ ). La pérdida de hojas es un mecanismo de detoxificación utilizado por diversas especies para reducir el elemento tóxico que la planta acumuló en sus tejidos (Dahmani-Muller et al. 2000), por lo que los valores de concentración de Pb encontrados en las hojas colectadas son consistentes con lo esperado como respuesta al estrés. Por otra parte, estos resultados fueron consistentes con los obtenidos en el análisis de Pb biodisponible en suelo CR determinado en la etapa IFr (ver sección 4.1) lo que permitió la absorción y acumulación de Pb en las hojas durante los primeros estadios de desarrollo de la planta.



**Figura 5.5.5:** Contenido de Pb en hojas ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de plantas crecidas en suelos C0, CR-50, CR-100 y CR-200. IFr: Se informan valores medios y desvío estándar (barras),  $N = 3$ . MF: Se informan valores de *pools* de hojas de tres plantas del mismo tratamiento,  $N = 1$ . \* señala diferencias significativas respecto del control, con ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey,  $p < 0,05$ . ND: no detectable.

**Tabla 5.5.3:** Contenido medio  $\pm$  EEM de Pb ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en hojas colectadas y cosechadas de plantas crecidas en suelo CR-200. \*: Señala diferencias significativas con prueba de t ( $p < 0,05$ )

	Pb ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	
	Hojas Colectadas	Hojas Cosechadas
<b>IFr</b>	$13 \pm 2^*$	$4,1 \pm 0,9^*$
<b>MF</b>	$8 \pm 1$	7

*Factor de bioacumulación en hojas*

Los valores de FBC se presentan en la Tabla 5.5.4. Los mismos decrecieron en función del aumento de la concentración de Pb en suelo en las etapas IFr y MF, presentando valores muy similares entre sí:  $\text{FBC}_{50} > \text{FBC}_{100} > \text{FBC}_{200}$ . Los FBC en la etapa IFr presentaron diferencias significativas con ANOVA ( $p < 0,0025$ ), y entre el tratamiento CR-50 y los tratamientos CR-100 y CR-200 ( $p < 0,05$ ); no se analizaron estadísticamente los valores correspondientes a MF debido a la ausencia de réplicas. Además se calculó el FBC en relación al Pb biodisponible del tratamiento de  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb; en la etapa IFr el Pb biodisponible en el suelo había resultado de  $0.62 \pm 0.03 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb, y en la etapa MF  $0.23 \pm 0.01 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb. El FBC biodisponible tuvo una media y desvío estándar de  $6.2 \pm 2.4$  para la etapa IFr y de  $29 \pm 0$  para la etapa MF. En el estudio realizado por Karak et al. (2013) los resultados muestran una acumulación de Pb en hojas de 3, 4 y  $6 \text{ mg kg}^{-1}$ , aproximadamente, para concentraciones de Pb en suelo de 58, 52 y  $31 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente, con agregado de enmiendas orgánicas. Esta tendencia se corresponde con los resultados observados en la presente tesis.

BIOABSORCIÓN DE Pb POR *BRASSICA NAPUS*

Crecimiento, desarrollo y capacidad de bioacumulación.

**Tabla 5.5.4:** Contenido de Pb en hojas ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en IFr (valor medio  $\pm$  EEM,  $N = 3$ ) y en MF (correspondiente al pool de hojas de tres plantas distintas,  $N = 1$ ). Factor de bioconcentración (FBC) calculado en función del total de Pb inicial en suelo en IFr y MF. ND: no detectado. \* y \*\* señala diferencias significativas con ANOVA y prueba *post hoc* de Tukey ( $p < 0.05$ ).

		<b>PbSUELO(<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b>	<b>PbHOJAS(<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b>	<b>FBC</b>
<b>Etapa Ontogénica</b>	<b>IFr</b>	0	$2,5 \pm 0,5$	-
		50	$5,0 \pm 0,7$	$0,10 \pm 0,01^{*,**}$
		100	$5,6 \pm 0,4$	$0,056 \pm 0,004^*$
		200	$4,1 \pm 0,9$	$0,020 \pm 0,004^{**}$
	<b>MF</b>	0	ND	-
		50	8,6	0,2
		100	6,0	0,06
		200	6,8	0,03

*Contenido de Pb en granos en plantas cultivadas en suelo CR-200*

El contenido de Pb en granos resultó por debajo del límite de cuantificación en dos de los cuatro casos estudiados (LC:  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Los otros dos casos arrojaron un contenido de  $3,71$  y  $1,59 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb en granos. Pocos estudios han detectado acumulación de Pb en granos en el género *Brassica* y no se han hallado en literatura resultados previos para la acumulación de Pb en *B. napus*. Karak et al. (2013) detectaron concentraciones de Pb en granos de *B. juncea* con un valor máximo aproximado de  $3 \text{ mg kg}^{-1}$  en plantas crecidas en suelos con  $31 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb y con agregado de enmiendas orgánicas. A partir de esta información, puede inferirse que *B. napus* poseería mayor capacidad de acumulación en sus granos que *B. juncea*, aunque deberían estudiarse un mayor número de ejemplares para obtener información más precisa.

Los resultados de la presente muestran que el cultivo de *B. napus* en suelos con altas concentraciones de Pb y bajo contenido orgánico puede resultar en la acumulación del metal en sus granos, producto utilizado comercialmente.

## 5.6. Conclusiones

El crecimiento de *Brassica napus* sólo fue afectado negativamente en los tallos en la etapa ontogénica de inicio de la fructificación, y sólo en suelo con contaminación reciente para la concentración de 200 mg kg<sup>-1</sup> de Pb. En raíces y hojas el crecimiento de *B. napus* no se vio afectado. A partir del análisis de masa seca de granos relativa a la biomasa total, se concluyó que el desarrollo de la planta tampoco fue afectado por las distintas concentraciones de Pb en suelo. Por lo tanto, la hipótesis de un efecto negativo del Pb en suelo sobre el crecimiento y desarrollo de *Brassica napus* sólo resultó validada para el crecimiento de los tallos en la etapa de inicio de la fructificación.

*Brassica napus* incorporó Pb del suelo luego de una contaminación reciente. Se detectó Pb en hojas en las etapas IFr y MF para todas las concentraciones de Pb en suelo estudiadas. Además en la etapa MF, se detectó Pb en granos en el 50 % de los casos para la concentración de 200 mg kg<sup>-1</sup> de Pb en suelo. Los valores de Pb en hojas escindidas por la planta previamente a la etapa IFr resultaron mayores a los detectados en IFr en hojas no escindidas. Aun así, para verificar la hipótesis de acumulación diferencial de Pb en distintas etapas de crecimiento, debería analizarse el Pb biodisponible en suelo periódicamente entre el momento de la siembra y la etapa IFr, y luego establecer el FBC para cada período. Por otra parte, los valores determinados en IFr fueron menores a los detectados en MF en hojas no escindidas, pero esto no pudo ser confirmado estadísticamente.

En las plantas crecidas en suelos con contaminación preestablecida no se detectó presencia de Pb en hojas, lo que se corresponde con la ausencia de Pb en la fracción biodisponible informada en el Capítulo 4 de la presente tesis.

A partir del cálculo del factor de bioconcentración, se observó que la capacidad de acumulación en hojas de *B. napus* fue menor a concentraciones más altas de Pb en suelo, en la etapa de inicio de fructificación. Por lo tanto, la hipótesis sobre un incremento de acumulación de Pb en órganos de *B. napus* asociado al aumento de concentración de Pb en suelos no fue validada, al menos para las hojas en la etapa de inicio de fructificación. Resultados similares se determinaron para la etapa de madurez fisiológica, pero estos no pudieron ser analizados estadísticamente, por lo cual no se pudo concluir al respecto.

Estos resultados aportan información valiosa al estudio de *Brassica napus* como especie fitorremediadora de Pb en suelos con contaminación reciente. La acumulación de Pb en hojas respecto del Pb en suelo fue equivalente al encontrado por otros autores para *B. juncea* (especie ampliamente caracterizada para estrategias de remediación), por lo tanto altamente satisfactorio. De todos modos, es importante destacar que su producción en granos no podría utilizarse con fines alimenticios debido a la acumulación del metal en los mismos.

## 5.7. Bibliografía

- A. Ghani. 2011. «Varietal Differences In Canola (*Brassica Napus* L.) For The Growth , Yeild And Yeild Components Exposed To Cadmium Stress». [http://www.thejaps.org.pk/docs/21\(1\)2011/VARIETAL-DIFFERENCES.pdf](http://www.thejaps.org.pk/docs/21(1)2011/VARIETAL-DIFFERENCES.pdf).
- Azimzadeh, Y., M. Shirvani, y H. Shariatmadari. 2014. «Green Manure and Overlapped Rhizosphere Effects on Pb Chemical Forms in Soil and Plant Uptake in Maize/Canola Intercrop Systems: A Rhizobox Study». *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 23 (6): 677-90. doi:10.1080/15320383.2014.861795.
- Bharagava, R.N., R. Chandra, y V. Rai. 2008. «Phytoextraction of Trace Elements and Physiological Changes in Indian Mustard Plants (*Brassica Nigra* L.) Grown in Post Methanated Distillery Effluent (PMDE) Irrigated Soil». *Bioresource Technology* 99 (17): 8316-24. doi:10.1016/j.biortech.2008.03.002.
- Bilal Shakoore, Muhammad, Shafaqat Ali, Amjad Hameed, Mujahid Farid, Sabir Hussain, Tahira Yasmeen, Ullah Najeeb, Saima Aslam Bharwana, y Ghulam Hasan Abbasi. 2014. «Citric Acid Improves Lead (pb) Phytoextraction in *Brassica Napus* L. by Mitigating Pb-Induced Morphological and Biochemical Damages». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 109 (noviembre): 38-47. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.07.033.
- Briat, Jean-François, y Michel Lebrun. 1999. «Plant responses to metal toxicity». *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* 322 (1): 43-54. doi:10.1016/S0764-4469(99)80016-X.
- Dahmani-Muller, H., F. Van Oort, B. Gelie, y M. Balabane. 2000. «Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter». *Environmental pollution* 109 (2): 231-38.
- Iskandar, I. K., y Mary B. Kirkham. 2001. *Trace Elements in Soil: Bioavailability, Flux, and Transfer*. CRC Press.
- Karak, Tanmoy, Pradip Bhattacharyya, Ranjit Kumar Paul, y D.K. Das. 2013. «Metal Accumulation, Biochemical Response and Yield of Indian Mustard Grown in Soil Amended with Rural Roadside Pond Sediment». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 92 (junio): 161-73. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.03.019.
- Liu, Donghua, Wusheng Jiang, Changjun Liu, Changhong Xin, y Wenqiang Hou. 2000. «Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard [*Brassica juncea* (L.)]». *Bioresource Technology* 71 (3): 273-77.
- R. Hell, y R. Mendel. 2010. «Cell Biology of Metals and Nutrients | Rüdiger Hell | Springer». <http://www.springer.com/la/book/9783642106125>.
- Salazar, M.J., J.H. Rodriguez, G.L. Nieto, y M.L. Pignata. 2012. «Effects of Heavy Metal Concentrations (Cd, Zn and Pb) in Agricultural Soils near Different Emission Sources on Quality, Accumulation and Food Safety in Soybean [*Glycine Max* (L.) Merrill]». *Journal of Hazardous Materials* 233-234: 244-53. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.07.026.

- Solhi, Mahmoud, Hossain Shareatmadari, y Mohammad A. Hajabbasi. 2005. «Lead and zinc extraction potential of two common crop plants, *Helianthus annuus* and *Brassica napus*». *Water, air, and soil pollution* 167 (1-4): 59-71.
- Torri, S., y R. Lavado. 2009. «Plant absorption of trace elements in sludge amended soils and correlation with soil chemical speciation». *Journal of hazardous materials* 166 (2): 1459-65.
- USEPA. *Introduction to Phytoremediation*, in. EPA/600/R-99/107, 2000.

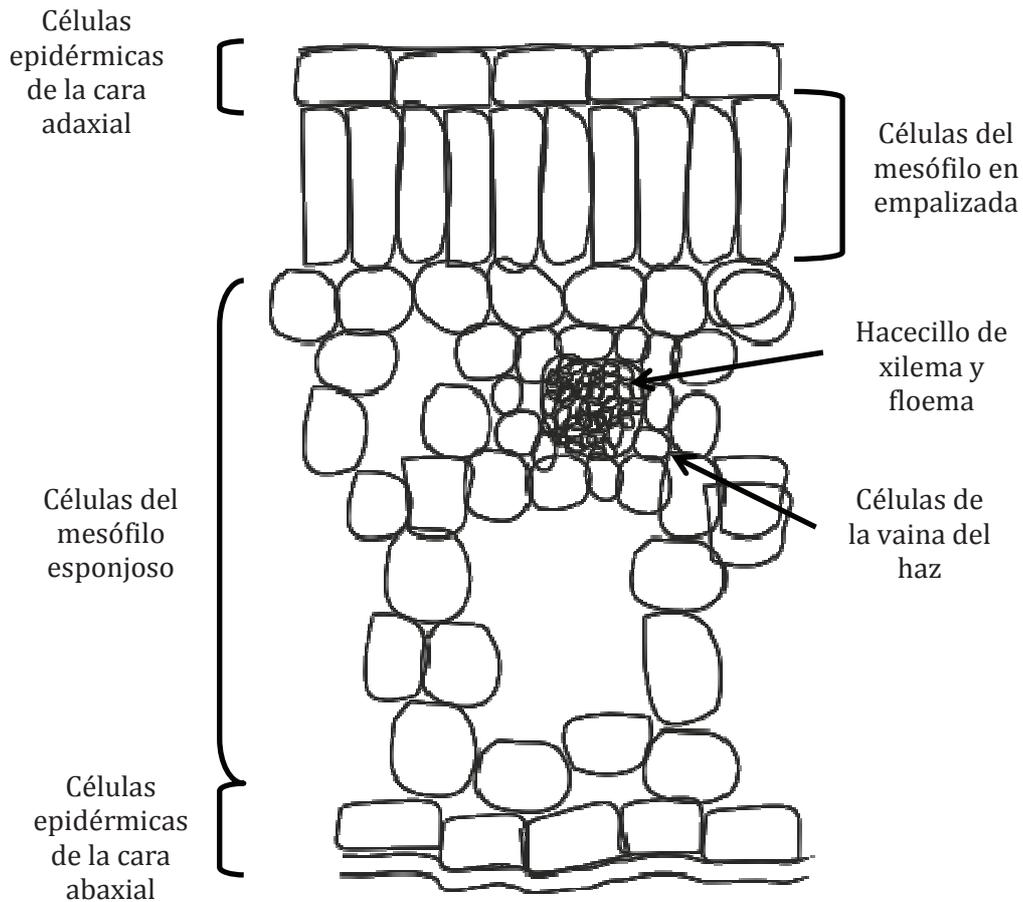
## **6. EFECTOS DEL Pb SOBRE ÓRGANOS FOTOSINTÉTICOS DE *BRASSICA NAPUS***

### 6.1. Introducción

Distintos autores han informado efectos negativos sobre la tasa fotosintética en plantas de diversas especies crecidas en soluciones con altas concentraciones de Pb, Cd, y Cu, entre otros metales pesados (Briat y Lebrun 1998). Este efecto se asocia a la destrucción de la ultra estructura de los cloroplastos, la disminución en concentración de clorofilas a y b, y a la disminución de la actividad antioxidativa de la catalasa (Islam et al. 2008, Ali et al. 2013; Tian et al. 2014). Algunos de estos efectos se estudiaron en el presente trabajo para *Brassica napus* cultivada en los suelos ya descritos.

#### *Estructura general de las hojas*

La anatomía foliar de *Brassica napus* se esquematiza en la Figura 6.1.1, con los tejidos típicos de una dicotiledónea. Comenzando la descripción por la cara adaxial, se encuentra la epidermis con células de pared externa engrosada, protegida por una fina cutícula que evita la pérdida de humedad. Luego, el mesófilo en empalizada, con células cilíndricas dispuestas adyacentemente entre sí y de modo perpendicular a la epidermis; estas células poseen un alto contenido de cloroplastos. Debajo se encuentra el mesófilo esponjoso, con células dispuestas al azar y separadas entre sí por espacios de aire; poseen un menor contenido de cloroplastos. Por último se ubica la epidermis de la cara abaxial, donde se encuentran los estomas. Además, entre los mesófilos, se encuentran los haces de xilema y floema, rodeados por las células de la vaina (Cutler et al., 2008).

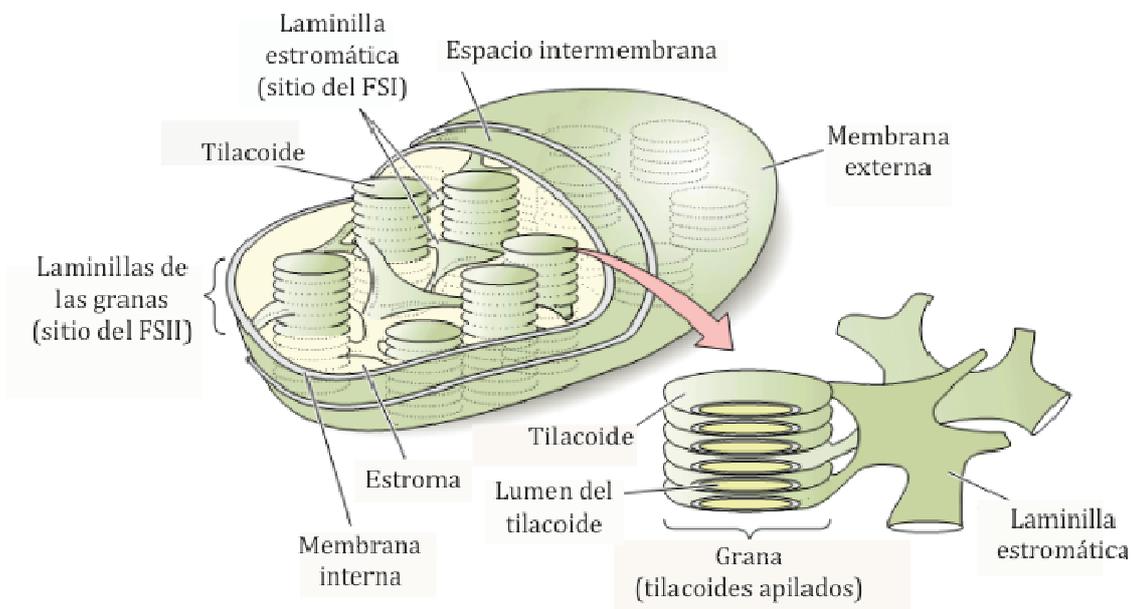


**Figura 6.1.1:** Esquema de la anatomía foliar típica de una dicotiledónea.

### *Ultraestructura de la célula vegetal y fotosíntesis*

Las células vegetales poseen pared celular, membrana celular y citoplasma. En el citoplasma se ubican las organelas típicas: núcleo, mitocondrias, retículo endoplasmático (liso y rugoso), aparato de Golgi, peroxisomas, vacuola y cloroplastos. En las plantas superiores, las células del mesófilo son las fotosintéticamente más activas; se caracterizan por poseer gran cantidad de cloroplastos, los cuales contienen clorofila, el pigmento especializado en la absorción de la luz. La energía solar provoca la oxidación del agua y la reducción de dióxido de carbono (con liberación de oxígeno), lo que permite luego la síntesis de compuestos carbonados, principalmente azúcares.

Las reacciones por las cuales se obtienen compuestos de alta energía (ATP y NADPH) suceden en los tilacoides, sacos membranosos aplanados que se apilan conformando las grana. Estas reacciones son llevadas a cabo por complejos fotoquímicos denominados fotosistemas. Las moléculas de NADPH y ATP luego se utilizan en la síntesis de los compuestos carbonados, reacciones que ocurren en el estroma de los cloroplastos (región acuosa que rodea los tilacoides) (Taiz y Zeiger 2010). En la Figura 6.1.2 se presenta la estructura del cloroplasto, donde se puede observar la organización de las membranas y cuerpos membranosos, así como la ubicación de los fotosistemas I y II.

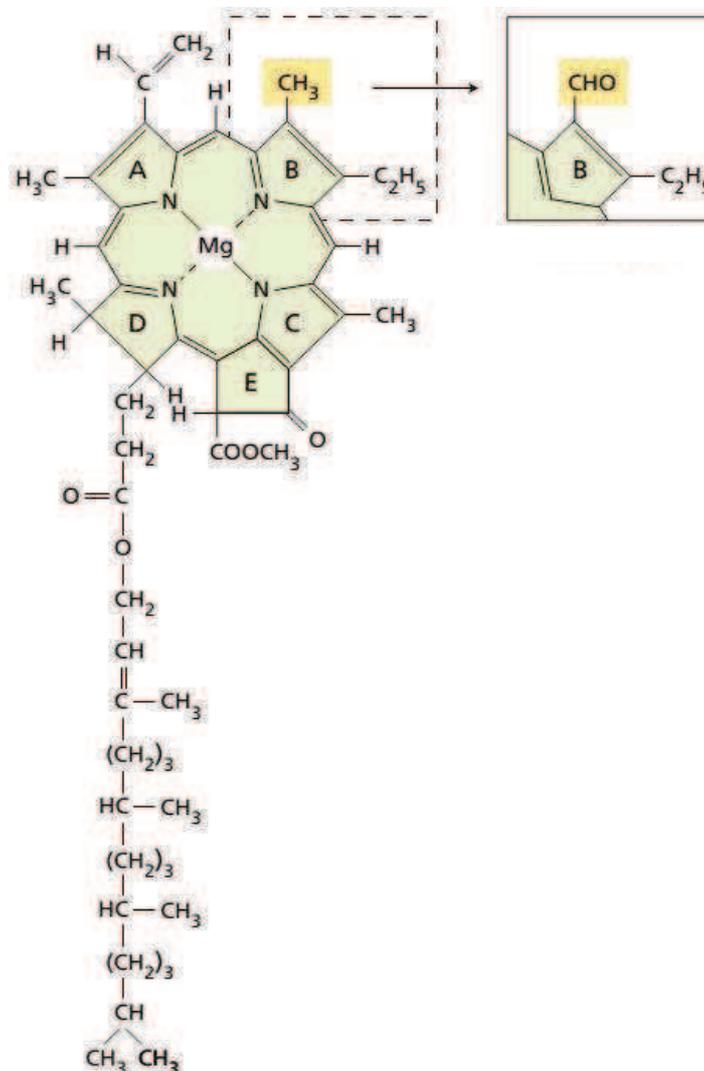


**Figura 6.1.2:** Esquema de la organización de las membranas y cuerpos membranosos del cloroplasto. Se muestra la ubicación de los fotosistemas I y II (FSI y FSII). Figura extraída y modificada de Taiz y Zeiger, (2010).

### *Fitopigmentos*

Los pigmentos fotosintéticamente activos, ubicados en los cloroplastos, absorben la luz solar en primera instancia. Las clorofilas a y b son abundantes en las hojas de plantas superiores. Poseen una estructura de anillo químicamente compleja, con un átomo de Mg en el centro, y pertenecen al grupo

de las porfirinas. Además, poseen una larga cola de hidrocarbonada unida al anillo (Figura 6.1.3), que ancla la molécula a la porción hidrofóbica de su entorno, como son las membranas de los tilacoides. La estructura de anillo contiene algunos electrones débilmente ligados, y es la parte de la molécula involucrada en las transiciones de electrones y en las reacciones redox (Taiz y Zeiger 2010). En los tilacoides también se encuentran presentes los carotenos, los cuales absorben luz y transfieren esta energía a las clorofilas en el proceso fotosintético, formando parte de los llamados *complejos antena*, asociados a los fotosistemas.



**Figura 6.1.3:** Molécula de clorofila-a y clorofila-b; se muestra el cambio del metilo (clo-a) por el aldehído (clo-b). Figura extraída de Taiz y Zeiger, (2010).

Las antocianinas, del griego *anthos* (flor) y *kyanos* (azul oscuro) son pigmentos que dan color a las flores (rojo, púrpura y azul). Se encuentran en las frutas, tallos y hojas, y no poseen actividad fotosintética. Su acumulación en hojas está asociada a factores ontogenéticos (hojas en crecimiento y senescentes), abióticos (deficiencia de nutrientes y luz UV) y bióticos (herbivoría y agentes patógenos) (Close y Beadle 2003).

## 6.2. Objetivos

i) Estudiar el efecto de la acumulación de Pb en hojas de *Brassica napus* en su ultraestructura celular.

ii) Estudiar el efecto del Pb sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de *Brassica napus*, analizando las etapas ontogénicas IFr y MF.

iii) Estudiar el efecto del Pb sobre el contenido de antocianinas en hojas de *Brassica napus*, analizando las etapas ontogénicas IFr y MF.

## 6.3. Hipótesis

i) La acumulación de Pb en hojas de *Brassica napus* altera la organización de las membranas de los cloroplastos.

ii) El cultivo de *Brassica napus* en suelos con Pb afecta negativamente su producción de pigmentos fotosintéticos, en las etapas ontogénicas IFr y MF.

iii) El cultivo de *Brassica napus* en suelos con Pb provoca un aumento en su producción de antocianinas, en las etapas ontogénicas IFr y MF.

**6.4. Materiales y métodos***Diseño experimental*

El diseño experimental se describió en la sección 4.4 de la presente tesis.

El mismo se sintetiza en la siguiente tabla:

**Tabla 4.4.3:** Tratamientos realizados en el ensayo de especiación de Pb en suelo en cultivo de *B. napus*. Para cada tratamiento se indica el suelo utilizado y el número de réplicas.

<b>Tratamiento</b>	<b>Suelo utilizado</b>	<b>Nro. de réplicas</b>
C0, 0 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	Argiudol Vértico, Pcia. Bs. As., sin Pb	10
CR-50, 50 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	Argiudol Vértico, Pcia. Bs. As., con Pb	10
CR-100, 100 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	Argiudol Vértico, Pcia. Bs. As., con Pb	10
CR-200, 200 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	Argiudol Vértico, Pcia. Bs. As., con Pb	10
CP-17, 17 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	Natracualf Típico, Pcia. Sta. Fe, con Pb	4
CP-32, 32 mg kg <sup>-1</sup> de Pb	Natracualf Típico, Pcia. Sta. Fe, con Pb	6

Como se describió en la sección 4.4, las cosechas se realizaron acordes a las etapas ontogénicas de *B. napus*: en IFr (luego de 100 días de la siembra) y en MF (luego de 140 días de la siembra).

*Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)*

Para el estudio del efecto del metal sobre la ultraestructura celular, se realizaron observaciones mediante microscopía electrónica de transmisión.

Para ello se tomaron muestras de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup> de: hojas, tallos y vainas en la etapa ontogénica de madurez fisiológica. Las mismas se extrajeron de la planta con bisturí, previamente a su cosecha, luego se seccionaron en muestras de 1 mm<sup>2</sup> y se lavaron con agua destilada. Inmediatamente se colocaron en solución fijadora (2,5 % paraformaldehído y 2 % glutaraldehído, en buffer fosfato 0,1 M, pH = 7,4). Se dejó reposar por 48 hs. Luego se lavaron con buffer fosfato 0,1 M, pH = 7,4, y se preservaron en el mismo hasta su posterior tratamiento con osmio, inclusión en resina y corte con micrótopo, trabajo realizado por el Laboratorio Nacional de Investigación de Servicios y Microscopía Electrónica (LANAIS-MIE). Las muestras se observaron con microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 109T, equipado con cámara digital Gatan ES1000W.

*Espectrometría UV*

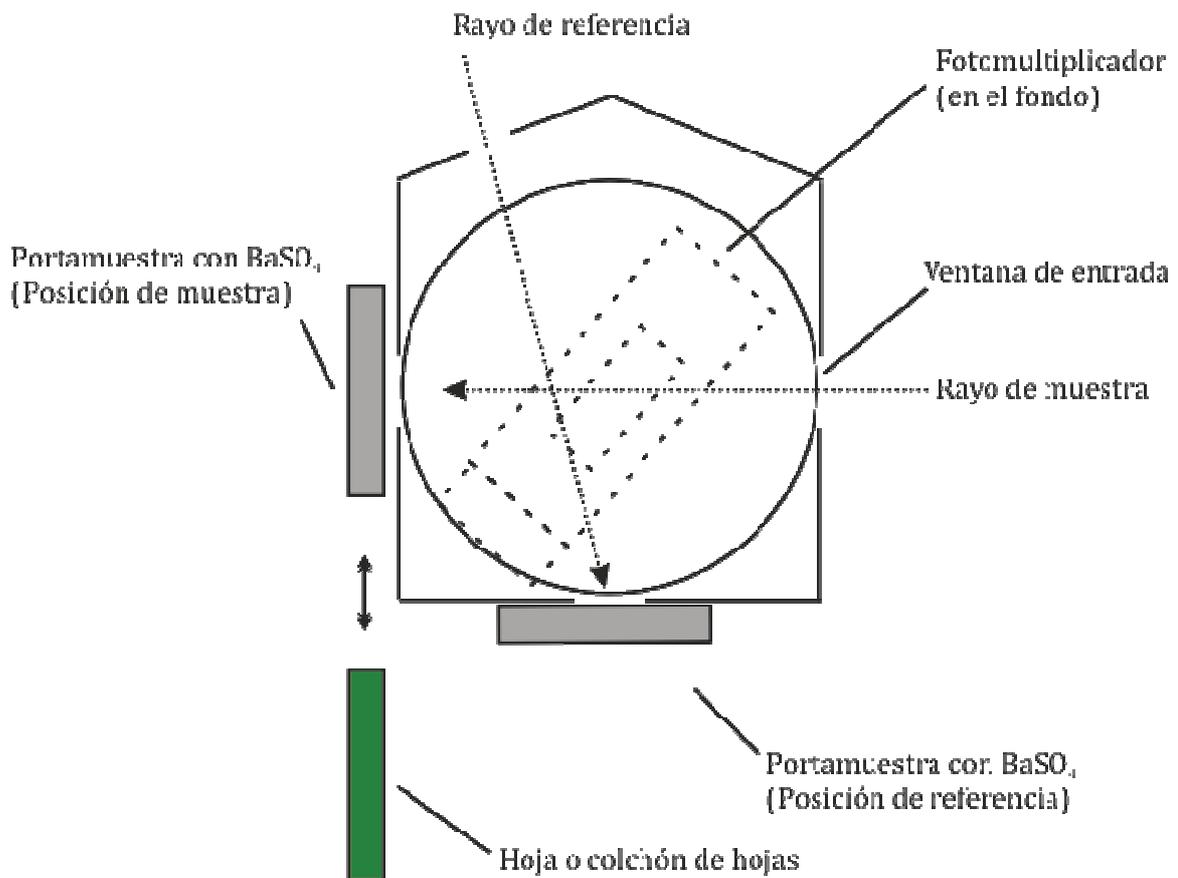
Para el estudio de las variaciones en el contenido de pigmentos, se utilizó una técnica de cuantificación no destructiva mediante espectrometría UV.

Para ello se cosecharon las hojas de una planta por cada concentración de Pb en suelo C0 y CR en las dos etapas ontogénicas estudiadas (IFr y MF) y de las plantas crecidas en suelo CP en la etapa MF. Las mismas se lavaron con agua destilada y se conservaron en bolsas plásticas en freezer. Para al análisis con espectrómetro UV las hojas se sacaron del freezer con 20 minutos de anticipación, se lavaron con agua destilada, se secaron con papel *tissue* sin afectar a los tejidos y se mantuvieron en oscuridad hasta la detección.

La determinación se realizó en un espectrómetro Shimadzu UV3101PC utilizando una esfera integradora Shimadzu ISR-3100 (Figura 6.4.1) (Gabriela Beatriz Cordon 2009). Se obtuvieron los espectros de reflectancia difusa en

función de la longitud de onda para las hojas montadas en colchón, resultando de este modo transmitancia igual a cero. La esfera integradora permite determinar la componente difusa de la reflectancia debido a que el ángulo del haz incidente sobre la muestra es de cero grados, por lo que la luz reflejada en forma especular es eliminada por la ventana de entrada.

Para ajustar el 100% de reflectancia se utilizó como estándar de referencia sulfato de bario. La línea de base se realizó colocando los portamuestras con sulfato de bario en la posición de referencia y en la posición de muestra. Luego, se intercambié el portamuestras de la posición de muestra por el colchón de hojas y se determinaron los espectros. La reflectancia se midió como función de la longitud de onda, entre 300 y 2500 nm.



**Figura 6.4.1:** Esquema de la esfera integradora Shimadzu ISR-3100. Figura adaptada de Cordon (2009).

*Función de remisión y concentración de pigmentos*

Los resultados obtenidos en %R (porcentaje de reflectancia) se transformaron a F(R) (función de remisión) mediante la siguiente ecuación:

$$F(R) = (1 - R_{\infty})^2 / 2 * R_{\infty} \quad (1)$$

donde  $R_{\infty}$  es la reflectancia difusa en condiciones de transmitancia nula, de acuerdo a la aplicación de la teoría de Kubelka-Munk y del modelo de Pila de Placas en el estudio de reflectancia de hojas vegetales (Gabriela B. Cordon y Lagorio 2007, Cordon et al., 2010).

La determinación de las concentraciones de clorofila-a, clorofila-b y clorofila total en hojas ( $\text{mmol cm}^{-2}$ ) se realizó a partir del uso de las siguientes ecuaciones, de acuerdo a las correlaciones estudiadas y parámetros obtenidos por (Gabriela Beatriz Cordon 2009):

$$\text{Clorofila-a} = 8,3 \times 10^{-7} + 1,1 \times 10^{-5} * F(R)_{700\text{nm}} \quad (R^2 = 0,972) \quad (2)$$

$$\text{Clorofila-b} = 1,8 \times 10^{-6} + 4,3 \times 10^{-6} * F(R)_{700\text{nm}} \quad (R^2 = 0,965) \quad (3)$$

$$\text{Clorofila total} = 2,6 \times 10^{-6} + 1,5 \times 10^{-5} * F(R)_{700\text{nm}} \quad (R^2 = 0,976) \quad (4)$$

Además, sobre las mismas muestras se determinó el contenido de agua, con el fin de analizar un posible efecto de dilución o de concentración en la evaluación del contenido de pigmentos. Se utilizó la correlación y parámetros obtenidos por Cordon (2009):

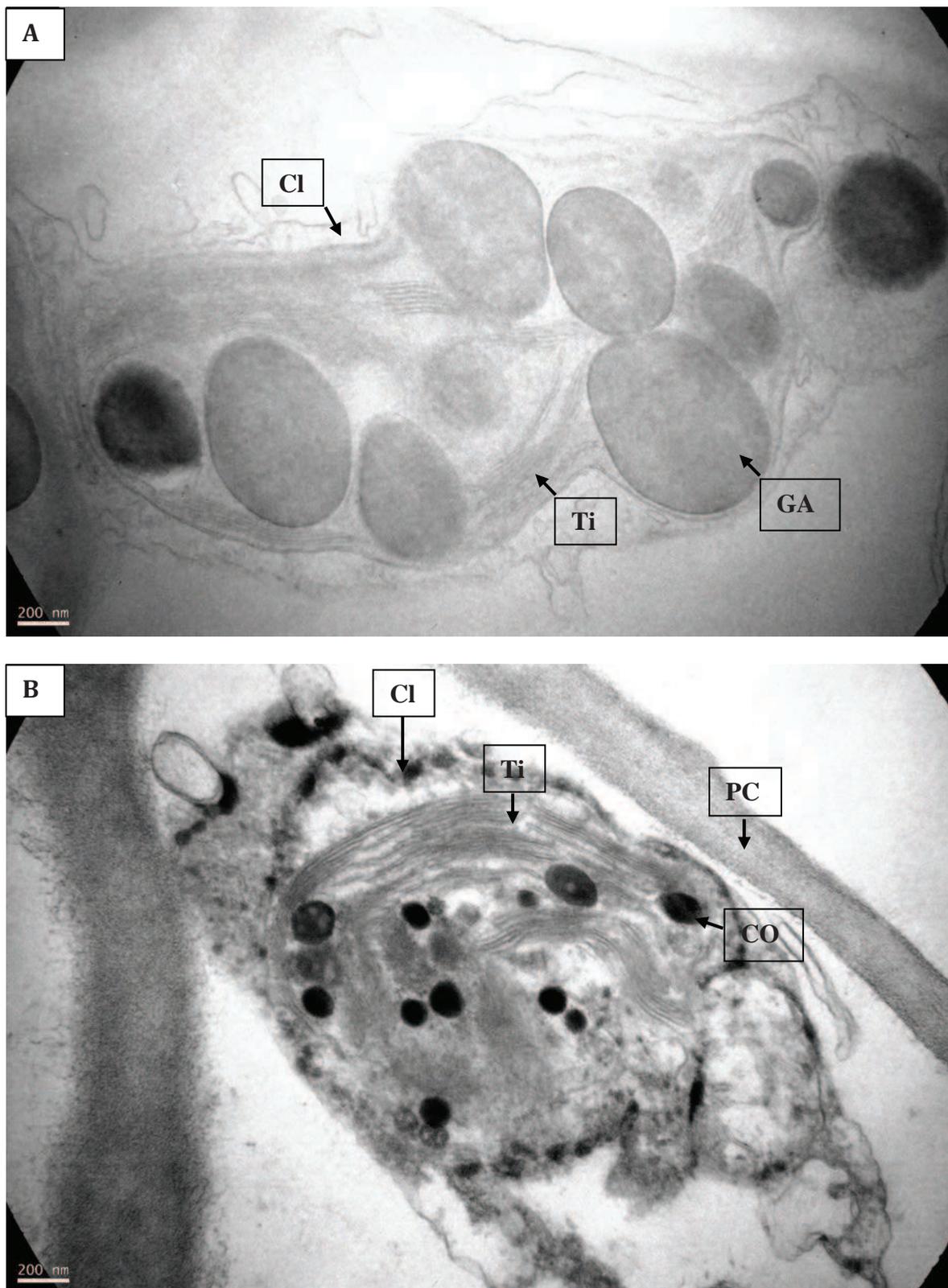
$$\text{Agua} = 2,0 \times 10^{-4} + 3,0 \times 10^{-4} * F(R)_{1456\text{nm}} \quad (R^2 = 0,938) \quad (5)$$

## 6.5. Resultados y discusión

### Efectos en la ultraestructura celular

En la Figura 6.5.1 se muestran ejemplos de las micrograffías obtenidas con microscopio electrónico de barrido de las hojas de plantas crecidas en suelo C0 (A) y de las crecidas en suelo CR-200 (B). En (A) puede observarse un cloroplasto intacto, con su doble membrana, tilacoides apilados en grana, y gránulos de almidón de gran tamaño; no se observa la membrana celular ni la pared celular con claridad. En (B) se observa la pared celular, pero no se observa la membrana celular asociada a ésta; además se ve el cloroplasto desorganizado; dentro del cloroplasto se observan: tilacoides y grana desorganizados, no se distinguen gránulos de almidón pero se observa la presencia de cuerpos osmeofílicos (lo que puede adjudicarse a cuerpos lipídicos o a deposiciones de Pb). Estos cuerpos se observan también alrededor del cloroplasto, pero no se observa claramente si corresponde a la vacuola deformada o al citoplasma celular igualmente deformado. (Yaryura et al. 2009).

Tian y colaboradores (2014) han reportado daño total en células del mesófilo de hojas de *B. napus* luego de 15 días de cultivo en soluciones con altas concentraciones de Pb; por microscopía electrónica de transmisión han observado pared y membrana celular fusionadas, daños en membranas de los tilacoides, ausencia de gránulos de almidón, entre otros. En un estudio con el mismo diseño experimental pero con Cd, Ali y colaboradores (2013) informaron desorganización del cloroplasto, así como el deterioro celular y presencia de deposiciones metálicas en células del mesófilo de hojas de *B. napus*; a diferencia del efecto de Pb, ellos han observado en los cloroplastos un incremento de gránulos de almidón en las células de las plantas crecidas en soluciones con Cd.



**Figura 6.5.1:** Micrografías de transmisión electrónica. Corte de hojas de *B. napus* crecidas en CO (A) y en CR-200 (B). Aumento 50 K X. Se observa la ultraestructura del cloroplasto y parcialmente el resto de la célula. Cl: cloroplasto, Ti: tilacoides, GA: gránulo de almidón, PC: pared celular, CO: cuerpo osmeofílico.

*Efectos en el contenido de ftopigmentos*

*Inicio de la Fructificación*

El espectro de F(R) en función de la longitud de onda de las hojas de plantas crecidas en suelo C0 y en suelos CR se muestra en la Figura 6.5.2, y detalles de algunas zonas se presentan en las Figuras 6.5.3 y 6.5.4. Estos resultados corresponden a la etapa ontogénica IFr.

Entre los 500 y 600 nm de longitud de onda los valores de F(R) correspondientes al tratamiento C0 resultaron menores que los correspondientes a los tratamientos CR (Figura 6.5.3); estas diferencias son significativas entre los 530 y 570 nm. Dado que las antocianinas absorben aproximadamente a los 530 nm, estas diferencias sugieren un aumento de contenido de este pigmento en las plantas crecidas en suelos CR-50, CR-100 y CR-200 en la etapa ontogénica inicio de la fructificación. Otros autores ya han observado en *Brassica napus* el aumento de la concentración de antocianinas en situación de estrés por deficiencia de P (Yaryura et al. 2009).

Entre los 600 y 700 nm de longitud de onda se observa un aumento significativo de la señal de las plantas crecidas en CR-100 respecto de las crecidas en C0. Esta región del espectro (Figura 6.5.4) se encuentra asociada a la absorbancia de clorofilas y se analizó detalladamente mediante la cuantificación de los pigmentos.

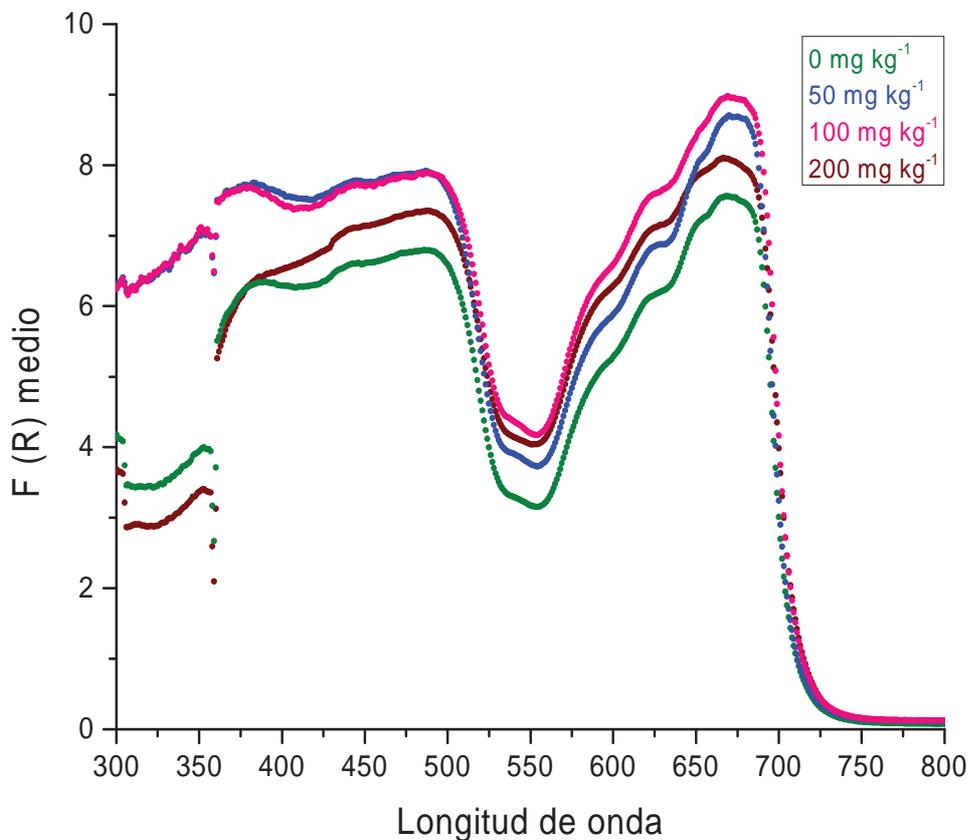
*Madurez Fisiológica*

El espectro de F(R) en función de la longitud de onda de las hojas de plantas crecidas en suelos C0, CR-50, CR-200, CP-17 y CP-32, correspondiente a la etapa ontogénica madurez fisiológica se muestra en la Figura 6.5.5, con detalles en algunos rangos más acotados en las Figuras 6.5.6 y 6.5.7.

Entre los 500 y 600 nm de longitud de onda se observan valores de F(R) altos para la planta crecida en suelo CP-17, mientras que los valores obtenidos para las plantas crecidas en CP-32 fueron los más bajos (Figura 6.5.6). Estos

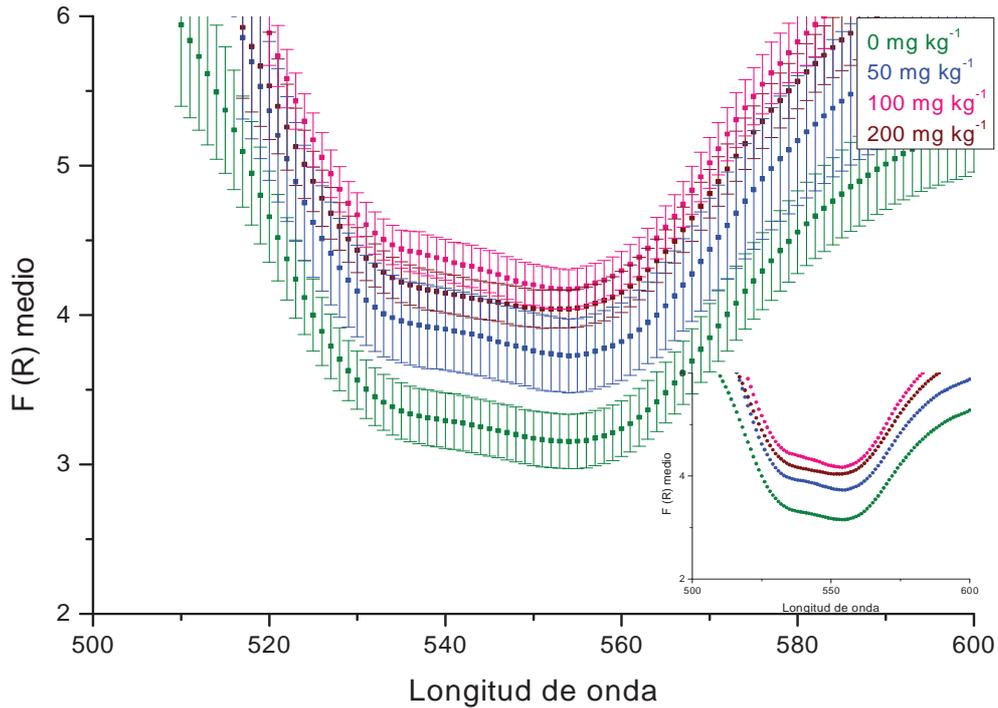
resultados se muestran con fines informativos, ya que no son comparables con las plantas cultivadas en suelo C0 o CR debido a las diferencias estructurales y físicoquímicas de los suelos utilizados.

En la zona entre los 600 y 700 nm de longitud de onda se observan valores menores de F(R) para las plantas crecidas en suelos CR-50 y CR-200 respecto del tratamiento control. Además la planta crecida en suelo CP-32 presentó valores bajos, mientras que la planta correspondiente al tratamiento CP-17 presentó los valores más altos (Figura 6.5.7). Estos resultados se analizaron detalladamente mediante la cuantificación de los pigmentos. Los resultados obtenidos para las plantas cultivadas en suelos CR y C0 no son comparables con los obtenidos para las cultivadas en suelos CP, debido a las diferencias estructurales y físicoquímicas de los mismos.

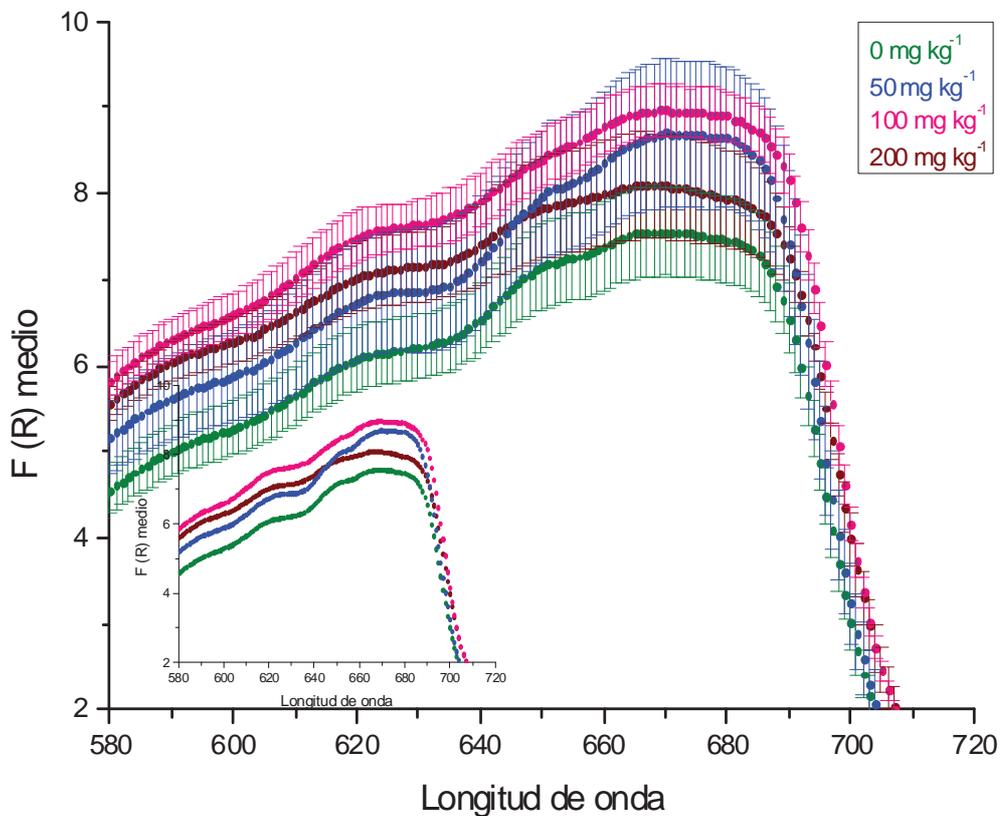


**Figura 6.5.2:** Espectro UV entre 300 y 800 nm de hojas de plantas crecidas en suelo C0 y en suelo CR con concentraciones de 50, 100 y 200 mg kg<sup>-1</sup> de Pb. Etapa ontogénica IFr. Se muestran los valores medios de las determinaciones realizadas sobre colchón de hojas.

## Cambios en la ultraestructura celular y en el contenido de fitopigmentos

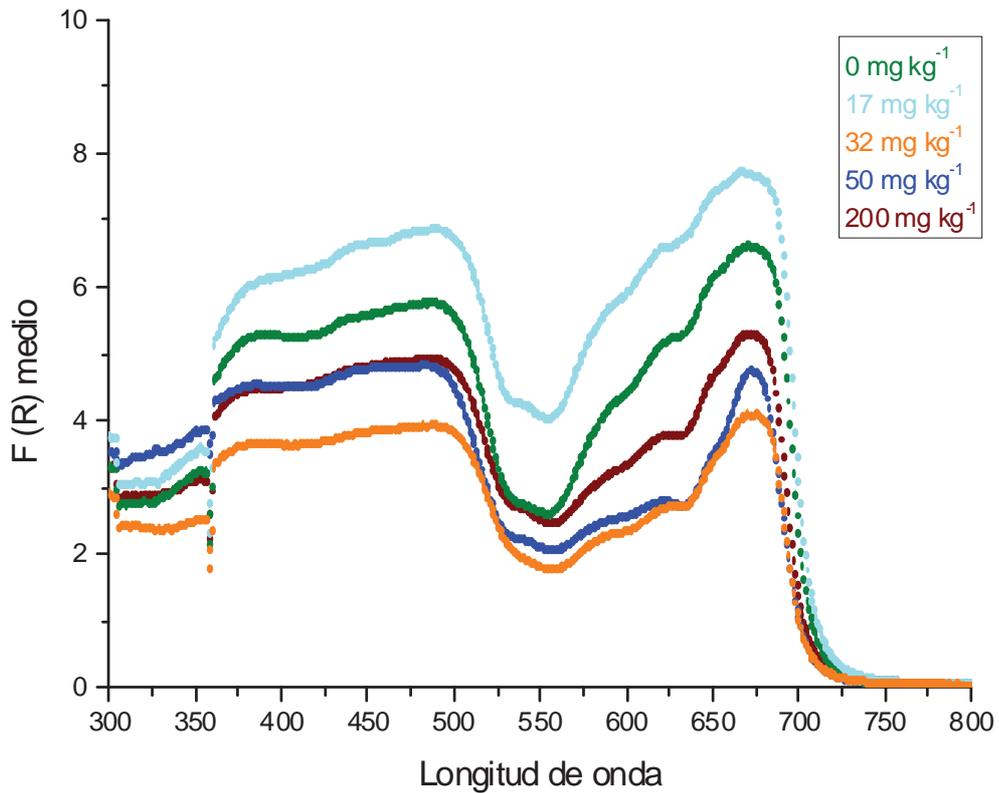


**Figura 6.5.3:** Espectro UV entre 500 y 600 nm de hojas de plantas crecidas en suelo C0 y en suelo CR con concentraciones de 50, 100 y 200 mg kg<sup>-1</sup> de Pb. Etapa ontogénica IFR. Se muestran los valores medios (también en el inserto) y su EEM, de las determinaciones realizadas sobre colchón de hojas.

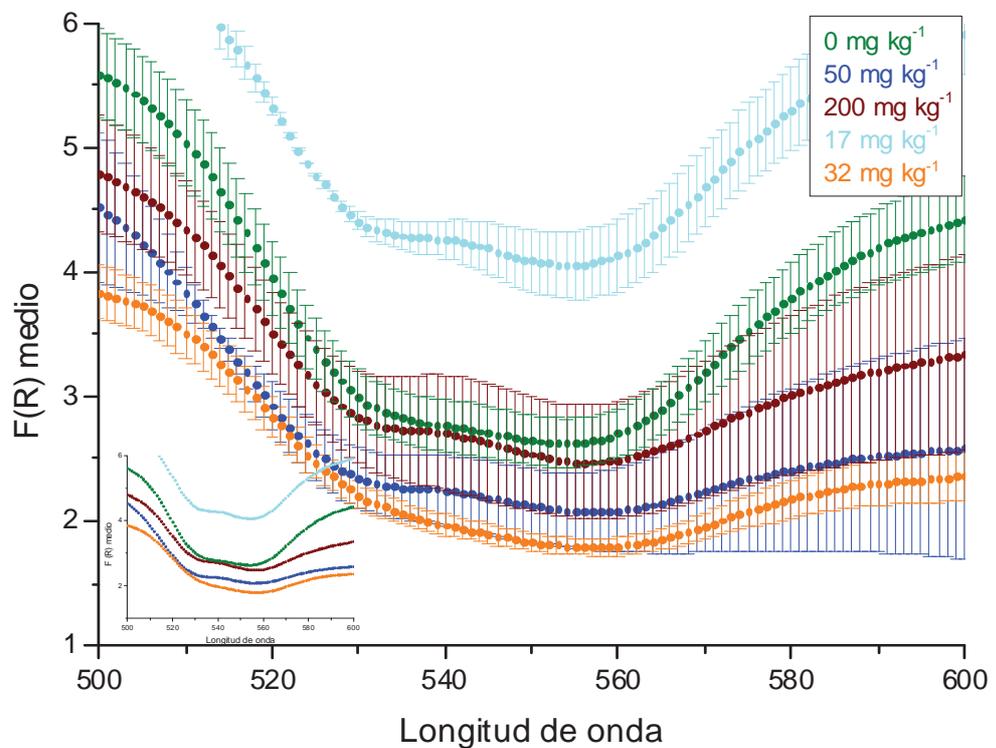


**Figura 6.5.4:** Espectro UV entre 580 y 720 nm de hojas de plantas crecidas en suelo C0 y en suelo CR con concentraciones de 50, 100 y 200 mg kg<sup>-1</sup> de Pb. Etapa ontogénica IFR. Se muestran los valores medios (también en el inserto) y su EEM, de las determinaciones realizadas sobre colchón de hojas.

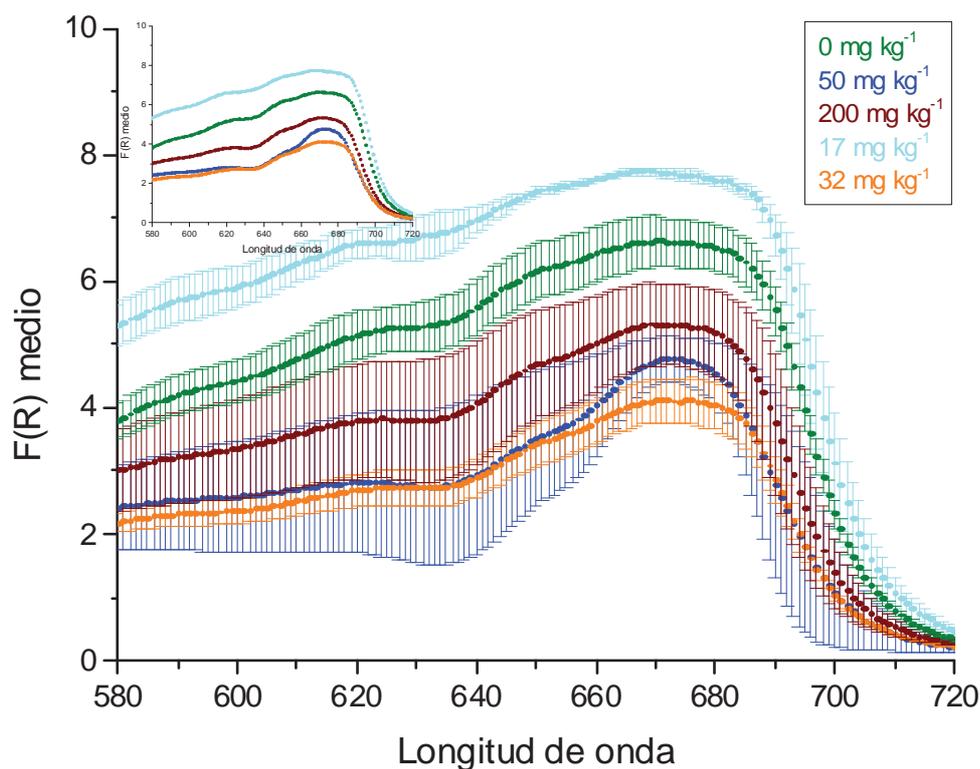
Cambios en la ultraestructura celular y en el contenido de fitopigmentos



**Figura 6.5.5:** Espectro UV entre 300 y 800 nm de hojas de plantas crecidas en suelos C0, CR-50, CR-200, CP-17 y CP-32. Etapa ontogénica MF. Se muestran los valores medios de las determinaciones realizadas sobre colchón de hojas.



**Figura 6.5.6:** Espectro UV entre 500 y 600 nm de hojas de plantas crecidas en suelos C0, CR-50, CR-200, CP-17 y CP-32. Etapa ontogénica MF. Se muestran los valores medios (también en el inserto) de las determinaciones realizadas sobre colchón de hojas y su EEM.



**Figura 6.5.7:** Espectro UV entre 580 y 720 nm de hojas de plantas crecidas en suelos C0, CR-50, CR-200, CP-17 y CP-32. Etapa ontogénica MF. Se muestran los valores medios (también en el inserto) de las determinaciones realizadas sobre colchón de hojas y su EEM.

#### *Cuantificación del contenido de clorofilas*

Luego de obtenidos los espectros se calcularon los contenidos de clorofila-a, clorofila-b y clorofila total, según las ecuaciones (2 - 4). Los resultados se muestran en la Tabla 6.5.1 y en la Figura 6.5.8.

En la etapa de inicio de la fructificación el contenido de clorofila-a y de clorofila-b resultó significativamente mayor en la planta crecida en suelo CR-100 respecto de las plantas crecidas con los otros tratamientos. Además, en la planta crecida en suelo CR-200, el contenido de clorofila-a resultó mayor al de la planta control. En la etapa de madurez fisiológica los contenidos de clorofila-a, clorofila-b y clorofila total resultaron mayores en la planta control que en las plantas crecidas en suelos CR-50 y CR-200, siendo estos últimos equivalentes. Además, el contenido de clorofila a y b disminuyó para las plantas crecidas en

suelo C0 entre la etapa IFr y la etapa MF, pero esta disminución no fue drástica (Tabla 6.5.1).

Los resultados de contenido de agua, calculados según la ecuación (5), se muestran en la Figura 6.5.9. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en cada etapa ontogénica, excepto para CR-200. Las hojas correspondientes a este tratamiento presentaron un contenido de agua levemente mayor respecto del resto de las plantas estudiadas. Por lo tanto: i) el contenido de agua en las hojas no afectó la determinación de la concentración de pigmentos en los tratamientos C0, CR-50 y CR-100; ii) la disminución en el contenido de clorofilas observado para la planta crecida en el tratamiento CR-200 pudo ser un efecto del mayor contenido de agua en las hojas estudiadas.

Los resultados obtenidos se corresponden con los determinados por otros autores. En *Brassica juncea* Karak et al. (2013) determinaron que luego de 60 días de cultivo (etapa de pleno crecimiento) en suelos con Pb, Cu y Cd, el contenido de clorofila a y b en hojas, fue mayor al determinado en las plantas cultivadas en suelos control; mientras que a los 90 días los mismos disminuyeron drásticamente en todas las plantas excepto en las control. En dicho trabajo, el aumento en el contenido de clorofilas se explica por el incremento en la concentración de antioxidantes, lo que permitiría que la planta tolere las concentraciones de Pb acumuladas en sus hojas. Mientras que la disminución del contenido de clorofilas, luego de 90 días de cultivo, se explica por el aumento de radicales libres en las células estresadas y, consecuentemente, la disminución de la síntesis de clorofilas. Para *Brassica napus* se reportaron resultados en plantas crecidas en soluciones con altas concentraciones de Pb, registrando una reducción en la concentración de clorofila a, b y total respecto de las plantas control, luego de 15 días de tratamiento (Tian et al., 2014). Shakoore et al. (2014) obtuvieron resultados similares en plantas de *Brassica napus* crecidas en soluciones con altas concentraciones de Pb durante 40 días, observaron una disminución en el contenido de clorofila a, b y total en las plantas con el incremento de la concentración de Pb en solución. En los dos últimos trabajos mencionados los

Cambios en la ultraestructura celular y en el contenido de fitopigmentos

autores concluyen que el efecto observado en la concentración de pigmentos y en la ultraestructura celular se debe al estrés causado por el Pb en las hojas, ya que observaron un menor efecto en estos parámetros en presencia de antioxidantes como el ácido aminolevulínico o el ácido cítrico, los cuales entre otros efectos pueden complejar al Pb y disminuir su toxicidad.

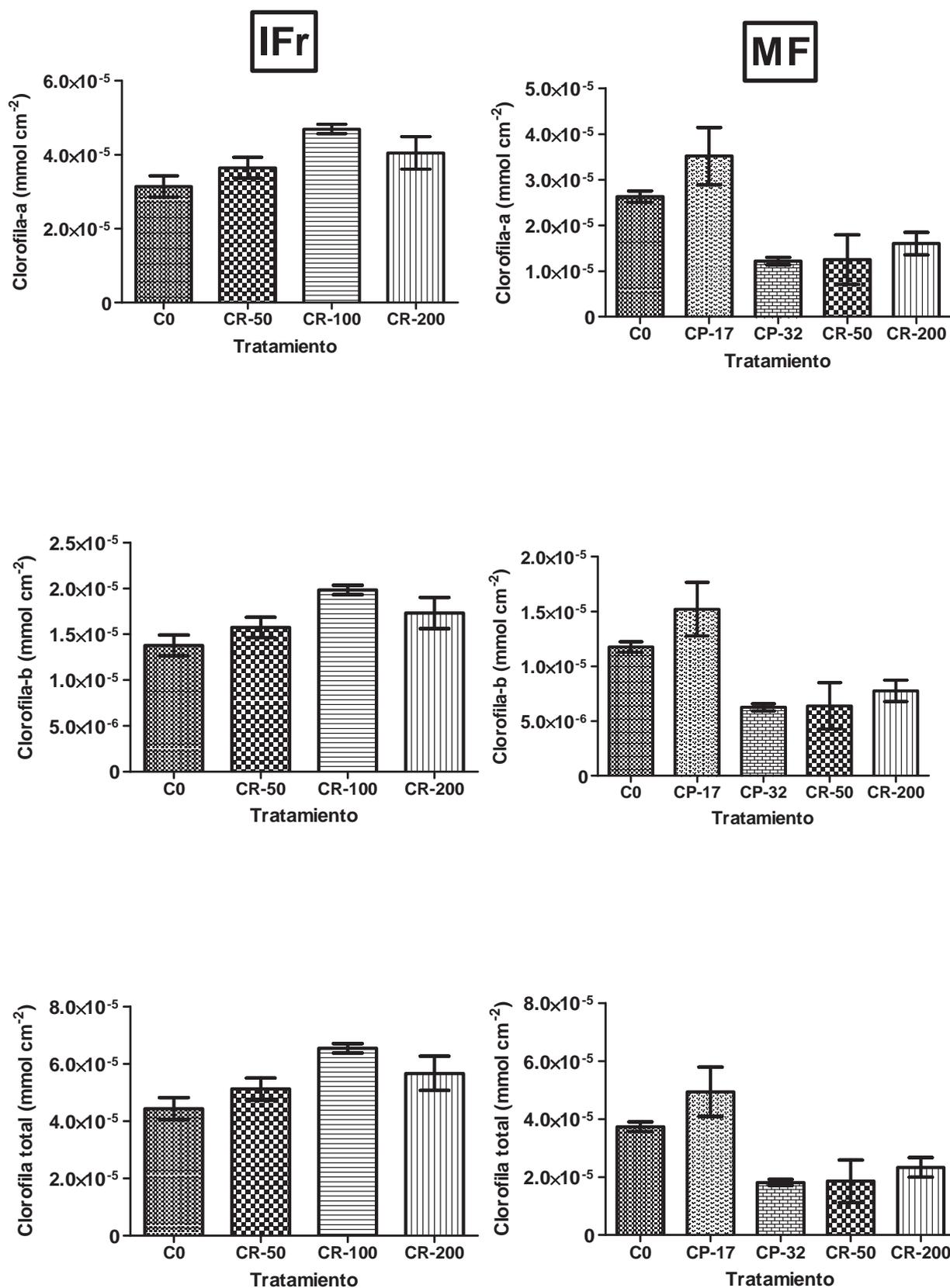
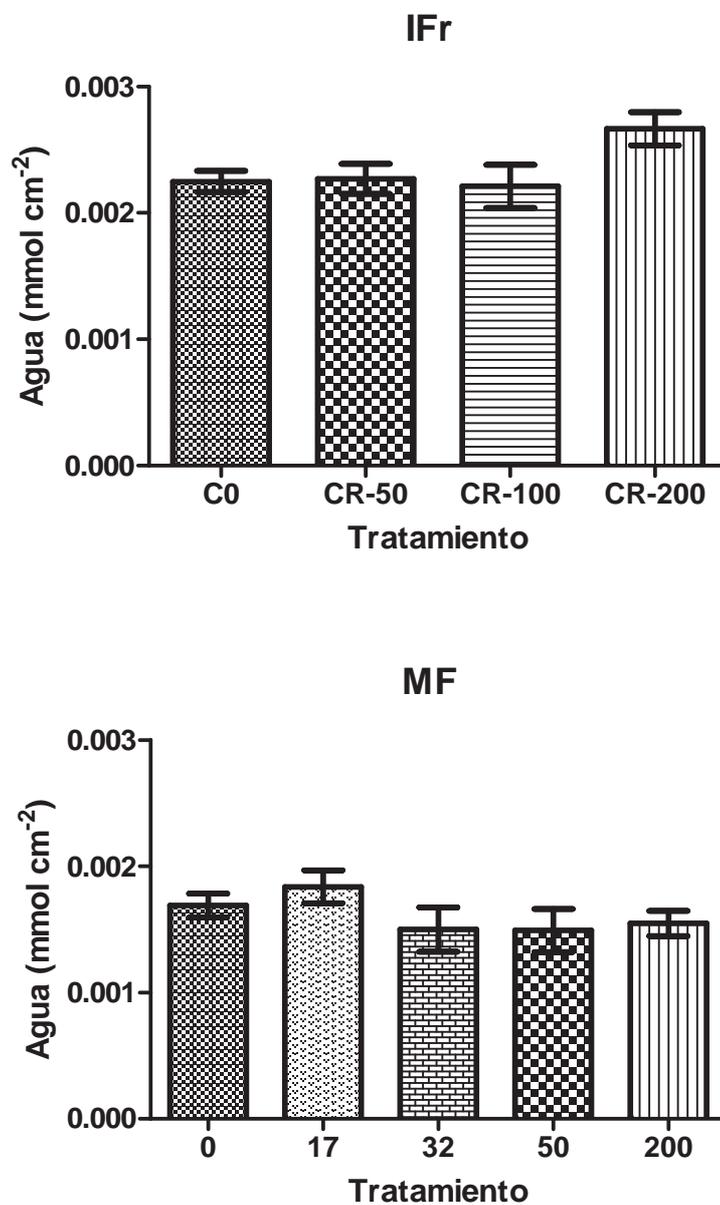


Figura 6.5.8: Contenido medio y su error estándar de clorofila-a, clorofila-b y clorofila total (mmol cm<sup>-2</sup>) en hojas de plantas crecidas en suelos C0, CR-50, CR-100, CR-200, CP-17 y CP-32. N = 1. Etapas ontogénicas IFr (izquierda) y MF (derecha).



**Figura 6.5.9:** Contenido de agua medio y su error estándar (mmol cm<sup>-2</sup>) en hojas de plantas crecidas en suelos C0, CR-50, CR-100, CR-200, CP-17 y CP-32. N = 1. Etapas ontogénicas IFr y MF.

EFFECTO DEL Pb SOBRE ÓRGANOS FOTOSINTÉTICOS DE *BRASSICA NAPUS*

Cambios en la ultraestructura celular y en el contenido de fitopigmentos

**Tabla 6.5.1:** Contenido medio de pigmentos y su EEM (mmol cm<sup>-2</sup>) en hojas de plantas cultivadas en suelos C0, CR y CP, con distintas concentraciones de Pb, cosechadas en las etapas ontogénicas IFr y MF. Letras distintas identifican diferencias significativas de acuerdo al error estándar de la media. Los valores obtenidos para suelos CP no fueron comparados estadísticamente.

Etapa Ontogénica	Tratamiento	Pigmento (mmol cm <sup>-2</sup> )		
		Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total
Inicio de la Fructificación	<b>C0</b>	(3,1 ± 0,3) x 10 <sup>-5</sup> a	(1,4 ± 0,1) x 10 <sup>-5</sup> a	(4,4 ± 0,4) x 10 <sup>-5</sup> a
	<b>CR-50</b>	(3,6 ± 0,3) x 10 <sup>-5</sup> a,c	(1,6 ± 0,1) x 10 <sup>-5</sup> a	(5,1 ± 0,4) x 10 <sup>-5</sup> a
	<b>CR-100</b>	(4,7 ± 0,1) x 10 <sup>-5</sup> b	(2,0 ± 0,5) x 10 <sup>-6</sup> b	(6,5 ± 0,2) x 10 <sup>-5</sup> b
	<b>CR-200</b>	(4,0 ± 0,4) x 10 <sup>-5</sup> c	(1,7 ± 0,2) x 10 <sup>-5</sup> a	(5,7 ± 0,6) x 10 <sup>-5</sup> a,b
Madurez Fisiológica	<b>C0</b>	(2,6 ± 0,1) x 10 <sup>-5</sup> a	(1,2 ± 0,5) x 10 <sup>-6</sup> a	(3,7 ± 0,2) x 10 <sup>-5</sup> a
	<b>CP-17</b>	(3,5 ± 0,6) x 10 <sup>-5</sup>	(1,5 ± 0,2) x 10 <sup>-5</sup>	(4,9 ± 0,9) x 10 <sup>-5</sup>
	<b>CP-32</b>	(1,2 ± 0,1) x 10 <sup>-5</sup>	(0,6 ± 0,3) x 10 <sup>-6</sup>	(1,8 ± 0,1) x 10 <sup>-5</sup>
	<b>CR-50</b>	(1,3 ± 0,5) x 10 <sup>-5</sup> b	(0,6 ± 0,2) x 10 <sup>-5</sup> b	(1,9 ± 0,7) x 10 <sup>-5</sup> b
	<b>CR-200</b>	(1,6 ± 0,2) x 10 <sup>-5</sup> b	(0,8 ± 0,1) x 10 <sup>-5</sup> b	(2,3 ± 0,3) x 10 <sup>-5</sup> b

Por todo lo dicho, es evidente que los efectos observados se deben a la acumulación de Pb en las hojas de *Brassica napus*. El incremento en antioxidantes durante la etapa de crecimiento y el aumento de radicales libres en la etapa de madurez, pueden ser una explicación a los resultados observados. Para corroborar esto, deberían realizarse estudios sobre las actividades enzimáticas y concentraciones de antioxidantes en hojas de *Brassica napus* sometidas a tratamientos equivalentes a los realizados en el presente trabajo.

El contenido de clorofila a, b y total resultaron bajos en la planta crecida en CP-32, mientras que en la planta crecida en suelo CP-17 se obtuvieron los mayores valores de contenido de pigmentos de todas las plantas estudiadas. Estos resultados se atribuyen a las características estructurales y fisicoquímicas de los suelos utilizados (CP). No se adjudican al efecto del Pb ya que éste no fue detectado en las determinaciones de Pb en hojas por espectrometría de absorción atómica (ver Capítulo 5).

## 6.6. Conclusiones

La acumulación de Pb en hojas de *Brassica napus* alteró su ultraestructura celular. Esto se evidenció en las micrografías TEM de las hojas de plantas crecidas en suelo con 200 mg kg<sup>-1</sup> de Pb, observándose un efecto directo en los tilacoides de los cloroplastos.

El análisis mediante espectroscopía UV permitió analizar cualitativamente las variaciones en el contenido de pigmentos en las hojas. Contrariamente a lo esperado, en la etapa de inicio de la fructificación se observó un aumento en el contenido de clorofilas, y el efecto negativo se registró sólo en la etapa de madurez fisiológica para todas las plantas estudiadas. Por lo tanto, la segunda hipótesis planteada resultó validada para la etapa ontogénica MF. Además, el método utilizado permitió realizar la cuantificación de clorofila-a, clorofila-b y clorofila total, utilizando correlaciones publicadas en la literatura.

También, a partir de los espectros UV, pudo evaluarse cualitativamente el contenido de antocianinas. En la etapa de inicio de la fructificación el contenido

resultó mayor en las plantas tratadas, lo que valida la hipótesis planteada. Sin embargo, en la etapa de madurez fisiológica, se observó una disminución en el contenido de antocianinas en las plantas crecidas en suelos con Pb, por lo que la hipótesis planteada no es válida en esta etapa ontogénica.

Los resultados obtenidos sugieren que en la etapa de inicio de fructificación *B. napus* se encuentra en un estado de respuestas antioxidativas al estrés causado por la acumulación de Pb en las hojas. Parte de estas respuestas son el aumento en la síntesis de pigmentos, tanto los involucrados en la actividad fotosintética (clorofilas) como los involucrados directamente en la respuesta antioxidativa (antocianinas). Luego, en la etapa de madurez fisiológica, el efecto ya llega al nivel de la ultraestructura celular, por lo que la síntesis de pigmentos en su conjunto disminuye.

## 6.7. Bibliografía

- Ali, Basharat, B. Wang, Shafaqat Ali, M. A. Ghani, M. T. Hayat, C. Yang, L. Xu, y W. J. Zhou. 2013. «5-Aminolevulinic Acid Ameliorates the Growth, Photosynthetic Gas Exchange Capacity, and Ultrastructural Changes Under Cadmium Stress in Brassica Napus L.» *Journal of Plant Growth Regulation* 32 (3): 604-14. doi:10.1007/s00344-013-9328-6.
- Bilal Shakoor, Muhammad, Shafaqat Ali, Amjad Hameed, Mujahid Farid, Sabir Hussain, Tahira Yasmeen, Ullah Najeeb, Saima Aslam Bharwana, y Ghulam Hasan Abbasi. 2014. «Citric Acid Improves Lead (pb) Phytoextraction in Brassica Napus L. by Mitigating Pb-Induced Morphological and Biochemical Damages». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 109 (noviembre): 38-47. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.07.033.
- Briat, J. F., y M. Lebrun. 1999. «Plant responses to metal toxicity». *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 322(1): 43-54.
- Close, Dugald C., y Christopher L. Beadle. 2003. «The ecophysiology of foliar anthocyanin». *The Botanical Review* 69 (2): 149-61.
- Cordon, Gabriela Beatriz. 2009. «Métodos ópticos no destructivos para monitoreo de salud vegetal». Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_4575\\_Cordon.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4575_Cordon.pdf).
- Cordon, G., S. Grismondi, A. Nievas, y M. G. Lagorio. 2010. «Non-destructive Assessment of Water and Pigments in Leaves from the Remission Function using the Kubelka-Munk Theory». Interim Meeting of the International Color Association.
- Cordon, G. B., y M. G. Lagorio. 2007. «Absorption and scattering coefficients: A biophysical-chemistry experiment using reflectance spectroscopy». *Journal of chemical education* 84 (7): 1167.
- Cutler, D. F., C. E. J. Botha, y D. W. Stevenson. 2008. «Plant anatomy: an applied approach». Oxford: Blackwell.
- Islam, Ejazul, Dan Liu, Tingqiang Li, Xiaoe Yang, Xiaofen Jin, Qaisar Mahmood, Shengke Tian, y Junying Li. 2008. «Effect of Pb Toxicity on Leaf Growth, Physiology and Ultrastructure in the Two Ecotypes of Elsholtzia Argyi». *Journal of Hazardous Materials* 154 (1-3): 914-26. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.10.121.
- Karak, Tanmoy, Pradip Bhattacharyya, Ranjit Kumar Paul, y D.K. Das. 2013. «Metal Accumulation, Biochemical Response and Yield of Indian Mustard Grown in Soil Amended with Rural Roadside Pond Sediment». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 92 (junio): 161-73. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.03.019.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2010. «Plant Physiology» (5th Ed.). Sinauer Associates Inc., Publishers. Sunderland. ISBN 9780878938667
- Tian, Tian, Basharat Ali, Yebo Qin, Zaffar Malik, Rifaqat A. Gill, Shafaqat Ali, y Weijun Zhou. 2014. «Alleviation of Lead Toxicity by 5-Aminolevulinic Acid Is Related to Elevated Growth, Photosynthesis, and Suppressed

Ultrastructural Damages in Oilseed Rape». *BioMed Research International* 2014: 1-11. doi:10.1155/2014/530642.

Yaryura, P., G. Cordon, M. Leon, N. Kerber, N. Pucheu, G. Rubio, A. García, y M. G. Lagorio. 2009. «Effect of Phosphorus Deficiency on Reflectance and Chlorophyll Fluorescence of Cotyledons of Oilseed Rape (*Brassica Napus* L.)». *Journal of Agronomy and Crop Science* 195 (3): 186-96. doi:10.1111/j.1439-037X.2008.00359.x.

# **7. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS**

### 7.1. Conclusiones

El trabajo realizado en la presente Tesis permitió cumplir con los objetivos generales propuestos:

- i) establecer la interacción y evolución del Pb con las distintas fracciones de un típico suelo pampeano, estudiando el efecto de los componentes del suelo y del clima sobre estas interacciones;
- ii) analizar comparativamente el efecto de la rizosfera en la interacción del Pb con las distintas fracciones del suelo, mediante el cultivo de *Brassica napus*;
- iii) estudiar la capacidad extractora y acumuladora de *B. napus* y analizar los posibles efectos del contaminante sobre este cultivo.

Para el estudio de la interacción y evolución del Pb con las distintas fracciones del suelo, se utilizó el horizonte superficial de un Argiudol Vértico de la Provincia de Buenos Aires en dos ensayos, uno en invierno y otro en verano. En su caracterización se encontró que posee una importante proporción de plagioclasas y cuarzo, con un contenido relativamente alto de materia orgánica (2,9 %). El método de Extracción Secuencial Selectiva definido para el estudio de especiación, fue el método de Ma y Uren (1998), con modificaciones realizadas en forma previa específicamente para el suelo estudiado. Se observó que, a lo largo de 60 días, el Pb(II) recientemente adicionado al suelo se adsorbe mayormente a la fracción mineral (con pequeñas cantidades en la forma soluble/intercambiable), pudiendo en esta fracción encontrarse asociado a formas reducibles, fijado en formas estables y/o asociado a materia orgánica; estas últimas dos fracciones varían complementariamente en el tiempo a favor de la fracción mineral. Comparando los ensayos de invierno y de verano, se observó que la especiación del Pb(II) es afectada por los procesos de evaporación de la humedad del suelo. La temperatura ambiente es la variable que juega el rol de mayor importancia en dichos procesos, por lo que en verano la especiación del Pb(II) es más lenta en el tiempo.

A partir del cultivo en invernáculo de *Brassica napus* en los distintos suelos ensayados, y considerando las etapas ontogénicas *inicio de la*

## CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

*fructificación y madurez fisiológica* de la planta, se cumplieron los objetivos ii y iii.

En la etapa de inicio de la fructificación, el contenido total de Pb determinado en suelo rizosférico (Riz) de *Brassica napus* fue mayor al registrado en el suelo no rizosférico (NoR). Además, en el suelo con agregado de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  inmediatamente antes del comienzo del ensayo, se han determinado concentraciones de Pb biodisponible en el suelo rizosférico luego de 100 días. En el mismo sentido, se observó que en la fracción mineral el contenido de Pb en la etapa IFr fue mayor en el suelo Riz que en el suelo NoR. Esto se adjudica a una migración del metal en sus formas intercambiables desde el suelo NoR hacia la rizosfera, debido al gradiente generado por la incorporación del metal por parte de la planta, disminuyendo así la concentración de Pb que luego se incorporaría a formas más estables en la zona NoR del suelo. Por otra parte, el contenido del metal disminuyó entre las etapas IFr y MF, en el suelo rizosférico, lo que resultó consistente con la incorporación del metal en la biomasa de *B. napus*. En los suelos con contaminación pre-establecida no se halló Pb biodisponible al inicio del ensayo ni en las etapas ontogénicas estudiadas. Por lo tanto, se concluye que la especiación del Pb en un suelo recientemente contaminado, es afectada por la rizosfera de *Brassica napus*, en las fracciones intercambiables y mineral del suelo, entre las etapas de inicio de fructificación y de madurez fisiológica.

Se detectó Pb en hojas de las cosechas realizadas en las etapas IFr y MF, para las plantas cultivadas en suelos con contaminación reciente por Pb en todas las concentraciones estudiadas. Además en la etapa MF, se detectó Pb en granos en el 50 % de los casos para la concentración de  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb en suelo. Los valores de Pb en hojas senescentes por la planta previamente a la etapa IFr resultaron mayores a los detectados en IFr en hojas no escindidas, lo que se corresponde con estrategias de tolerancia a elementos tóxicos (Dahmani-Muller et al. 2000). Para concluir sobre una acumulación diferencial de Pb en las distintas etapas de crecimiento, deberían analizarse los cambios en las concentraciones biodisponibles de Pb entre la siembra y la etapa IFr. En las plantas cultivadas en suelos con contaminación preestablecida no se detectó

## CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

presencia de Pb en hojas, lo que se corresponde con la ausencia de Pb en la fracción biodisponible en dichos suelos.

El factor de bioconcentración (Salazar et al. 2012) permitió observar que la capacidad de acumulación en hojas de *B. napus* fue menor a concentraciones más altas de Pb en suelo, en la etapa de inicio de fructificación. En dicha etapa, el crecimiento de los tallos de *Brassica napus* fue afectado negativamente, sólo en suelo con contaminación reciente con 200 mg kg<sup>-1</sup> de Pb.

En la etapa MF se analizó la masa de los granos relativa a la biomasa total, concluyendo que el desarrollo de la planta no fue afectado por las distintas concentraciones de Pb en suelo en los que se cultivó *B. napus*.

La acumulación de Pb en hojas de *Brassica napus* alteró su ultraestructura celular. Esto se evidenció en las micrografías TEM de las hojas de plantas crecidas en suelo con 200 mg kg<sup>-1</sup> de Pb, observándose un efecto directo en los tilacoides de los cloroplastos. El análisis mediante espectroscopía UV permitió analizar cualitativamente las variaciones en el contenido de pigmentos en las hojas. Además, el método utilizado permitió realizar la cuantificación de clorofila-a, clorofila-b y clorofila total, utilizando las correlaciones propuestas por Cordon (2009). Contrariamente a lo esperado, en la etapa de inicio de la fructificación se observó un aumento en el contenido de clorofilas, y el efecto negativo se registró sólo en la etapa de madurez fisiológica para todas las plantas estudiadas.

También, a partir de los espectros UV, pudo evaluarse cualitativamente el contenido de antocianinas. En la etapa de inicio de la fructificación el contenido resultó mayor en las plantas tratadas, lo que era esperable en respuesta al estrés. Sin embargo, en la etapa de madurez fisiológica, se observó una disminución en el contenido de antocianinas en las plantas crecidas en suelos con Pb.

Los resultados obtenidos sugieren que en la etapa de inicio de fructificación *B. napus* se encuentra en un estado de respuestas antioxidativas al estrés causado por la acumulación de Pb en las hojas. Parte de estas respuestas

## CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

son el aumento en la síntesis de pigmentos, tanto los involucrados en la actividad fotosintética (clorofilas) como los involucrados directamente en la respuesta antioxidativa (antocianinas). Luego, en la etapa de madurez fisiológica, el efecto llega al nivel de la ultraestructura celular, por lo que la síntesis de pigmentos en su conjunto, disminuye.

Los resultados presentados en esta tesis aportan información valiosa al estudio de *Brassica napus* como especie fitorremediadora de Pb en suelos con contaminación reciente. La acumulación de Pb en hojas respecto del Pb en suelo fue equivalente al encontrado por otros autores para *B. juncea* (especie ampliamente caracterizada para estrategias de remediación), por lo tanto altamente satisfactorio. Además, se han detectado estrategias de tolerancia frente a la toxicidad del Pb, y se observó un desarrollo de las plantas cultivadas en suelos con Pb equivalente a las cultivadas en suelos sin adición de Pb (control). De acuerdo a las características propuestas por Garbisu y colaboradores (2002) (i- ser tolerantes a altos niveles del metal contaminante, ii- acumular concentraciones medianamente altas o altas del metal, iii- poseer una tasa rápida de crecimiento, iv- producir una biomasa medianamente alta o alta en condiciones naturales, v- poseer un sistema de raíces profuso), *B. napus* cumple satisfactoriamente con las primeras dos, y en el caso de un sistema de cultivo, también con las últimas tres. De todos modos, es importante destacar que su producción en granos no podría utilizarse con fines alimenticios cuando se cultive en suelos con este tipo de contaminación, debido a la acumulación del metal en los mismos.

## 7.2. Perspectivas

Para continuar con el desarrollo de esta línea de investigación, las perspectivas son:

1. Estudiar los efectos del Pb sobre la planta cuando el suelo se contamina en distintas etapas ontogénicas del cultivo.

2. Profundizar el estudio del efecto del Pb en la planta, identificando las formas bioquímicas en que se acumula en la misma, considerando todos los órganos (raíz, tallo, hojas y granos).

3. Extender el estudio en invernáculo a otros cultivos, y analizar el posible efecto sinérgico de absorción del metal debido al ensamble de las rizosferas de los cultivos.

4. Realizar el estudio a campo con *B. napus*, estudiando la bioacumulación con agregado de fertilizantes.

### 7.3. Bibliografía

- Cordon, G. B. 2009. «Métodos ópticos no destructivos para monitoreo de salud vegetal». Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_4575\\_Cordon.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4575_Cordon.pdf).
- Dahmani-Muller, H., F. Van Oort, B. Gelie, y M. Balabane. 2000. «Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter». *Environmental pollution* 109 (2): 231-38.
- Garbisu, Carlos, J. H. Allica, Oihana Barrutia, Itziar Alkorta, y José M. Becerril. 2002. «Phytoremediation: a technology using green plants to remove contaminants from polluted areas». *Reviews on environmental health* 17 (3): 173-88.
- Ma, Y. B., y N. C. Uren. 1998. «Transformations of heavy metals added to soil -- application of a new sequential extraction procedure». *Geoderma* 84 (1-3): 157-68. doi:16/S0016-7061(97)00126-2.
- Salazar, M.J., J.H. Rodriguez, G.L. Nieto, y M.L. Pignata. 2012. «Effects of Heavy Metal Concentrations (Cd, Zn and Pb) in Agricultural Soils near Different Emission Sources on Quality, Accumulation and Food Safety in Soybean [Glycine Max (L.) Merrill]». *Journal of Hazardous Materials* 233-234: 244-53. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.07.026.