

## Uso de ligandos orgánicos en la fitoextracción de Plomo por Ricino (*Ricinus communis* L.)

Use of organic ligands in lead Phytoextraction by Castor bean (*Ricinus communis* L.)

Hugo Miniño, Alicia Rendina\*, María J Barros, Amalia Bursztyn, Alejandra de los Ríos, Diego Wassner, Alicia F de Iorio

Palabras clave:  
contaminación,  
metales,  
fitorremediación,  
enmiendas

Keywords:  
contamination,  
metals,  
phytoremediation,  
amendments

### ABSTRACT

Plant species with high biomass production can be used to remove metals through the harvest of aboveground biomass. However, low availability of metals in soil often limits their absorption and translocation, which reduces efficiency in phytoextraction process. The addition of organic ligands to soil is a potential strategy for increasing metal availability. A pot experiment was conducted to evaluate the phytoextraction potential of Castor bean (*Ricinus communis* L.) through the application of EDTA ( $5.1 \text{ mmol.kg}^{-1}$  of soil), EDDS ( $5.1 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ), citric acid ( $5.1 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ) and compost extract ( $66 \text{ mg C.kg}^{-1}$ ) to soil contaminated with  $600 \text{ mg.kg}^{-1}$  of Pb. The amendments were added 12 months after sowing. Two application forms were tested: a) a single application of the dose 7 days before the harvest and b) three separate applications with 1/3 of the doses on the 21<sup>st</sup>, 14<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day before harvest. None of the treatments decreased plant biomass. EDDS and EDTA application significantly increased Pb concentration in plant shoot and roots in both application forms compared with control pots whereas citric acid and compost extract had no effects on Pb concentration in plants. EDTA applied 7 days before plant harvest was the most effective treatment in solubilization of Pb associated to oxides of Fe and Mn, carbonates and organic matter, which favored the uptake of Pb from soil by the roots and its translocation to shoot. The value of bioconcentration factor (1.03) and translocation factor (1.73) of Castor bean by adding EDTA in an application showed the potential suitability of Castor bean in soil remediation contaminated with Pb. Furthermore, the time required for phytoextraction process was acceptable.

### RESUMEN

Especies vegetales con alta producción de biomasa pueden ser utilizadas para la remoción de metales mediante la cosecha de la biomasa aérea. Sin embargo, la baja disponibilidad de los metales en el suelo, frecuentemente limitan su absorción y translocación, reduciendo la eficiencia del proceso de fitoextracción. La adición de ligandos orgánicos al suelo constituye una estrategia para aumentar la disponibilidad de los metales. Un experimento en macetas fue llevado a cabo para evaluar la fitoextracción de Pb por Ricino (*Ricinus communis* L.) mediante la aplicación de EDTA ( $5.1 \text{ mmol.kg}^{-1}$  de suelo), EDDS ( $5.1 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ), ácido cítrico ( $5.1 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ) y extracto de compost ( $66 \text{ mg C.kg}^{-1}$ ) a un suelo contaminado con  $600 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Pb. Dos formas de aplicación fueron ensayadas: a) una única aplicación de las dosis, 7 días antes de la cosecha y b) tres aplicaciones separadas de 1/3 de la dosis, realizadas a los 21, 14 y 7 días antes de la cosecha. Ninguno de los tratamientos disminuyó la biomasa de las plantas respecto del control. El EDTA y EDDS aumentaron significativamente la concentración de Pb en parte aérea y raíz de las plantas con respecto al control, en cambio el ácido cítrico y el extracto de compost no tuvieron efecto sobre la concentración de Pb en las plantas. El EDTA ( $5.1 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ) aplicado 7 días antes de la cosecha de las plantas fue el tratamiento más efectivo en solubilizar Pb asociado a óxidos de Fe y Mn, carbonatos y materia orgánica, lo cual favoreció la absorción del Pb por las raíces y su translocación a los tejidos aéreos de las plantas. El valor del factor de bioconcentración (1.03) y del factor de translocación (1.73) de Ricino mediante la incorporación de EDTA en una aplicación, muestran la aptitud potencial de esta especie vegetal para ser utilizada en la remediación de suelos contaminados con Pb, siendo aceptable el tiempo que insume el proceso de fitoextracción.

## INTRODUCCIÓN

El plomo (Pb) es uno de los metales pesados más frecuentes en el ambiente debido a diversas actividades antropogénicas como la minería, reciclado de baterías, metalurgia, agricultura, pinturas, explosivos y depósito de desechos municipales, entre otras. La contaminación del suelo con Pb representa a nivel mundial un importante problema ambiental debido a sus implicancias sobre la salud humana, de animales y plantas (Luo *et al.*, 2006). En la Argentina diversos estudios han mostrado elevados niveles de Pb en sangre de niños (Mariscal *et al.*, 2010; Disalvo *et al.*, 2011).

La fitoextracción es una biotecnología que elimina contaminantes del suelo, sedimentos y aguas, al ser absorbidos y translocados a las partes cosechables de las plantas. Aunque la habilidad de las plantas para absorber metales contaminantes depende de cada especie vegetal, la movilidad del metal en el suelo constituye la etapa limitante para su absorción (Chaney, 1988). La movilidad del Pb en el suelo es generalmente baja, sin embargo, ciertos factores como el aumento de la acidez y la formación de complejos orgánicos solubles puede incrementar su solubilidad (Huang *et al.*, 1997). La adición al suelo de ligandos orgánicos como el EDTA (ácido etilendiamin tetraacético), EDDS (S,S-N,N'-etilendiamin disuccínico), NTA (ácido nitrilo acético), ácido cítrico, materia orgánica soluble, entre otros, ha sido investigada como estrategia para provocar la desorción de metales retenidos en fases sólidas del suelo, facilitando la absorción por las raíces, el transporte en el xilema y la translocación desde la raíz a la parte aérea (Ruley *et al.*, 2006). El empleo de plantas tolerantes al metal, con alta producción de biomasa, conjuntamente con enmiendas movilizadoras del Pb en el suelo, puede constituir una alternativa eficaz para la remediación de suelos contaminados. *Ricinus communis* L. es una especie de rápido crecimiento y alta producción de biomasa, cultivada en regiones tropicales y subtropicales para la producción de aceites de uso industrial. Los objetivos de este

trabajo fueron: a) evaluar la acumulación en el vegetal (*Ricinus communis* L.) inducida por la aplicación de agentes quelantes al suelo b) determinar los cambios producidos por las enmiendas sobre la distribución de Pb entre las principales fases del suelo y c) estimar el tiempo insumido en el proceso de fitoextracción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación del suelo contaminado

Un suelo de textura franco limosa fue recolectado manualmente del horizonte superficial (0-20 cm) en el campo experimental de la Facultad de Agronomía (UBA), en la Ciudad de Buenos Aires. El suelo fue secado al aire, molido y mezclado. Porciones de suelo de 5 kg fueron uniformemente saturadas con una solución de  $Pb(NO_3)_2$  para obtener finalmente 600 mg.  $kg^{-1}$  de Pb. Las porciones de suelo contaminado fueron secadas al aire, mezcladas y tamizadas por malla de 2 mm. Las principales características físico-químicas del suelo contaminado y no contaminado son presentadas en la Tabla 1. La distribución del tamaño de partícula fue determinada por el método del hidrómetro (Gee & Bauder, 1986). El pH (relación suelo/agua 1:5) fue medido por potenciometría con electrodo de vidrio (Mc Lean, 1982). El carbono orgánico (CO) fue determinado por oxidación con  $K_2Cr_2O_7$  y  $H_2SO_4$ , según el método de Walkley & Black (Nelson & Sommer, 1982) convirtiendo el CO a materia orgánica (MO), siendo  $MO=1.72 \times CO$ . La capacidad de intercambio catiónico (CIC) se evaluó mediante la saturación del suelo con acetato de amonio a  $pH=7$  (Rhoades, 1982). El contenido de nitrógeno total y fósforo extractable se obtuvieron por el método Kjeldhal (Bremner & Mulvaney, 1982) y Bray & Kurtz (1945) respectivamente. La concentración de Pb fue determinada por espectrometría de absorción atómica (EAA) con llama aire-acetileno luego de la digestión del suelo con  $HNO_3$  y  $HClO_4$  (5:1 v/v).

	Suelo	Suelo + Pb
pH	6.8	6.7
CE (dS m <sup>-1</sup> )	0.92	1.05
CIC (cmol <sub>c</sub> .kg <sup>-1</sup> )	19	20
MO (%)	3.0	3.0
N (%)	0.15	0.16
P (mg kg <sup>-1</sup> )	14.5	14.4
Arena (%)		10.4
Limo (%)		70.8
Arcilla (%)		18.8
Textura		franco limosa
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	8.0	600

**Tabla 1.** Principales propiedades del suelo contaminado y no contaminado. Los valores corresponden a la media (n=3).

**Table 1.** Main properties of polluted and unpolluted soil. Mean values are shown (n=3).

## Bioensayo

Macetas plásticas de 20 litros se llenaron con 13.2 kg de suelo; se emplearon 24 macetas con suelo contaminado y 3 macetas con suelo no contaminado. Inicialmente, todas las macetas se regaron con cantidades predeterminadas de agua deionizada para llevar el contenido de humedad de los suelos a 80 % de la capacidad de campo (0.36), la cual fue determinada previamente en el laboratorio por el método de Cassel & Nielsen (1986) a una presión de 0.33 atm, determinando gravimétricamente la humedad retenida en el suelo. Las pérdidas de humedad durante el bioensayo fueron corregidas diariamente por pesada de las macetas reponiendo el agua perdida.

Al término del periodo de estabilización, en cada maceta se sembraron tres semillas de Ricino (*Ricinus communis* L. variedad Al Guarani 2002). Luego de la emergencia (30 días después de la siembra) se realizó un raleo dejando una planta por maceta. Los experimentos se realizaron en invernáculo con luz natural. Durante el crecimiento de

las plantas, el suelo se mantuvo a 80 % de capacidad de campo. Para evitar deficiencias nutricionales las plantas recibieron semanalmente una fertirrigación con una solución conteniendo 15 mg de N, 5 mg de P y 5 mg de K cada 100 ml de solución. El diseño experimental fue totalmente aleatorizado con tres repeticiones para cada tratamiento y el control. Los tratamientos (Tabla 2) consistieron en la aplicación sobre el suelo de soluciones de EDTA (sal disódica, 5.1 mmol.kg<sup>-1</sup>), EDDS (sal trisódica, 5.1 mmol.kg<sup>-1</sup>), ácido cítrico (5.1 mmol.kg<sup>-1</sup>) y extracto de compost (66 mg C.kg<sup>-1</sup>). Cada uno de los ligandos se aplicó en dos formas distintas: a) una única aplicación de las dosis, 7 días antes de la cosecha y b) en tres aplicaciones de la dosis fraccionada, realizadas a los 21, 14 y 7 días antes de la cosecha, la cual se realizó 12 meses después de la siembra. El extracto acuoso de compost se preparó siguiendo la metodología descrita por Gariglio *et al.* (2002). La concentración de carbono orgánico en el extracto obtenido se determinó según Golterman *et al.* (1978).

Tratamientos	Dosis	Forma de aplicación
Control	0 mmol.kg <sup>-1</sup>	
EDTA 1	5.1 mmol.kg <sup>-1</sup>	única
EDTA 3	1.7+1.7+1.7 mmol.kg <sup>-1</sup>	fraccionada
EDDS 1	5.1 mmol.kg <sup>-1</sup>	única
EDDS 3	1.7+1.7+1.7 mmol.kg <sup>-1</sup>	fraccionada
Ácido Cítrico 1	5.1 mmol.kg <sup>-1</sup>	única
Ácido Cítrico 3	1.7+1.7+1.7 mmol.kg <sup>-1</sup>	fraccionada
Compost 1	66 mg C.kg <sup>-1</sup>	única
Compost 3	22+22+22 mg C.kg <sup>-1</sup>	fraccionada

**Tabla 2.** Tratamientos, dosis y forma de aplicación de los quelantes

**Table 2.** Treatments, dosis and application forms of chelating agents

### Análisis químicos

*Material vegetal cosechado:* al término del bioensayo, la biomasa cosechada fue seccionada en raíces, tallos y hojas. El material vegetal se secó en estufa a 70 °C durante 48 h y se determinó el peso seco. La materia seca de las plantas fue digerida con HNO<sub>3</sub> y HClO<sub>4</sub> (5:1 v/v). La concentración de Pb en los extractos se midió por espectrometría de absorción atómica (EAA) con llama de aire-acetileno.

*Fraccionamiento del suelo:* luego de la cosecha de las plantas, el suelo de cada maceta fue secado al aire y tamizado por malla de 2 mm. El fraccionamiento de Pb en el suelo se realizó mediante el procedimiento de extracción química secuencial de Tessier *et al.* (1979), el cual es esquematizado en la Figura 1.

Las concentraciones de Pb en los extractos se midieron por EAA y las concentraciones fueron expresadas sobre la base de suelo seco a 105 °C durante 24 h.

La adición de ácido cítrico no tuvo efectos significativos sobre la producción de biomasa de las plantas. Los tratamientos con EDDS

y compost aumentaron significativamente la biomasa de raíces, respecto del control. El efecto de la materia orgánica soluble sobre el crecimiento de las plantas ha sido muchas veces observado, tanto en soluciones nutritivas como en suelos y sustratos (Nardi *et al.*, 2002). El incremento de la biomasa de raíces en los tratamientos con EDDS podría relacionarse con la solubilización de nutrientes del suelo, sin embargo otros investigadores (Wu *et al.*, 2007) informaron disminución de la biomasa de raíz y hojas de *Zea mays* y *Phaseolus vulgaris* con la aplicación de EDDS (5 mmol.kg<sup>-1</sup>).

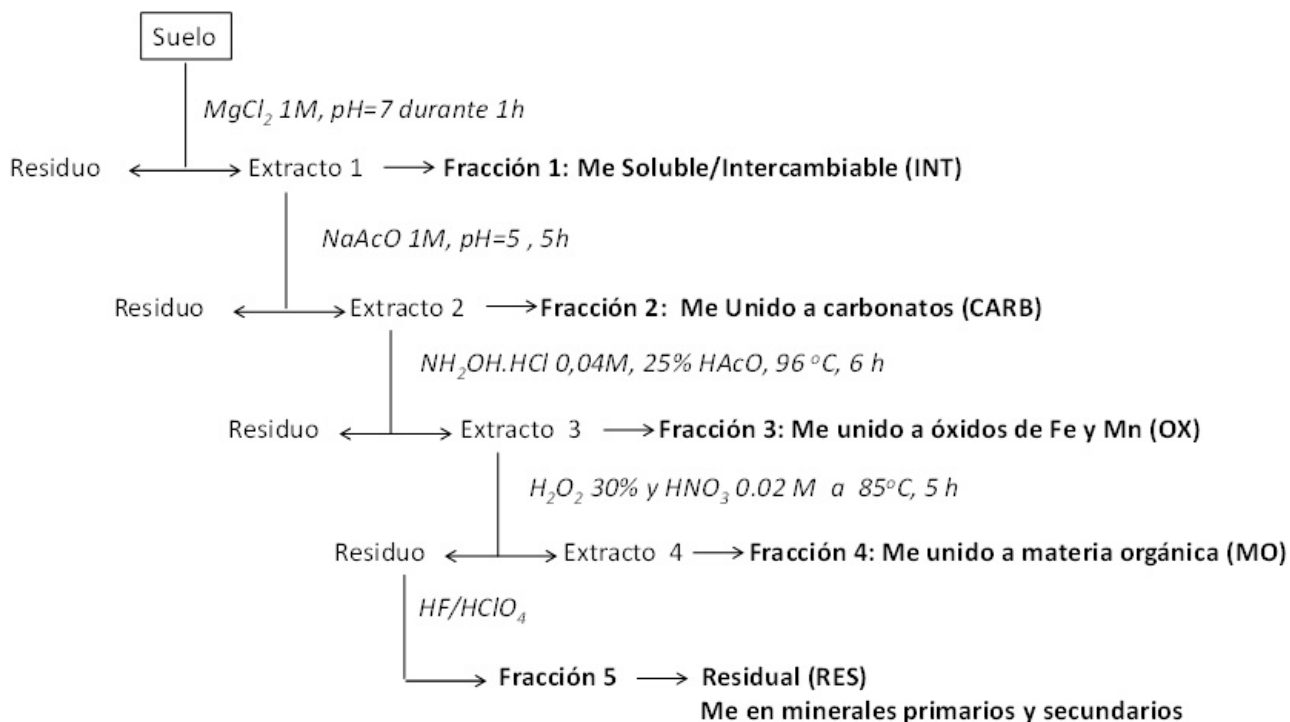


Figura 1. Procedimiento de extracción secuencial empleado.

Figure 1. Sequential extraction procedure used

### Eficiencia de fitoextracción de las plantas

Dos índices fueron calculados para evaluar la eficiencia de fitoextracción de las plantas: el factor de translocación ( $FT = \frac{[Pb]_{aérea}}{[Pb]_{raíz}}$ ) y el factor de bioconcentración ( $FBC = \frac{[Pb]_{aérea}}{[Pb]_{suelo}}$ ) (Liu et al. 2008). El tiempo (años) que insumiría el proceso de fitorremediación para la reutilización del suelo se estimó mediante la ecuación:  $T = \frac{([Pb]_{suelo} - [Pb]_{suelo\ requerida}) \cdot M_{suelo}}{([Pb]_{aérea} \cdot M_{aérea} \cdot F)}$ , donde  $T$ : es el tiempo en años,  $[Pb]_{suelo}$ : es la concentración de Pb en el suelo contaminado en  $mg\ kg^{-1}$ ,  $[Pb]_{suelo\ requerida}$  es la concentración de Pb a alcanzar según la normativa ambiental,  $M_{suelo}$  es la masa de suelo en la maceta,  $[Pb]_{aérea}$  es la concentración de Pb en la parte aérea de la planta en  $mg\ kg^{-1}$ ,  $M_{aérea}$  es la biomasa aérea de la planta en kg y  $F$  es el número de

cosechas por año (Chen et al., 2012).

### Análisis estadístico de los datos

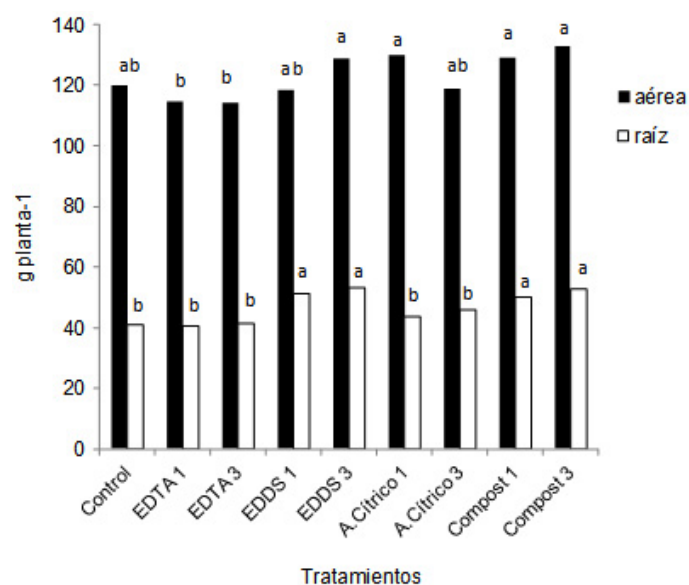
El análisis estadístico se realizó con el programa Statistix 8. La distribución normal de los datos se analizó con la prueba de Levene y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Shapiro-Wilkins. Las diferencias en la biomasa de ricino (aérea y raíz), concentración de Pb en ricino (raíz, tallo, hoja y parte aérea), FT y FBC entre tratamientos se evaluó mediante un ANOVA a una vía. Las diferencias estadísticas en la concentración de Pb en las fracciones del suelo fueron determinadas usando un ANOVA a dos vías, considerando la fracción y el tratamiento como factores de variación. Las medias se compararon mediante el test de Tukey a un nivel de significación de 0.05.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Crecimiento de las plantas

Ninguno de los tratamientos, disminuyó significativamente la biomasa de las plantas respecto del control (Figura 2), aún en el tratamiento con agregado de EDTA en una aplicación en el cual se observaron lesiones necróticas en hojas, lo cual puede ser atribuido a la elevada concentración de Pb en los tejidos (Figura 3) o a la formación de complejos entre el EDTA y elementos esenciales (ej.: Fe, Cu y Zn) produciendo la muerte celular en las hojas (Vassil *et al.*, 1998).

La adición de ácido cítrico no tuvo efectos significativos sobre la producción de biomasa de las plantas. Los tratamientos con EDDS y compost aumentaron significativamente la biomasa de raíces, respecto del control. El efecto de la materia orgánica soluble sobre el crecimiento de las plantas ha sido muchas veces observado, tanto en soluciones nutritivas como en suelos y sustratos (Nardi *et al.*, 2002). El incremento de la biomasa de raíces en los tratamientos con EDDS podría relacionarse con la solubilización de nutrientes del suelo, sin embargo otros investigadores (Wu *et al.*, 2007) informaron disminución de la biomasa de raíz y hojas de *Zea mays* y *Phaseolus vulgaris* con la aplicación de EDDS (5 mmol.kg<sup>-1</sup>).



**Figura 2.** Biomasa (g.planta<sup>-1</sup>) de parte aérea y raíz de las plantas de *Ricinus communis* para cada tratamiento y formas de aplicación. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos para cada partición ( $p < 0.05$ ).

**Figure 2.** Biomass (g.plant<sup>-1</sup>) of shoot and root of *Ricinus communis* plants for each treatment and application forms. Different letters above bars indicate significant differences between treatments for each partition ( $p < 0.05$ )

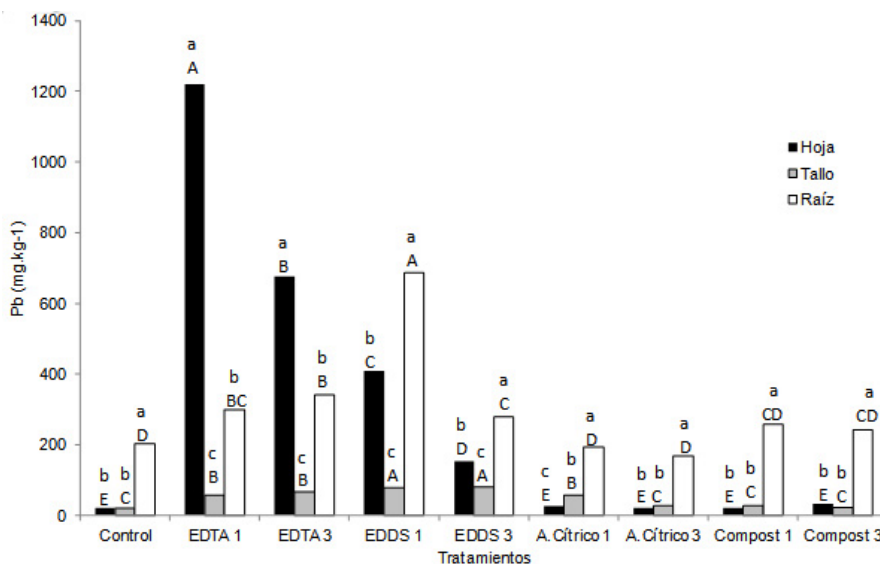
### Acumulación de Pb en las plantas

En el control la acumulación de Pb en raíz (203 mg.kg<sup>-1</sup>) fue significativamente mayor que en el resto de los órganos (21.5 y 20.4 mg.kg<sup>-1</sup> para tallo y hoja respectivamente) (Figura 3). La alta capacidad de absorción y acumulación de Pb en las raíces de *Ricinus communis* L, con escasa translocación a la parte aérea, también ha sido informada por Romeiro *et al.* (2006). El agregado de EDTA

aumentó significativamente la concentración de Pb en todos los órganos de las plantas, en ambas formas de aplicación. El órgano que presentó mayor acumulación de Pb fueron las hojas (1220 y 679 mg.kg<sup>-1</sup> para una y tres aplicaciones de EDTA respectivamente), lo cual representa un incremento notable con respecto al control (21.5 mg.kg<sup>-1</sup>). El EDDS produjo también un aumento sustancial de la concentración de Pb en todas las particiones de las plantas, sin embargo

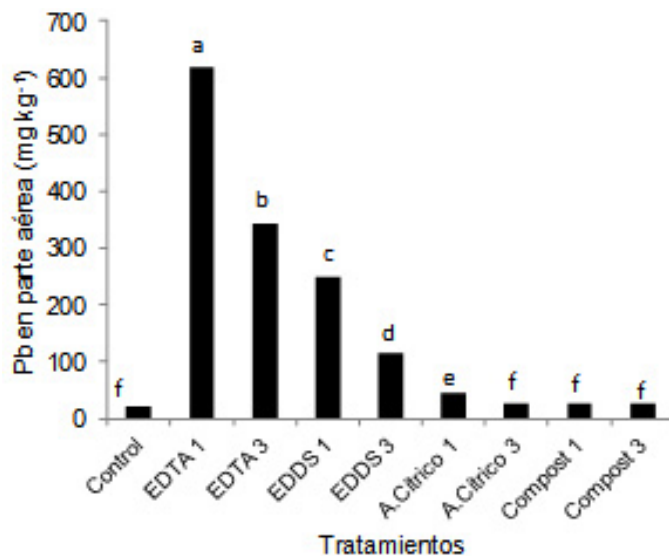
a diferencia del EDTA la acumulación fue mayor en raíz (687 y 278 mg.kg<sup>-1</sup> de Pb para una y tres aplicaciones respectivamente). Por otro lado, los tratamientos A. Cítrico

3, Compost 1 y Compost 3 no favorecieron la acumulación de Pb en ninguno de los órganos de las plantas.



**Figura 3.** Concentraciones de Pb (mg.kg<sup>-1</sup>) en cada órgano de Ricino. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas (p<0.05) entre tratamientos para cada órgano. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre órganos para cada tratamiento (p<0.05).

**Figure 3.** Lead concentrations (mg.kg<sup>-1</sup>) in each organ of Castor bean. Different upper case letters indicate significant differences between treatments (p<0.05) for each fraction. Different lower case letters indicate significant differences between fractions (p<0.05) for each treatment



**Figura 4.** Concentración de Pb en la biomasa aérea de las plantas. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0.05).

**Figure 4.** Lead concentration in aboveground biomass of plants. Different letters above bars indicate significant differences between treatments (p <0.05)

La concentración de Pb en la parte aérea de las plantas (Figura 4) siguió el orden: EDTA 1>EDTA 3>EDDS 1>EDDS 3>A. Cítrico 1>A. Cítrico 3=Compost 1= Compost 3=control. La aplicación única de EDTA y EDDS produjeron un aumento significativo de la concentración de Pb en parte aérea de las plantas (619 mg.kg<sup>-1</sup> y 249 mg.kg<sup>-1</sup> respectivamente) con respecto al control (20.9 mg.kg<sup>-1</sup>), mientras que en la aplicación fraccionada las concentraciones de Pb fueron sustancialmente menores (342 mg.kg<sup>-1</sup> y 116 mg.kg<sup>-1</sup> para EDTA y EDDS respectivamente) aunque también diferentes desde el punto de vista estadístico (Figura 4). El tratamiento A. Cítrico 1, si bien produjo un aumento de la concentración de Pb (43.5 mg.kg<sup>-1</sup>) con respecto al control (20.9 mg.kg<sup>-1</sup>), fue menos efectivo que los tratamientos con EDTA y

EDDS. La Tabla 3 muestra la concentración de Pb en parte aérea de diversas especies vegetales informadas en la bibliografía y las obtenidas en este estudio con *Ricinus communis*. La acumulación de Pb en las plantas depende no sólo de la especie vegetal sino también del estadio de crecimiento, nivel de contaminación en el suelo, disponibilidad, dosis del quelante utilizada y tiempo de aplicación previo a la cosecha, entre otros factores.

Exceptuando *Cannabis sativa* (Kos *et al.*, 2003), a igual dosis, el EDTA fue más efectivo que el EDDS. Por otro lado, para todas las especies el ácido cítrico mostró relativamente bajas concentraciones de Pb en las plantas, tanto en aplicaciones únicas como fraccionadas de las dosis ensayadas.

Especie	[Pb]s* mg kg <sup>-1</sup>	crecimiento semanas	Quelante mmol kg <sup>-1</sup>	[Pb]a** mg kg <sup>-1</sup>	Referencia
<i>Brassica juncea</i>	500	5	EDTA (10)	1013	Do Nascimento <i>et al.</i> 2006)
<i>Brassica juncea</i>	500	5	Ácido cítrico (10)	112	Do Nascimento <i>et al.</i> 2006)
<i>Brassica napus</i>	1100	11	EDTA (5)	93.9	Kos <i>et al.</i> (2003)
<i>Brassica napus</i>	1100	11	EDDS (5)	40.1	Kos <i>et al.</i> (2003)
<i>Brassica oleracea</i>	800	2.3	EDTA (5)	452	Chen <i>et al.</i> (2004 b)
<i>Brassica oleracea</i>	800	2.3	EDTA (2.5+2.5)	262	Chen <i>et al.</i> (2004 b)
<i>Canavalia ensiformis</i>	1800	5.7	EDTA (6.7+6.7)	463	Bassetto Gabos <i>et al.</i> (2009)
<i>Canavalia ensiformis</i>	1800	5.7	EDTA (13.4)	444	Bassetto Gabos <i>et al.</i> (2009)
<i>Cannabis sativa</i>	1100	4	EDDS (5)	383	Kos <i>et al.</i> (2003)
<i>Cannabis sativa</i>	1100	11	EDTA (5)	221	Kos <i>et al.</i> (2003)
<i>Helianthus annuus</i>	800	2.3	EDTA (2.5)	391	Chen <i>et al.</i> (2004 b)
<i>Sorghum bicolor</i>	500	8	EDTA (3)	37.9	Luo <i>et al.</i> (2006)
<i>Spinacea oleracea</i>	500	8	EDTA (3)	146	Luo <i>et al.</i> (2006)
<i>Stizolobium aterrimum</i>	150	2.1	Ácido cítrico (5)	14.9	Chaves de Melo <i>et al.</i> (2008)
<i>Stizolobium aterrimum</i>	150	2.1	Ácido cítrico (2.5+2.5)	13.9	Chaves de Melo <i>et al.</i> (2008)
<i>Trifolium platense</i>	1100	15	EDTA (5)	398	Kos <i>et al.</i> (2003)
<i>Vetiveria zizanioides</i>	500	2	EDTA (5)	42	Chen <i>et al.</i> (2004 a)
<i>Zea mays</i>	800	2.3	EDTA (5)	649	Chen <i>et al.</i> (2004 b)
<i>Zea mays</i>	800	2.3	EDTA (2.5)	332	Chen <i>et al.</i> (2004 b)
<i>Zea mays</i>	500	8	EDTA (3)	29.3	Luo <i>et al.</i> (2006)
<i>Zea mays</i>	500	8	EDDS (3)	25.0	Luo <i>et al.</i> (2006)
<i>Ricinus communis</i>	600	48	EDTA (5.1)	619	<i>Este estudio</i>
<i>Ricinus communis</i>	600	48	EDTA (1.7+1.7+1.7)	342	<i>Este estudio</i>
<i>Ricinus communis</i>	600	48	EDDS (5.1)	249	<i>Este estudio</i>
<i>Ricinus communis</i>	600	48	EDDS (1.7+1.7+1.7)	116	<i>Este estudio</i>
<i>Ricinus communis</i>	600	48	Ácido cítrico (5.1)	43.5	<i>Este estudio</i>
<i>Ricinus communis</i>	600	48	Á. cítrico (1.7+1.7+1.7)	25.4	<i>Este estudio</i>

\*concentración de Pb en el suelo, \*\* concentración de Pb en la parte aérea de las plantas.

**Tabla 3.** Concentración de Pb en el suelo y en la parte aérea de diversas especies vegetales.

**Table 3.** Lead concentration in soil and shoot of various plant species



### Distribución de Pb en el suelo

La proporción de las formas de Pb en el suelo control (Tabla 4) siguió el orden: óxidos > materia orgánica = carbonatos > soluble/intercambiable = Residual. La principal fase no residual de retención de Pb fueron los óxidos de Fe y Mn (36 % del Pb total), mostrando que en el suelo el principal mecanismo de retención fue la adsorción/precipitación con los óxidos de Fe y Mn. El Pb unido a la materia orgánica representó el 21% y la fracción unida a carbonato el 20 %. Solo el 12 % del metal se encontró en formas solubles e intercambiables. Por

otro lado, el bajo porcentaje de Pb en la fracción residual (10 %), indica que el metal agregado se distribuyó principalmente entre las fracciones no residuales del suelo.

El tratamiento EDTA 1 fue el más efectivo en solubilizar Pb del suelo. La adición de EDTA en una aplicación aumentó el Pb en la fracción soluble e intercambiable 226% con respecto al control, mientras que la aplicación fraccionada aumentó 114%. Otros autores en cambio han obtenido mayor solubilización de Pb mediante la aplicación fraccionada de EDTA (Bassetto Gabos *et al.*, 2009).

Tratamientos	Fracciones									
	Soluble/INT		CARB		OX		MO		RES	
	mg.kg <sup>-1</sup>	%	mg.kg <sup>-1</sup>	%	mg.kg <sup>-1</sup>	%	mg.kg <sup>-1</sup>	%	mg.kg <sup>-1</sup>	%
CONTROL	72.7	cC 12	123	bA 20	220	aA 36	130	bA 21	59.3	cA 10
EDTA 1	237	aA 39	86.2	cB 14	146	bD 24	85.9	cC 14	55.2	dA 9
EDTA 3	156	bB 26	95.7	cB 16	177	aC 30	114	cB 19	49.6	dA 8
EDDS 1	147	bB 24	98.3	cB 16	205	aB 33	92.8	cAB 15	67.8	dA 11
EDDS 3	97.0	cC 16	120	bA 20	209	aB 35	118	cAB 20	54.0	dA 9
A. CÍTRICO 1	94.2	bC 15	113	bAB 19	216	aA 36	118	bAB 19	64.1	dA 10
A. CÍTRICO 3	84.0	cCD 14	122	bA 20	222	aA 36	124	bA 20	59.0	dA 10
COMPOST 1	76.6	cD 12	121	bA 20	222	aA 36	127	bA 21	66.0	dA 11
COMPOST 3	75.7	cD 12	129	bA 21	222	aA 36	126	bA 20	60.7	dA 10

INT: intercambiable, CARB: carbonatos, OX: óxidos de Fe y Mn, MO: materia orgánica y RES: residual

**Tabla 4.** Distribución de Pb en el suelo para cada tratamiento y porcentaje del metal en cada fracción respecto de la concentración de Pb total en el suelo. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos para cada fracción. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre fracciones para cada tratamiento ( $p < 0.05$ ).

Table 4. Lead distribution in soil for each treatment and metal percentage in each fraction according to total soil Pb. Different upper case letters indicate significant differences between treatments ( $p < 0.05$ ) for each fraction. Different lower case letters indicate significant differences between fractions ( $p < 0.05$ ) for each treatment

El EDDS en una aplicación produjo un aumento del 102 % en la fracción soluble e intercambiable con respecto al control, mientras que el resto de los tratamientos mostró incrementos sustancialmente inferiores (33-4 %). El aumento de la concentración de Pb en la fracción soluble/intercambiable se corresponde con la disminución del Pb en las fracciones carbonato, óxidos de Fe y Mn y materia orgánica, lo cual muestra que el metal es movilizado

desde esas fases. Aunque estrictamente un incremento de Pb en la primera fracción, puede deberse a un aumento del Pb soluble o intercambiable o ambos, la desorción de Pb producida por los agentes quelantes desde fases más estables que la fracción intercambiable del metal, sugieren que el Pb en la fracción soluble/intercambiable está principalmente como complejo soluble y no unido electrostáticamente al complejo de intercambio. Por otro lado, la fracción

residual de Pb en el suelo no fue afectada por ninguno de los quelantes en ambas formas de aplicación.

La eficacia de un quelante en la extracción de metales se relaciona con la constante de estabilidad del complejo metal-quelante (Domen *et al.* 2008). Así, el incremento de la concentración de Pb en fracción soluble-intercambiable puede explicarse por la alta constante de estabilidad del complejo Pb-EDTA con respecto al de los complejos Pb-EDDS, Pb-ácido cítrico y probablemente a los formados con la materia orgánica soluble del compost. Antoniadis & Alloway (2003) informaron que la adición de carbono orgánico disuelto incrementó la disponibilidad de metales para las plantas, particularmente en suelos arenosos, sin embargo, en suelos de texturas más finas como las del presente estudio (Tabla 2), la materia orgánica disuelta puede haberse fijado sobre superficies de sorción lo cual podría impedir la formación

de complejos metálicos solubles. Por otro lado, la biodegradación del ácido cítrico, EDDS y materia orgánica soluble por los microorganismos del suelo es otro factor que puede afectar negativamente la eficiencia en la solubilización de los metales.

#### Factores de translocación y de bioconcentración de Pb

Los mayores FBC (Tabla 5) correspondieron a los tratamientos con EDTA (1.03 y 0.57 para una y tres aplicaciones respectivamente), lo cual es consistente con el aumento de la fracción biodisponible del Pb en el suelo. Según la clasificación de Kovalevskii (1979) basada en los valores del FBC, la intensidad de la absorción de Pb por las plantas de Ricino en los tratamientos con EDTA fue "alta", al igual que con EDDS en una aplicación. El resto de los tratamientos presentó absorción media a baja.

Tratamientos	FT	FBC
Control	0.10 e	0.03 e
EDTA 1	1.73 a	1.03 a
EDTA 3	1.18 b	0.57 b
EDDS 1	0.36 c	0.41 c
EDDS 3	0.42 c	0.19 d
A. Cítrico 1	0.23 d	0.07 e
A. Cítrico 3	0.15 e	0.04 e
Compost 1	0.10 e	0.04 e
Compost 3	0.11 e	0.04 e

**Tabla 5.** Factor de translocación (FT) y factor de bioconcentración (FBC) de Pb para *Ricinus communis* en cada tratamiento. Letras distintas indican diferencias entre tratamientos para cada factor ( $p < 0.05$ )

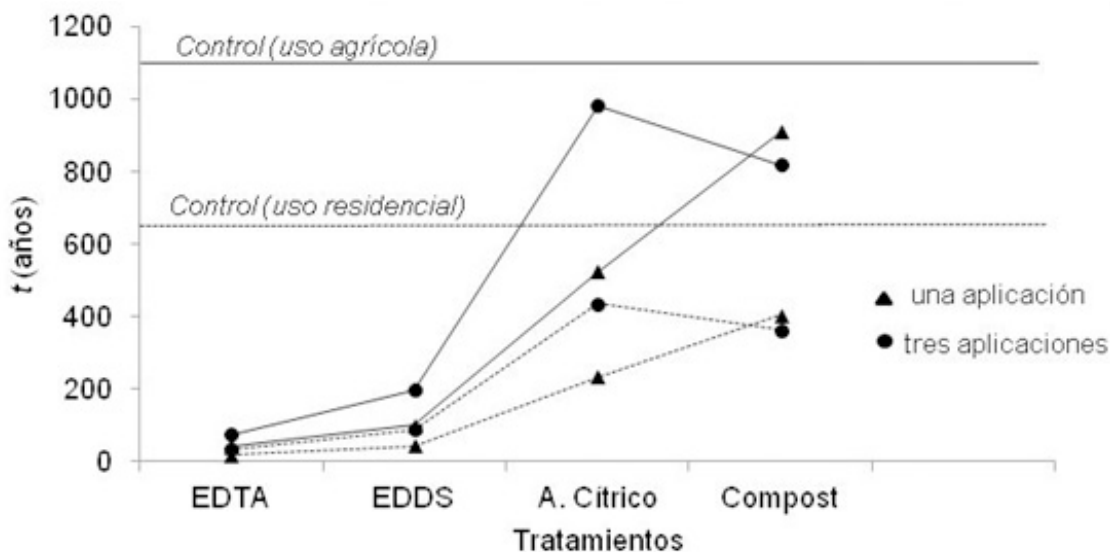
**Table 5.** Translocation factor (TF) and bioconcentration factor (BCF) of Pb for *Ricinus communis* Pb in each treatment. Different letters indicate differences between treatments for each factor ( $p < 0.05$ )

Los valores de FT más altos (Tabla 5) se obtuvieron en los tratamientos con EDTA (1.73 y 1.18 para aplicación simple y fraccionada respectivamente), lo cual indica la buena eficiencia en el transporte del metal desde las raíces a los tallos y hojas, probablemente como mecanismo de tolerancia al metal. En el resto de los tratamientos y en el control se obtuvieron FT menores de la unidad indicando que el Pb se acumuló principalmente en las raíces de las plantas. Diversos autores han mostrado que a igual dosis, el EDDS fue más eficiente que el EDTA para translocar Pb en plantas (Santos et al., 2006), mientras que otros (Luo et al., 2005) mostraron que el EDTA fue más efectivo.

### Estimación del tiempo (t) requerido para la fitorremediación

Uno de los factores que se debe evaluar antes de implementar un proyecto de fitorremediación, es la duración que insume el proceso de fitoextracción para disminuir la concentración del metal contaminante a valores permitidos para un determinado uso del suelo.

Los menores t se obtuvieron en los tratamientos con EDTA (Figura 5). Considerando una cosecha por año (F=1), se insumiría 19 y 42 años con la aplicación simple de la dosis del EDTA para permitir el uso residencial (500 mg.kg<sup>-1</sup>) o agrícola (375 mg.kg<sup>-1</sup>) del suelo respectivamente según la legislación vigente (Ley de residuos peligrosos 24051/93, decreto 831).



**Figura 5.** Tiempo (t) en años que insumiría el proceso de fitorremediación para uso agrícola (líneas llenas) o residencial (líneas punteadas) del suelo para una cosecha por año (F=1).

**Figure 5.** Time (t) in years of phytoremediation process for agricultural (solid lines) or residential (dotted lines) use of soil for a harvest per year (F=1)

Con aplicación de EDDS (aplicación única) se requerirían 45 y 101 años para uso residencial y agrícola respectivamente. El resto de los tratamientos, representan periodos de remediación muy extensos (88-365 años y 199-821 años para uso residencial y agrícola respectivamente). Es importante considerar que el t "a campo" puede ser sustancialmente menor al calculado a partir de los datos del

ensayo en macetas, mediante un manejo que conjugue maximizar la densidad de siembra del cultivo sin afectar la producción de la biomasa cosechable. El t "a campo" puede ser estimado como el cociente  $([Pb]_{suelo(kg/ha)} - [Pb]_{requerida (kg/ha)} / PF_{(kg/ha)})$ , siendo PF el potencial de fitoextracción (kg de Pb fitoextractado por ha de suelo). Kos et al. (2003) calcularon el PF de 14 especies

vegetales (para un ciclo de cultivo) en un suelo contaminado con  $1100 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Los PF más elevados los presentó *Cannabis sativa*, siendo  $9.6 \text{ kg.ha}^{-1}$  utilizando EDDS ( $5 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ) y de  $5.5 \text{ kg.ha}^{-1}$  utilizando EDTA ( $5 \text{ mmol.kg}^{-1}$ ). Considerando los datos de nuestro estudio y un rendimiento de biomasa de Ricino (a campo) de  $30000 \text{ kg.ha}^{-1}$ , los mejores PF resultaron ser de 10.5, 5.8 y  $4.2 \text{ kg.ha}^{-1}$  para Pb en los tratamientos EDTA 1, EDTA 3 y EDDS 1 respectivamente. Sin embargo, el PF de las especies vegetales puede variar entre estudios por diferentes condiciones experimentales como el estadio de crecimiento de la planta, la concentración inicial del metal y su disponibilidad en el suelo, entre otros factores.

## CONCLUSIONES

La aplicación de ácido cítrico y materia orgánica soluble en las formas y dosis ensayadas no favorecieron sustancialmente la acumulación de Pb en *Ricinus communis* L., resultando tiempos de remediación inaplicables. El EDTA agregado 7 días antes de la cosecha, fue el tratamiento más efectivo en solubilizar Pb del suelo y facilitar la fitoextracción del metal, sin reducción de la biomasa cosechable. Las aplicaciones sucesivas de los quelantes no mostraron ser una estrategia efectiva para movilizar Pb del suelo y acumularlo en los tejidos de las plantas. Aunque el EDDS tuvo menor capacidad que el EDTA para asistir la fitoextracción de Pb por *Ricinus communis* L, su uso aunque insumiría mayor tiempo de remediación, podría ser una alternativa al empleo de EDTA en condiciones agroclimáticas en las cuales el metal pueda lixivarse en el perfil y contaminar aguas subterráneas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antoniadis V & Alloway BJ. 2003. Influence of time on the plant availability of Cd, Ni and Zn after sewage sludge has been applied to soils. *Agrochimica*, 47: 81-93
- Bassetto Gabos M, Aparecida de Abreu C & Coscione AR. 2009. EDTA assisted phytoremediation of a Pb contaminated soil: metal leaching and uptake by Jack beans. *Scientia Agricola*, 66(4): 506-514
- Bray RH & Kurtz LT. 1945. Determination of total organic and available form of phosphorus in soil. *Soil Science*, 59: 39-45
- Bremner JM & Mulvaney CS. 1982. P 595-624 En: Page AL, Miller RH & Keeney DR (ed). *Methods of Soil Analysis: Part 2 – Chemical and Microbiological Properties*, ASA, SSSA, Madison, WI, USA
- Chaney RL. 1988. Metal speciation and interactions among elements affecting trace-element transfer in agricultural and environmental food chains. P 218-260 En: Kramer JR & Allen HE (ed) *Metal Speciation: Theory, Analysis and Applications*.
- Chaves de Melo EE, do Nascimento CWA, Accioly AM & Santos AC. 2008. Phytoextraction and fractionation of heavy metals in soil after multiple applications of natural chelants. *Scientia Agricola*, 65 (1): 61-68
- Chen KF, Yeh TY & Lin CF. 2012. Phytoextraction of Cu, Zn, and Pb enhanced by chelators with vetiver (*Vetiveria zizanioides*): hydroponic and pot experiments. *ISRN Ecology*, 1-12
- Chen Y, Li X & Shen Z. 2004a. Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA- assisted phytoextraction process. *Chemosphere*, 57: 187- 196
- Chen Y, Shen Z & Li X. 2004b. The use of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) in the phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. *Applied Geochemistry*, 19: 1553-1565
- Disalvo L, Aab C, Pereyras S, Pattín J, Apezteguía M, Iannicelli JC, Girardelli A & Varea A. 2011. Plumbemia en niños de la ciudad de La Plata, Argentina y su relación con la deficiencia de hierro y los factores de exposición al plomo. *Revista Sociedad Boliviana de Pediatría*, 50 (2): 130-138
- Do Nascimento CWA & Xing B. 2006. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Scientia Agricola*, 63(3): 299-311
- Domen L, Luo C. & Li X. 2008. The use of chelating agents in the remediation of metal-contaminated soils: A review. *Environmental Pollution*, 153: 3-13
- Gariglio NF, Buyatte MA, Pilatti RA, Gonzalez Rossia DE & Acosta MR. 2002. Use of a germination bioassay to test compost maturity of willow (*Salix* sp.). *Crop and Horticultural Science*, 30 (2): 135-139

- Gee GW & Gauder JW. 1986. Particle-size analysis. P 383-412 En: Klute A (ed) *Methods of soil analysis. Part I.* 2da. Ed. Madison WI
- Golterman H, Clymo R & Ohndtad M. 1978. *Methods for the physical and chemical examination of freshwaters.* Blackwell Sci Publ, Oxford: 166 p
- Huang JWW, Chen JJ, Berti WR & Cunningham SD. 1997. Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science and Technology*, 31: 800-805
- Kos B, Grčman H & Leštan D. 2003. Phytoextraction of lead, zinc and cadmium from soil by selected plants. *Plant soil environment*, 49(12): 548-553
- Kovalevsky AL. 1979. *Biogeochemical exploration for mineral deposits.* Oxonian Press Pvt Ltd, New Delhi: 136 p
- Liu XH, Gao YT, Sardar K, Duan G, Chen AK, Ling L, Zao L, Zhonghan L & Xuecan W. 2008. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on contaminated sites and their potential accumulation capacity in Heqing, Yunnan. *Journal of Environmental Science*, 20: 1469-1474
- Luo C, Shen Z & Li X. 2005. Enhanced phytoextraction of Cu, Pb, Zn and Cd with EDTA and EDDS. *Chemosphere*, 59: 1-11
- Luo C, Shen Z, Li X & Baker AJM. 2006. Enhanced phytoextraction of Pb and other metals from artificially contaminated soils through the combined application of EDTA and EDDS. *Chemosphere*, 63: 1773-1784
- Mariscal JRC, Saavedra ON, Wierna NR, Mula AJM, Rojas MA & Mitre MGB. 2010. Metodología para caracterizar el riesgo en sitio contaminado. Caso Abra Pampa (Jujuy, Argentina). *Salud Ambiental*, 10(1-2): 65-72
- McLean EO. 1982. Soil pH and lime requirement. P 199-224 En: Page AL, Miller RH & Keeney DR (eds). *Methods of Soil Analysis: Part 2 – Chemical and Microbiological Properties*, ASA, SSSA, Madison, WI, USA
- Nardi S, Pizzeghello D, Reniero F & Rascio N. 2002. Chemical and biochemical properties of humic substances isolated from forest soils and plant growth. *Soil Science Society of America Journal*, 64: 639-645
- Nelson DW & Sommers LE. 1982. Total carbon, organic carbon, and organic matter. P 539-577 En: Page AL, Miller RH & Keeney DR (ed). *Methods of Soil Analysis: Part 2 – Chemical and Microbiological Properties.* 2 ed, ASA, SSSA, Madison, WI, USA
- Rhoades JD. 1982. Soluble salts. P 167-179 En: Page AL, Miller RH & Keeney DR. (ed). *Methods of soil Analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties.* 2nd ed, ASA, SSSA, Madison, WI, USA

- Romeiro S, Lagôa A, Furlani PR. de Abreu CA, de Abreu MF & Erismann NM. 2006. Lead uptake and tolerance of *Ricinus communis* L. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 18(4): 483-489
- Ruley AT, Sharma NC, Sahi SV, Singh SR & Sajwan K. 2006. Effects of lead and chelators on growth, photosynthetic activity and Pb uptake in *Sesbania drummondii* grown in soil. *Environmental Pollution*, 144: 11-18
- Santos FS, Hernandez-Allica J, Becerril JM, Amaral-Sobrinho N, Mazur N & Garbisu C. 2006. Chelate-assisted phytoextraction of metal polluted soils with *Brachiaria decumbens*. *Chemosphere*, 65: 43-50
- Tessier A, Campbell PGC & Bisson M. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate metals. *Analytical Chemistry*, 51(7):844-851
- Vassil A, Kapulnik Y, Raskin I & Salt DE. 1998. The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian mustard. *Plant Physiology* 117: 447-453
- Wu L, Sun X, Luo Y, Xing X & Christie P. 2007. Influence of [S,S]-EDDS on phytoextraction of copper and zinc by *Elsholtzia splendens* from metal contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 9: 227-241