



UNIVERSIDAD DEL MAR

CAPACIDAD DE *Simarouba glauca* COMO ESPECIE
FITOESTABILIZADORA DE SUELOS CONTAMINADOS CON ELEMENTOS
TRAZA Y EL EFECTO DE LA ADICIÓN DE BIOSÓLIDOS COMO
ENMIENDA.

TESIS

Para Obtener El Grado De:

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

AREA DE CONCENTRACIÓN EN QUÍMICA AMBIENTAL

Presenta:

I.Q. ERNESTO RAMÍREZ BRIONES

Director de tesis:

Dr. Eustacio Ramírez Fuentes

Co-Directora de tesis:

M. en C. Elizabeth González Terreros

Puerto Ángel, Oaxaca

Diciembre de 2012

Puerto Ángel, Oaxaca, Noviembre del 2012

DR. EDGAR ROBLES ZAVALA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
UNIVERSIDAD DEL MAR
PRESENTE

Acta de Revisión de Tesis

Después de haber realizado una revisión detallada del trabajo de tesis: **Capacidad de *Simarouba glauca* como especie fitoestabilizadora de suelos contaminados con elementos traza y el efecto de la adición de biosólidos como enmienda**, que presenta el Ingeniero Químico Ernesto Ramírez Briones.

Por este conducto, le comunicamos que la tesis citada cumple con los requisitos académicos y la calidad necesaria para ser defendida en el examen de grado.

COMISIÓN REVISORA



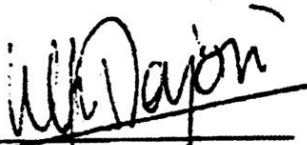
Dr. Eustacio Ramírez Fuentes
Universidad del Mar
Director



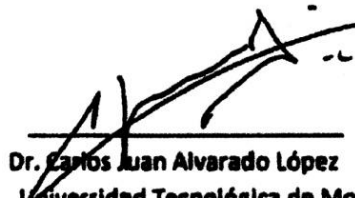
M. en C. Elizabeth González Terreros
Universidad de la Sierra Juárez
Co-Director



M. en C. Ma. Nieves Trujillo Tapia
Universidad del Mar
Sinodal



Dr. Engracia Madejón Rodríguez
Instituto de Recursos Naturales y
Agrobiología de Sevilla
Sinodal



Dr. Carlos Juan Alvarado López
Universidad Tecnológica de Morelia
Sinodal

DEDICATORIA

Especialmente a mis padres, por brindarme todo su apoyo y amor en este logro más de mi vida. A quienes debo lo que soy.

A Ross Sánchez, por su amor y energía.

A todos los amigos y compañeros que estuvieron en este trayecto, por su entusiasmo y aliento.

A los pueblos que con valor y dignidad defienden su historia y procuran el respeto por TATÉI YURIANAKA (Madre Tierra Fértil).

“NOS ROBARÁN NUESTROS FRUTOS,

CORTARÁN NUESTRAS RAMAS,

QUEMARÁN NUESTROS TRONCOS,

PERO NUNCA, NUNCA ARRANCARÁN NUESTRAS RAICES”

(Proverbio zapoteca)

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas las bendiciones recibidas.

A mi director de tesis: Dr. Eustacio Ramírez por su apoyo, asesorías y conocimientos durante todas las fases de este trabajo. Por su amistad.

A mis asesores y sinodales, M. en C. Elizabeth González, M. en C. Nieves Trujillo, Dra. Engracia Madejón, Dr. Carlos Alvarado, por su tiempo y conocimientos compartidos. Mi más sincero agradecimiento y estimación.

A los compañeros y técnicos de los laboratorios de ingeniería ambiental de la UMAR, de análisis ambiental de la UNSIJ; y académicos del grupo “uso sostenible del sistema suelo-agua-planta” del IRNA S por su apoyo, confianza y conocimientos.

Al Ing. Gabriel Ruvalcaba por su ayuda en la identificación de la especie.

A los profesores del posgrado en ciencias ambientales, por sus conocimientos compartidos.

A mi compañero de generación, con quien tuve la oportunidad de compartir los bemoles y los éxitos.

En especial al CONACYT por el financiamiento otorgado para realizar los estudios de maestría y la estancia en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla.

RESUMEN

El incremento en los niveles de elementos traza en suelo, ocasionado por la actividad minera es un problema con una alta repercusión en animales, plantas y la salud humana. Para su control se ha utilizado la fitorremediación, la cual es una técnica pertinentemente ambiental para rehabilitar ecosistemas degradados; en años recientes se ha extendido el uso de enmiendas orgánicas (biosólidos) en combinación con especies arbóreas: fitoestabilización asistida. El objetivo del trabajo fue evaluar la capacidad de *Simarouba glauca* para tolerar y estabilizar Ni, Zn, Pb, Cu, Cd y As, en conjunto con la adición de una enmienda de compost de biosólidos, en suelos afectados por actividad minera. La muestra de suelo se tomó de la comunidad de Natividad, Ixtlán de Juárez (Oaxaca). Se determinaron las características físicas y químicas en suelo y compost de biosólidos. El experimento a nivel invernadero consistió en un diseño de bloques al azar con 6 tratamientos diferentes: 1 con *S. glauca* en suelo contaminado, 3 utilizando *S. glauca* en suelo contaminado mas adición de enmienda en concentraciones del 5, 10 y 15%; 1 con las mismas proporciones suelo – enmienda y sin *S. glauca*; y 1 con *S. glauca* en suelo control. Los resultados en suelo contaminado mostraron concentraciones fitotóxicas de Zn (150–312 mg kg⁻¹) y Pb (90–558 mg kg⁻¹) y una menor actividad β -glucosidasa (0.06 μ moles de PNF/g suelo seco h) con respecto al suelo control; la adición de compost representó incrementos hasta del 25% en pH y de 9 veces la CIC, y una disminución en las concentraciones solubles de Zn, Pb, Cu y As. *Simarouba glauca* no mostro disminuciones significativas en clorofila y biomasa a pesar de encontrar concentraciones de Pb >2 mg Kg⁻¹ y concentraciones en intervalo normal para Ni y Cu (3–20 mg kg⁻¹ y 0.1–5 mg kg⁻¹ respectivamente) en raíz, tallo y hoja. En conclusión, *Simarouba glauca* mostró tolerancia al Pb y translocación de Cd de raíz a biomasa superficial, que merecen investigarse con mayor detalle.

ABSTRACT

The increase of trace elements on soil, caused by mining, is a problem that brings along a high impact on animals, plants and humans health. For control has been used the phytoremediation, a pertinently environmental technique to degraded ecosystems rehabilitation; in recent years, the use of organic amendments (biosolids), has expanded in combining with woody species: assisted phytostabilization. The research target was to evaluate the *Simarouba glauca* capacity for tolerate and stabilize Ni, Zn, Pb, Cu, Cd and As, together with an addition of biosolid compost amendment on damaged soils due to mining activity. The soil sample was taken from the community of Natividad, Ixtlán de Juárez (Oaxaca). Were determined physical and chemical characteristics in soil and biosolids compost. The experiment on greenhouse level was made with a randomly blocks design with 6 different treatments: 1 with *S.glauca* on polluted soil, 3 using *S. glauca* on polluted soil together with addition of amendment in concentrations about 5, 10 and 15%; 1 with equal proportions soil-amendment and without *S. glauca*; finally 1 with *S. glauca* in control soil. The results on polluted soil showed up phytotoxic concentrations of Zn (150–312 mg kg⁻¹) and Pb (90–558 mg kg⁻¹) and a minor β -glucosidase activity (0.06 μ mol of PNF/g dry soil h) in regard to control soil; the compost addition showed up an increasing in 25% on pH and about nine fold the CIC, and by the other hand, decreasing in soluble concentrations of Zn, Pb, Cu and As. *Simarouba glauca* did not present significant decreasing on chlorophyll and biomass in spite of find concentrations about Pb >2 mg Kg⁻¹ and, in a normal interval, Ni and Cu concentrations (3–20 mg kg⁻¹ and 0.1–5 mg kg⁻¹ respectively) on root, stem and leaf. In conclusion *Simarouba glauca* presents capacity for tolerance to Pb and Cd translocation of roots to superficial biomass, that worth researching with more detail.

CONTENIDO

RESUMEN	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Suelo.....	4
2.2 Componentes del suelo.....	6
2.3 Características físicas y químicas	8
2.4 Elementos traza.....	9
2.5 Fitorremediación.....	12
2.6 Fitoestabilización asistida.....	17
2.7 <i>Simarouba glauca</i>	20
2.8 Biosólidos	21
2.9 Actividad enzimática	23
3. ANTECEDENTES.....	25
4. JUSTIFICACIÓN.....	28
5. HIPÓTESIS.....	29
6. OBJETIVOS	29
6.1 General.....	29
6.2 Particulares.....	29
7. MATERIALES Y MÉTODOS	30
7.1 Muestreos y acondicionamiento de muestras.....	30
7.1.1 Suelo	30
7.1.2 Planta	33
7.1.3 Biosólido	33
7.2 Diseño experimental	33
7.3 Determinaciones en suelo.....	36
7.3.1 pH	36
7.3.2 Conductividad eléctrica.....	36
7.3.3 Densidad real.....	36
7.3.4 Capacidad de retención de agua (CRA) y Porcentaje de humedad.....	37

7.3.5 Clase textural	38
7.3.6 Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC).....	39
7.3.7 Nitrógeno Total, Carbono Orgánico y Materia Orgánica.....	40
7.3.8 Actividad β -glucosidasa (EC 3.2.1.21)	42
7.3.9 Cuantificación de elementos traza biodisponibles.....	43
7.3.10 Cuantificación de elementos traza pseudo-totales.....	43
7.4 Determinaciones en planta.....	45
7.4.1 Clorofila A, B y TOTAL.....	45
7.4.2 Extracción y Cuantificación de Proteína Soluble	46
7.4.4 Actividad de Catalasa (CAT) EC 1.11.1.6	47
7.4.5 Actividad de Guayacol Peroxidasa (POD) EC 1.11.1.7	47
7.4.6 Producción de biomasa	48
7.4.7 Cuantificación de elementos traza	48
7.5 Determinaciones en biosólido.....	49
7.6 Análisis estadístico.....	50
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
8.1 Suelo.....	51
8.1.1 Fisicoquímicos.....	51
8.1.2 β -glucosidasa	56
8.1.3 Elementos traza	57
8.2 Planta.....	65
8.2.1 Elementos traza	65
8.2.2 Crecimiento y niveles de clorofila	74
8.2.3 Actividad enzimática	78
9. CONCLUSIONES	84
10. RECOMENDACIONES.....	85
11. BIBLIOGRAFÍA.....	86

INTRODUCCIÓN

Los elementos traza se encuentran de manera natural en los suelos a diferentes concentraciones, determinando así la calidad de estos. Sin embargo, la presencia de altas concentraciones de elementos traza en los suelos procedentes de actividades industriales y/o mineras pueden ocasionar efectos tóxicos a los organismos. El incremento de la toxicidad de elementos traza en el suelo se encuentra influenciada por las características fisicoquímicas del mismo como son: textura, pH, conductividad hidráulica y capacidad de intercambio catiónico (Kiely, 1999). Para ejemplo se observa como en suelos ácidos aumenta la disponibilidad de todos los elementos catiónicos así como en los suelos básicos disminuye la disponibilidad de hierro (Adriano, 2001). Adicional a lo anterior se debe considerar que los efectos contaminantes o tóxicos se ven potencializados por la característica estática del suelo, a diferencia del aire y agua.

Con respecto a la minería, México posee tal abundancia y diversidad de yacimientos minerales metálicos (803 proyectos activos), que han tenido un importante papel desde la época colonial, hasta la actualidad, ocupando los primeros lugares como productor de oro (10°), plata (2°), bismuto (2°), cadmio (6°) y plomo (5°) (INEGI, 2011). A pesar del beneficio económico que la actividad proporcionó, con 19 mil 896 millones de dólares en el año 2011 (SGM, 2011) tiene un impacto colateral negativo en la contaminación de suelos, resaltando el deterioro visual de paisajes causado por el abandono y disposición inadecuada de los residuos sólidos y líquidos con altas concentraciones de metales, desde 5 mg kg⁻¹, principalmente de arsénico, plomo, cadmio y talio.

La extracción de materiales pétreos genera incrementos en la concentración de elementos traza, que afectan negativamente la fertilidad y la capacidad amortiguadora y biodegradadora del suelo (Becerril *et al.*, 2007), impactando a su vez la biodiversidad y actividad de los organismos y microorganismos presentes en el suelo e indirectamente a la salud del hombre. Adicionalmente los residuos generados por la extracción de materiales pétreos (escorias o jales) afectan el

contenido de materia orgánica, cambios en el pH y la capacidad de intercambio catiónico del suelo (Wong, 2003).

De manera natural, diversas poblaciones de una gran variedad de especies vegetales son capaces de sobrevivir y colonizar suelos contaminados por elementos traza (metalófitas), si se les da la oportunidad y el tiempo necesario. En la búsqueda de alternativas de solución sustentables, y con un enfoque pertinentemente ambiental para los problemas causados al suelo por la actividad minera, se han explorado varias técnicas *in situ* entre ellas la fitorremediación, la cual se basa en el uso de especies vegetales que tienen la propiedad de desarrollarse en presencia de metales tóxicos (Lombi *et al.*, 2001). Dentro de las técnicas de fitorremediación que son utilizadas en la descontaminación de suelos, se debe considerar si la planta seleccionada presenta mecanismos de degradación, asimilación, metabolización o capacidad para detoxificar. Para la contaminación provocada por metales se involucran procesos en los cuales las plantas concentran los metales en las partes aéreas (fitoextracción), procesos en los cuales las raíces de las plantas se usan para absorber, precipitar y concentrar los metales (rizofiltración), y finalmente procesos donde las plantas toleran los metales y reducen su movilidad (fitoestabilización). Una manera de mejorar los procesos de fitoestabilización es mediante la adición de enmiendas (“abonos”) que pueden ser de origen orgánico o inorgánico, los cuales coadyuvan en el proceso de inmovilización y es conocido como fitoestabilización asistida.

El uso de biosólidos como enmienda orgánica para restaurar suelos contaminados, ha mostrado disminuir los daños ocasionados por la presencia de elementos traza, presentando beneficios en su estabilización y de recuperación de fertilidad. Comportamiento dado por la capacidad que presentan los biosólidos para formar complejos e incrementar el pH.

Actualmente en el municipio de Natividad, en la Sierra Juárez de Oaxaca, la actividad minera representa el 36.69% de la economía total en este municipio (Natividad, 2011) y sólo existe un estudio que demuestra la concentración total y la fracción biodisponible (extracción con agua desionizada) de elementos traza en los primeros

20 centímetros del suelo, además de reportes sobre la presencia de anomalías superficiales en la concentración de Arsénico, Plomo y Zinc, derivados de la explotación comercial de Oro, Plata y Plomo en minas de la zona (Servicio Geológico Mexicano, 2011). En el presente trabajo, se evalúa si existe un potencial riesgo de contaminación en el entorno y desarrollar una visión más amplia respecto al uso de la fitorremediación.

Debido a la poca investigación de la vegetación nativa de zonas tropicales secas y húmedas, que tolera mineralizaciones superficiales, acidez y erosionabilidad; se visualizó un gran potencial en las selvas sub-caducifolias y caducifolias debido a la presencia de suelos como Regosol, Cambisol, Acrisol y Luvisol. Tal vegetación no ha sido estudiada desde el punto de vista restaurador. Resulta pues importante estudiar a las comunidades vegetales presentes en los mencionados suelos, para desarrollar nuevas alternativas enfocadas a la fitorremediación. Asimismo en la zona de estudio y en general para la zona tropical y templada del estado de Oaxaca, no se han descrito especies vegetales tolerantes a la presencia de elementos traza, en comparación con regiones áridas que presentan actividad minera como en los estados de Chihuahua y Zacatecas, México.

Una clara observación de las características del sitio permitirá proponer alternativas de solución adecuadas, procurando que sean respetuosas con el medio natural y dar un avance en la conversión de la actividad minera a una industria que sea más verde. Considerando que dichas técnicas ofrecen la rehabilitación blanda o de bajo impacto, comparada con los clásicos métodos fisicoquímicos y que a su vez requieren menos inversión en infraestructura adicional. Cabe recordar que la orografía del sitio y en general del estado es accidentada, por lo tanto resulta importante evaluar los citados métodos.

MARCO TEÓRICO

2.1 SUELO

El suelo es la capa superior de la corteza terrestre, que consta de: rocas, sustancias de origen orgánico, aire, agua y organismos. Tales elementos se encuentran organizados, y sus partículas establecen relaciones de acuerdo a su tamaño, dando lugar a la formación de espacios vacíos que se comunican entre sí a través de canales que pueden contener aire o agua. Estos espacios a su vez albergan organismos, desde microscópicos hasta pequeños vertebrados, además de partes de organismos, como las raíces de las plantas. Tal heterogeneidad deriva en el conocimiento de cuatro funciones básicas del suelo (USDA, 2001):

- Sostener la actividad, diversidad y productividad biológica,
- Regular y particionar el agua y flujo de solutos,
- Filtrar, drenar, inmovilizar y desintoxicar materiales orgánicos e inorgánicos, incluyendo desechos municipales y de la industria,
- Almacenar y posibilitar el ciclo de nutrientes y otros elementos biogeoquímicos.

El proceso de formación del suelo es complejo, y está conducido por fuerzas como el clima (humedad y temperatura), el material consolidado original, la topografía y los organismos que lo utilizan como hábitat; asimismo se clasifica como un recurso no renovable, considerando la tasa de formación de 1 cm por cada 100 a 400 años (Porta *et al.*, 2003). El resultado de la interacción de estos elementos con el tiempo, da lugar a distintas características, que se ordenan en estratos que varían de acuerdo a la profundidad llamados “horizontes”. Los horizontes tienen características fisicoquímicas, que permiten albergar distintos organismos de acuerdo a sus requerimientos ecológicos, además de reflejar la información de los procesos que ocurrieron y ocurren en el paisaje; funcionando como “memoria de la biosfera” (Doran y Parkin, 1994).

El suelo es un sistema abierto y dinámico, y no debe considerarse como una simple mezcla de materiales sino como un cuerpo natural y vital para el funcionamiento de los ecosistemas, a través del cual se producen y regulan diferentes flujos de materia y energía, los cuales presentan una función reguladora importante dentro de ciclos biogeoquímicos, que se encargan de intercambiar componentes entre la atmósfera, hidrosfera y litosfera. Tal función de intercambio se efectúa por procesos como la filtración, acumulación, amortiguamiento y transformación de sustancias, que de manera conjunta o individual resultan benéficas o contaminantes; dichos procesos son realizados en el suelo a través de mecanismos como el intercambio catiónico, la adsorción específica, complejación, precipitación, inmovilización por organismos del suelo, así como las reacciones de oxidoreducción (McLaughlin *et al.*, 2000), y la actividad enzimática. Las actividades antropogénicas al estar relacionadas con los procesos desarrollados en el suelo han acelerado su deterioro, manifestándose a través de la erosión, acidificación, pérdida de materia orgánica, salinización, entre otras. Tal degradación se produce porque se ha considerado al suelo como almacén de todo tipo de sustancias, desde las generadas por actividad industrial hasta residuos urbanos, y en todos los casos con pocas o nulas medidas de control. De la misma manera la capacidad amortiguadora del suelo, se desprende de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias, además de propiedades y características del suelo, y condiciones ambientales presentes en el medio (Sposito, 2008). Dependiendo de los factores que se mencionaron anteriormente, los efectos que pueden originar los materiales acumulados en el suelo pueden variar en intensidad, y pueden manifestarse en el corto o largo plazo. En ambos casos, llega el momento en que el suelo supera su capacidad amortiguadora, pudiendo desencadenar efectos sobre el ambiente y la salud; uno de los principales contaminantes son los elementos traza; se trata de elementos químicos que forman parte de la materia viva en cantidades muy pequeñas o traza, algunos de estos elementos son esenciales para el crecimiento, desarrollo y salud de los organismos, usualmente las diferencias cuantitativas entre cantidades esenciales y metabólicamente excesivas son muy pequeñas. Para algunos elementos traza se

conoce su esencialidad en procesos vitales de plantas pero su función bioquímica aun no es comprendida (Kabata-Pendias y Pendias, 2001).

2.2 COMPONENTES DEL SUELO.

Con respecto a la definición anterior que se dio sobre el suelo, y lo mencionado por diversos autores, podemos resaltar que, se forma de 5 componentes principales: 1) materiales minerales, 2) materia orgánica, 3) organismos, 4) agua y 5) aire. La composición aproximada de un suelo arcillo limoso en óptimas condiciones para el crecimiento de plantas, es de 50% de espacio de poros en el cual se contiene agua y aire con una distribución similar, y 50% de espacio sólido en el cual el 45% es materia mineral y un 5% materia orgánica (Brady, 2001). Se presentan fluctuaciones en los porcentajes de composición, dependiendo del clima, ecología y demás factores naturales del sitio. Asimismo los cinco componentes se encuentran íntimamente mezclados, permitiendo ambientes ideales para la continuidad de procesos biológicos.

Los materiales minerales del suelo son variables en tamaño y composición, pero por lo regular se conforman de pequeños fragmentos de roca y minerales de varios tipos, mismos que vienen derivados de la intemperización de los materiales consolidados, Porta *et al.*, (2003) los denomina como heredados y neoformados. La naturaleza de los minerales es bastante variable en cuanto a su tamaño, pueden ser completamente gruesos, hasta partículas coloidales. Los minerales que podemos encontrar son cuarzos, silicatos y óxidos de hierro principalmente; además de elementos traza; los cuales son originados por la diversidad de mineralizaciones presentes en los suelos.

La materia orgánica en el suelo, es la acumulación de los residuos de plantas y animales (Brady, 2001), que son continuamente degradados como resultado de la actividad microbiana, lo que la convierte en transitoria y que se renueva constantemente por la adición de nuevos residuos. A pesar de ocupar solo un pequeño porcentaje (5 %) en el contenido de suelos muy ricos en materia orgánica, su influencia es muy importante para la dinámica del suelo. La materia orgánica

representa la principal fuente de nitrógeno, fósforo y azufre en el suelo, y también incrementan las cantidades de agua y aire presentes. Como se había mencionado el suelo es parte fundamental en los procesos biogeoquímicos, y la materia orgánica toma un importante papel en la producción de energía para que los microorganismos participen en dichos procesos. La materia orgánica consiste generalmente en dos grupos: a) los tejidos originales y parcialmente descompuestos de animales y plantas, y b) el humus (Brady, 2001).

La superficie del suelo y los huecos de sus distintos horizontes sirven para alojar organismos vivientes que se han adaptado a tales condiciones, ya sean animales o plantas. Sus tamaños van desde los roedores a los microorganismos unicelulares (Porta *et al.*, 2003). Dichos componentes activos del suelo, juegan un papel importante en la formación y mantenimiento de la fertilidad del suelo.

El agua presente en el suelo, ingresa y circula por los espacios disponibles hasta ocupar total o parcialmente los poros capilares (lugar donde se encuentra sostenida), variando en diferentes grados dependiendo de su cantidad a escala diaria (Brady, 2001). Asimismo tiene funciones de disolvente y transporte tanto de elementos nutritivos como contaminantes, haciendo posible su absorción a través de las raíces (Porta *et al.*, 2003). Tanto el agua aportada, como los minerales con función biológica conocida disueltos en el medio, están controlados por diversos fenómenos físicos.

El aire presente en el suelo, es muy diferente en comparación al aire atmosférico; considerando que únicamente se encuentra en los macro poros. Asimismo presenta un alto contenido de humedad, cantidades cercanas al 100% (Brady, 2001), oxígeno (O₂) en menor proporción a la atmosférica y contenidos de CO₂ derivados del ciclo biogeoquímico del carbono. El contenido y la composición del aire en el suelo están determinados por las relaciones entre agua – aire. De manera general el aire presente en el suelo se mueve en los macro-poros, los cuales presentan actividad en la evacuación, evaporación y secado ante las precipitaciones pluviales. El aire en los macro-poros del suelo, es determinante para la diversidad de

microorganismos, de tal manera que se pueden encontrar organismos de metabolismo aerobio o anaerobio.

2.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS

Una valoración efectiva de parámetros que midan los desequilibrios del suelo debe ser objetiva y debe considerar dos funciones principales: la ambiental y la productiva. Por la complejidad que presenta medir las inestabilidades, es necesario realizarla mediante múltiples características físicas y químicas.

Cuando hablamos de características físicas del suelo, la textura, capacidad de retención de agua (CRA) y densidad aparente (Bautista *et al.*, 2004) son normalmente propuestos para cuantificar alteraciones. Tales características son primordiales ya que no se pueden mejorar fácilmente, y reflejan la manera en que el suelo acepta, retiene y transfiere agua y coloides a las plantas. Asimismo dependen de la forma y tamaño de la composición mineralógica que lo forman, así como del ambiente que lo rodea. Las características químicas indicadoras de los procesos evolutivos, relaciones suelo – agua, calidad del agua, capacidad amortiguadora del suelo y disponibilidad de agua y nutrientes para los organismos presentes en el suelo (Bautista *et al.*, 2004), son: el pH, la conductividad eléctrica, la capacidad de intercambio catiónico (CIC), materia orgánica (MO), carbono orgánico (CO) y nutrientes básicos (Nitrógeno, Fosforo, Calcio, Azufre).

En función tanto de las características físicas como químicas de los suelos, es posible determinar aspectos como su fertilidad. Pero también permite clasificar las unidades del suelo desde un punto de vista litológico, y de esta manera entender con mayor facilidad los procesos erosivos y de intercambio catiónico, así como la proporción de limo, arena o arcillas presentes.

Asimismo existen indicadores sensibles al efecto de la degradación del suelo, destacando ciertas enzimas edáficas que resultan más sensibles que la MO. Efecto dado por la catálisis enzimática que representa un importante rol en el flujo de materia y energía en los ecosistemas (Liu *et al.*, 2008). Existen una variedad de

enzimas edáficas que nos indican el potencial del suelo para efectuar reacciones específicas tal como la ureasa y la proteasa que hidrolizan el N orgánico para producir N inorgánico ó la β -glucosidasa que hidroliza a las grandes cadenas de carbohidratos, proporcionando estructuras carbónicas esenciales y energía para el crecimiento de los organismos heterótrofos del suelo (Pajares-Moreno *et al.*, 2010).

2.4 ELEMENTOS TRAZA

Los metales pesados se designan como el elemento metálico con una densidad superior a 6 g cm^{-3} cuando está en forma elemental o también cuando su número atómico es superior a 20, excluyendo a los alcalinos y alcalinotérreos (Cala, 1998). El término de metal pesado es muy utilizado al hablar de contaminación de los diferentes medios: aire, agua y suelo; sin embargo, normalmente se incluyen elementos tóxicos y no tóxicos dentro de esta categoría. Debido a la ambigüedad con la que puede ser tomada la definición de metal pesado en cuanto a temas relacionados con la contaminación, adoptaremos la denominación de elemento traza, usada en ciencias del suelo, para hacer referencia a todos los minerales presentes en el suelo en un intervalo de concentración de 0.01 a 100 mg kg^{-1} . Cuando se trata de material vegetal, considerando que una planta típica está compuesta por aproximadamente un 3% de elementos minerales, cuyas concentraciones sirven para indicar la calidad del medio donde vive, Los elementos traza se tratan como los elementos químicos que forman parte de la materia en cantidades muy pequeñas (Madejón *et al.*, 2002).

Existen elementos traza que los seres vivos requieren en pequeñas cantidades para completar su ciclo vital y desempeñar una función biológica conocida. Dentro de este grupo se encuentran As, B, Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni, Se y Zn (Bowen, 1979). La deficiencia en alguno de estos elementos puede llegar a ser incluso letal. También existen elementos traza esenciales o micronutrientes, que intervienen en procesos metabólicos fundamentales como la respiración, la fotosíntesis, la fijación y la asimilación de algunos macronutrientes (N y S). Además están aquellos que pertenecen a los denominados metales de transición, que pueden activar enzimas o

ser incorporados en las metaloenzimas como sistemas de transporte de electrones (Cu, Fe, Mn y Zn), o incluso catalizar cambios de valencia en el sustrato (Cu, Co, Fe y Mo). Algunos elementos traza (Al, Cu, Co, Mo, Mn y Zn) presentan otras funciones, como formar parte de proteínas que están implicadas en la resistencia al frío y el calor en plantas. Así como elementos que no se les conoce ninguna función vital para las plantas y pueden resultar tóxicos a concentraciones muy pequeñas (Cd, Pb, Tl y Hg) (Kabata-Pendias y Pendias, 2001; Baker *et al.*, 1994; Lasat, 2002).

Dentro de las características que hacen relevantes a nivel ambiental a los elementos traza, podemos destacar los mencionados por Facchinelli *et al.*, (2001):

- 1) Carácter acumulativo ya que no son biodegradables, de tal forma, que su concentración no disminuye con el tiempo, a diferencia de la mayoría de los contaminantes orgánicos.
- 2) Presencia en forma de cationes, interaccionando con algunos componentes del suelo que, en última instancia, determinarán su movilidad y disponibilidad hasta otros componentes del ecosistema.
- 3) Se encuentran presentes en el suelo de forma natural, en función del tipo de material original y de los procesos edafogénicos ocurridos, por lo que se requiere el estudio de las concentraciones normales para poder caracterizar procesos de contaminación de origen humano.

La presencia de elementos traza en el suelo puede tener un origen natural (cuando proceden de la degradación de materiales consolidados), o un origen antrópico (cuando provienen de actividades humanas contaminantes). Los principales factores que tienen influencia en el origen natural de los elementos traza son: la composición del material consolidado y los procesos que tienen lugar durante la formación y evolución del suelo. Así, los elementos traza contenidos en las redes de los minerales son liberados al suelo, como consecuencia del interperismo de las rocas; y pueden convertirse en un peligro para los ecosistemas y la salud humana en determinadas anomalías geoquímicas, es decir, áreas con la concentración de elementos metálicos elevada (Davies, 1980). Sin embargo, pese al fenómeno, los metales suelen incorporarse al suelo a bajas concentraciones.

Los contenidos naturales de elementos traza presentes en el suelo pueden incrementarse rápidamente debido a las actividades antropogénicas, es a través de un monitoreo del contenido y de movimientos, que se puede identificar si los incrementos se dan de manera puntual o difusa al igual que en la contaminación de agua o aire. A su vez las fuentes puntuales pueden clasificarse en estacionarias y móviles en función de la movilidad de la emisión de la contaminación. Y es así como consideramos a la actividad industrial, pero sobre todo a la actividad minera como la más importante fuente estacionaria de residuos sólidos, efluentes líquidos y emisiones gaseosas con importante contenido de elementos traza, aunque a pesar de ser contaminación estacionaria no está exenta de fenómenos como la dispersión. Tales fenómenos de dispersión, principalmente en agua y aire, son los responsables de tener una contaminación difusa que se caracteriza por un menor aporte de contaminantes por unidad de superficie, aunque no por esto de menor extensión o magnitud.

Los elementos traza presentes en el suelo pueden encontrarse en diferentes formas en función del origen, características del material, propiedades edáficas y las condiciones ambientales. Mclean y Bledsoe (1992) establecen 7 posibles estados: 1) en la solución del suelo como metal libre, formando complejos asociados a coloides móviles; 2) en las posiciones de intercambio de los constituyentes inorgánicos del suelo; 3) adsorbidos específicamente a los constituyentes inorgánicos; 4) adsorbidos a la materia orgánica insoluble; 5) precipitados en forma de carbonatos, fosfatos, hidróxidos, silicatos, aluminatos, etc. 6) en la estructura de los minerales secundarios; ó 7) en la estructura de los minerales primarios. Los minerales de origen natural los podemos encontrar en cualquiera de los 7 estados mencionados, mientras que para los elementos traza introducidos a través de la actividad minera y en general de las actividades humanas, suelen encontrarse en las cinco primeras formas mencionadas, en función de la formación y evolución del suelo. Para los dos casos de distribución de elementos traza, la solución del suelo y las reacciones de equilibrio entre las diferentes fracciones representan los factores más importantes que determinan el comportamiento y la movilidad de los elementos traza.

La concentración de elementos traza en la solución del suelo, está gobernada por una gran variedad de procesos interrelacionados, que los podemos englobar en la formación de complejos, reacciones de precipitación–disolución, adsorción–desorción y las reacciones de oxidación–reducción. Reacciones que se ven influenciadas y condicionadas por las características fisicoquímicas y biológicas de los suelos así, como de la presencia de determinados componentes. Asimismo se debe considerar la presencia de compuestos metálicos en los jales, debido a procesos de erosión, donde las reacciones de oxidación, disolución y adsorción – desorción toman un papel importante en el aporte de metales al sitio.

Por los niveles de concentración que presentan los suelos cercanos a la actividad minera ($\geq 100 \text{ mg kg}^{-1}$), el termino metal pesado pareciera resultar el adecuado, pero dado que la concentración no se encuentra completamente biodisponible, el termino elemento traza resulta más apropiado; considerando también que normalmente los elementos traza que están en mayor concentración son el arsénico y el aluminio, mismos que presentan importancia ecológica, pueden convertirse en tóxicos dependiendo de la concentración y no cumplen con las características para definirlos como metal pesado.

2.5 FITORREMEDIACIÓN

Dentro de las técnicas in-situ de rehabilitación de ecosistemas se encuentra la fitorremediación, consistente en utilizar plantas para remover, transferir, estabilizar y concentrar contaminantes orgánicos e inorgánicos en suelos, sedimentos y agua. Dentro de la fitorremediación se aprovechan las características descritas de la planta para remediar los ecosistemas contaminados con una gran variedad de compuestos (Pilon-Smits, 2005). A su vez dependiendo del uso que se dé a la planta, se habla de distintas clasificaciones de fitorremediación como pueden ser: fitoestabilización, fitoextracción, fitodegradación ó fitovolatilización (figura 1).

Dentro de las citadas clasificaciones, la fitoextracción y la fitoestabilización presentan características más interesantes para considerar su uso en la

rehabilitación de grandes extensiones de suelos contaminados por la actividad minera (Méndez y Maier, 2008).

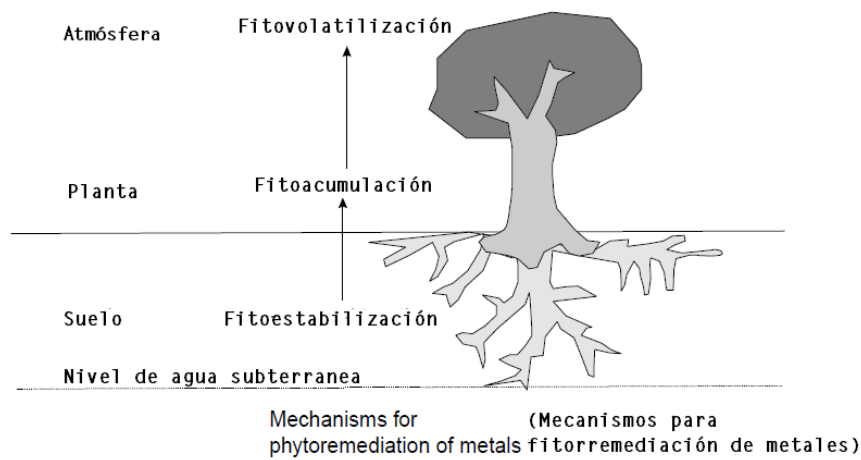


FIGURA 1 Diagrama con los mecanismos de absorción de metales en el proceso de fitorremediación (tomado y traducido de Mulligan *et al.*, 2001)

La fitoestabilización se enfoca en la formación de una cubierta vegetal que secuestra metales mediante procesos de inmovilización en la rizosfera de la planta reduciendo su biodisponibilidad y consecuentemente disminuyendo la exposición a vida silvestre y humanos (Wong, 2003). Por otra parte, la fitoextracción es el uso de las plantas para remover los contaminantes, especialmente elementos traza, de suelos contaminados. En la fitoextracción las plantas pueden acumular y tolerar cantidades inusualmente altas de elementos traza en los tejidos de su biomasa superficial (plantas hiperacumuladoras), la cual es cosechada y se retira una parte del elemento traza del suelo.

Las investigaciones con plantas llamadas hiperacumuladoras también consideran la interacción que tiene la planta con los microorganismos presentes en las raíces. Sin embargo, existen aun muchas cuestiones sin resolver en relación a la evolución de estas inusuales características presentes en plantas. Por una parte, en las plantas hiperacumuladoras se han encontrado mecanismos de absorción y tolerancia, y por otra la hiperacumulación se considera como un proceso activo que parece estar implicado en la protección de la planta contra patógenos y herbívoros, confiriéndole

una posible ventaja adaptativa que aun no está bien establecida (Behemer *et al.*, 2005).

Las plantas pueden adoptar distintas estrategias frente a la presencia de metales en su entorno. Unas basan su resistencia a los metales con la estrategia de exclusión del metal, restringiendo su transporte a la parte aérea y otras más prefieren acumular el metal en la parte aérea en una forma no tóxica para la planta. La exclusión es más característica de especies sensibles y tolerantes a los metales, mientras que la acumulación es más común de las especies que aparecen siempre en suelos contaminados con metales. (Barceló y Poschenrieder, 2003).

El mecanismo de acumulación dado principalmente en plantas hiperacumuladoras, es protegerse formando complejos metálicos menos tóxicos con quelantes (fitoquelatinas, ácidos orgánicos, aminoácidos y flavonoides) y/o secuestrando los metales desde zonas con metabolismo activo (citoplasma) hacia el interior de vacuolas o en la pared celular, dónde no puedan ocasionar efectos adversos (Krämer *et al.*, 1996; Vázquez *et al.*, 2006). Existen 5 hipótesis propuestas sobre el origen de la función hiperacumuladoras de las plantas: a) como medio de tolerancia y eliminación, b) como elemento alelopático contra los competidores más cercanos, c) como resistencia osmótica contra la sequia, d) protección contra el daño por patógenos y herbívoros y e) de manera accidental (Alford *et al.*, 2010); que difieren de la defensa química natural existente en todas las plantas, basada en la síntesis de productos orgánicos procedentes del metabolismo secundario

Las estrategias de exclusión utilizadas por las plantas para evitar los incrementos no deseados de elementos traza, son principalmente extracelulares como las micorrizas, exudados extracelulares (ácidos orgánicos) y la pared celular (Martens *et al.*, 1994).

CUADRO 1 Comparación de los diferentes métodos de remediación de suelos contaminados. (Mulligan *et al.*, 2001; Pilon-Smits, 2005).

	Fitorremediación	Electrocinética	Lavado de suelos	Reacciones redox
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Menores costos(24,000 USD/Ha) • Eficiente con BTEX's, HAP*, metales, elementos radioactivos • Bajo impacto ambiental. • Recuperación integral del suelo. • In situ • Posibilidad de uso de la biomasa generada 	<ul style="list-style-type: none"> • Pueden remover orgánicos polares y metales. • No requiere mucha energía. 	<ul style="list-style-type: none"> • Efectivo para HC, HAP, PCP*. • Tecnología a corto plazo. • Equipo accesible. • Exitoso en hidrocarburos 	<ul style="list-style-type: none"> • Puede ser in situ o ex situ. • Útil para remover compuestos inorgánicos • Puede estabilizar otros contaminantes
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Ocurrencia solo de estabilización del contaminante • Tiempo de restauración largo. • Contar con método adecuado de disposición de biomasa cosechada. 	<ul style="list-style-type: none"> • No es eficiente en medios con humedad menor a 10% • Depósitos minerales, valores extremos de pH y reacciones redox, provocan problemas 	<ul style="list-style-type: none"> • Los residuos generados deben tratarse o disponerse. • Más costoso y necesidad de permisos por residuos generados • Altera propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del suelo 	<ul style="list-style-type: none"> • Puede ocurrir formación de intermediarios mas tóxicos • Costo elevado • Afectaciones a la masa microbiana

* BENCENO, TOLUENO, ETILBENCENO, XILENO (BTEX), HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP), HIDROCARBUROS (HC), POLICLOROFENOLES (PCP).

La rehabilitación de sitios contaminados con elementos traza tóxicos es particularmente desafiante. A diferencia de los compuestos orgánicos, los elementos traza no pueden ser degradados y para su limpieza normalmente se requiere remoción (Lasat, 2002). Razón por la cual la fitorremediación se ha convertido en una técnica adecuada para la rehabilitación de ecosistemas, ya que es pertinentemente ambiental y constituye una buena relación costo beneficio que permite la reutilización del suelo tratado con un fin agrícola o forestal, así como evitar la transferencia de elementos traza a aguas subterráneas y reducir los efectos de erosión (Cuadro 1).

El establecimiento de fitotecnologías no se basa de manera única en las ventajas ofrecidas para rehabilitar ecosistemas, también es importante conjuntar tales premisas con la capacidad de adaptación a distintas condiciones climáticas, su accesibilidad y algunas características morfológicas (Cuadro 2).

CUADRO 2 Características deseables para especies fitorremediadoras (Baker *et al.*, 2000; Brooks, 1998)

CARACTERÍSTICA	
Tipo de raíz	Sistema fibroso con numerosas raíces pequeñas, extensión en el suelo con alta superficie de contacto.
Profundidad de raíz	Con capacidad de bajar más de 2.43 m (8 ft), se consideran eficientes desde 30 cm (1 ft)
Velocidad de crecimiento	Rápido crecimiento en sus raíces y biomasa superficial. (Tamaño óptimo 8-20 años).
Criterios de resistencia	Tolerancia a enfermedades, calor, frío, insectos, sequía, suelos salinos, químicos, estrés.
Resistencia a metales.	Concentraciones en tejido de plántula (mg kg ⁻¹) As ≥ 1,000, Cd ≥ 100, Cu ≥ 1,000 – 5,000, Mn y Pb ≥ 1000 – 10,000, Zn ≥ 10,000.
Otros criterios	Efectos alelopáticos, especie no invasiva. Gran producción de biomasa aérea.

De acuerdo con la estrategia de acumulación las plantas hiperacumuladoras pueden superar en 100 veces los valores normales de elementos traza acumulados (Baker, 1981). Son especies tolerantes a uno o más elementos traza y a menudo su distribución está restringida a suelos ricos en un amplio intervalo de concentraciones de metales pues no son competitivas en zonas no contaminadas. Baker *et al.*, (2000) mostraron que la hiperacumulación ha evolucionado en más de 400 especies de plantas repartidas en 45 familias botánicas como: *Thlaspi caerulescens* (carraspique alpino), *Macadamia neurophyla* (macadamia), *Salix fragilis* (mimbrera). Asimismo Yan-Ming Zhu *et al.*, (2010) identificó taxonómicamente en estudios de rehabilitación, algunas especies de plantas asociadas a terrenos y jales mineros, encontrando 24 familias entre ellas la *Simaroubaceae*.

Recientemente se ha incrementado el interés por usar plantas nativas o las que resulten menos invasivas y así reducir cualquier efecto nocivo en el ecosistema por la introducción de nuevas especies de plantas (González y González-Chávez, 2006), consideración especialmente importante en áreas con endemismos como es el caso de Oaxaca. Congruente con tales argumentos, así como la identificación de algunas características mencionadas en el cuadro 2, se eligió *Simarouba glauca* (figura 2) como caso de estudio.

2.6 FITOESTABILIZACIÓN ASISTIDA

Una de las limitaciones que encuentran las especies vegetales usadas en la fitorremediación es la extracción de los metales, condición que viene limitada por la disponibilidad del metal para ser tomado por las raíces particularmente en suelos neutros o alcalinos. En virtud de las características previamente descritas, una estrategia prometedora es la fitorremediación asistida de la complejación de metales a través de la adición de biosólidos (Quartacci *et al.*, 2005).

Es importante mencionar que para la fitorremediación de suelos dañados por la actividad minera o jales asociados, es de valor agregado contar con un acercamiento biotecnológico integral, el cual incluye la mezcla de los suelos dañados con desechos

orgánicos, biofertilizantes y hongos micorrizales con el fin de reforestar y restaurar la fertilidad de los suelos dañados (Juwarkar y Jambhulkar, 2007).



FIGURA 2 Árbol de *Simarouba glauca* en época de fructificación con detalle de fruto y hojas (ERB.2012)

Durante las actividades mineras los nutrientes del suelo son lixiviados de manera rápida acelerando así las velocidades de erosión, adicionalmente hay que recordar la acumulación de jales, ya que ambos fenómenos representan limitaciones químicas y físicas para el crecimiento de plantas (Chaulya *et al.*, 2000). Entre las principales limitaciones químicas se encuentra la ausencia de nitrógeno y fósforo disponible, y las limitaciones físicas para el crecimiento de plantas son la poca porosidad, aireación e infiltración de agua a lo largo de los bloques de suelo y la limitada actividad microbiana. Tales problemas pueden ser resueltos aplicando desechos

convenientes para el establecimiento de rizosfera y conseguir una saludable cobertura vegetal (Juwarkar y Jambhulkar, 2007).

Los biosólidos han mostrado resultados controversiales en cuanto al aumento o no de la biodisponibilidad del metal en el suelo para ser tomado por las raíces. Se puede explicar la función de dicho biosólido básicamente como un agente quelante (sustancia que forma complejos con iones de metales a través de moléculas multidentadas) que puede formar varios enlaces con el ion metálico. El agente quelante puede ser natural o sintético, y mediante éste se liberan los metales a la forma hidrosoluble del metal acomplejado adsorbido en el suelo, previniendo así la precipitación y adsorción. Los quelantes guardan una relación directa con la toxicidad, manteniéndola o aumentándola, considerando que un metal en su forma acomplejada reduce notablemente su toxicidad, esto es explicado por los enlaces que previenen su acción normal (Schmidt, 2003).

La absorción de metales disueltos a través de los agentes quelantes naturales de las plantas ha sido atribuida a los microorganismos asociados a las raíces de las plantas (micorrizas) que tienen el potencial de aumentar el área de absorción y estimular la toma de nutrientes incluyendo iones metálicos (Lasat, 2002), así como compuestos orgánicos exudados que facilitan la absorción de ciertos metales como los ácidos cítrico, oxálico o málico.

Un mecanismo que se ha descrito sobre la toma del metal tanto para los agentes quelantes naturales o sintéticos, depende de sus características tales como su carácter hidrofóbico, constante de estabilidad con el metal, pKa y tamaño del complejo. Aunque en general el transporte a través de las membranas celulares de las raíces ocurre de las partes externas de las raíces al xilema, éste toma lugar a través de dos rutas principalmente (figura 4): la apoplástica (transporte a través de la membrana celular de célula a célula) y la simplástica (cruce a través de unidades continuas de citoplasma) (Wenger, 2000).

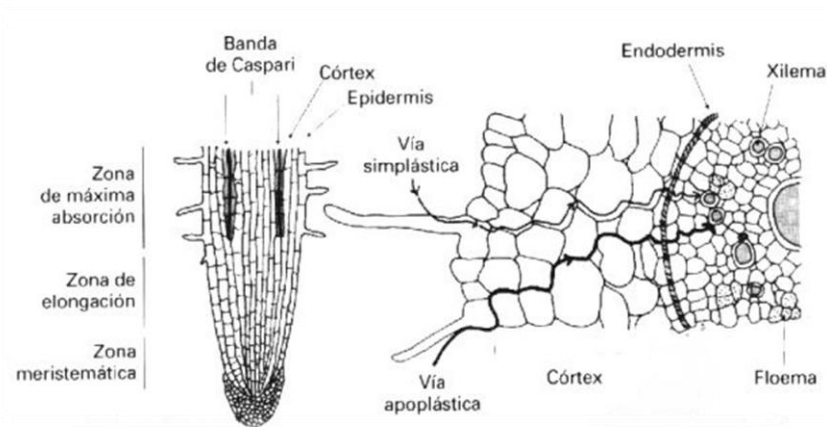


FIGURA 3 Esquema de vía simplástica y apoplástica para incorporar nutrientes a través de la raíz (Chaparro *et al.*, 2002)

2.7 SIMAROUBA GLAUCA

Es un árbol de 8 a 15 metros (m) de altura (hasta 30 m), distribuido en zonas tropicales y subtropicales de México ($14^{\circ}40' - 21^{\circ}30' \text{ LN}$ y $87^{\circ}00' - 104^{\circ}50' \text{ LW}$) en la vertiente del golfo desde el istmo de Tehuantepec hasta la península de Yucatán y en la vertiente del Pacífico desde Colima hasta Chiapas, también distribuido en Centroamérica, islas del Caribe y la parte Norte de América del Sur.

Los árboles de *Simarouba glauca* son de copa irregular, con hojas alternas pinnadas, compuestas por 8 a 16 folíolos de forma irregular. Especie dioica, que comienza a florecer en el cuarto año con fructificación regular en el 5 año (figura 3). El aceituno o negrito (*Simarouba glauca*) es un árbol caducifolio ó subcaducifolio de rápido crecimiento, con una gran biomasa superficial. Presenta resistencia a la sequía y crece en suelos de tipo vertisol pélico, luvisol crómico y rendizina, prefiriendo suelos arenosos. Es una especie de fácil adaptación creciendo entre los 0 – 300 metros sobre el nivel del mar (msnm) pudiendo cultivarse hasta los 1000 msnm. Además se ha probado con éxito el uso de su madera como material de construcción y para restauración de zonas de selva degradadas. (Museum d’Histoire Naturelle, 1811).



Taxonomía

Reino. Plantae

Phyllum. Spermatophyta

Subphyllum. Magnoliophyta

Clase. Magnoliopsida

Subclase. Rosidas

Orden. Sapindales

Familia. Simarubaceas

FIGURA 4 Características de identificación de *Simarouba glauca* (museum d'histoire naturelle, 1811)

2.8 BIOSÓLIDOS

Los biosólidos son definidos como los lodos provenientes del desazolve de los sistemas de alcantarillado, de las plantas de potabilizadoras y de las plantas de tratamiento de aguas residuales, que han sido sometidos a procesos de estabilización y que por su contenido de materia orgánica, nutrientes y características adquiridas después de su estabilización, pueden ser susceptibles de aprovechamiento (SEMARNAT, 2002). La NOM-004- SEMARNAT clasifica a los biosólidos con base a su contenido de metales pesados (cuadro 3); a su contenido de patógenos y parásitos (cuadro 4). De acuerdo al contenido de metales, patógenos y parásitos y un contenido de humedad de hasta el 85%, resulta el tipo de aprovechamiento como mejorador de suelos (cuadro 5).

CUADRO 3. Clasificación de los biosólidos por su contenido de metales. Límites máximos permitidos

Contaminante (determinados en forma total)	Excelentes mg kg ⁻¹ en base seca	Buenos mg kg ⁻¹ en base seca
Arsénico	41	75
Cadmio	39	85
Cromo	1200	3000
Cobre	1500	4300
Plomo	300	840
Mercurio	17	57
Níquel	420	420
Zinc	2800	7500

CUADRO 4. Clasificación de biosólidos por su contenido de patógenos y parásitos

CLASE	INDICADOR BACTERIOLÓGICO DE CONTAMINACIÓN	PATÓGENOS	PARÁSITOS
		Coliformes fecales NMP/g en base seca	Salmonella spp. NMP/g en base seca
A	< 1,000	< 3	< 1 (huevos de helmintos viables)
B	< 1,000	< 3	< 10
C	< 2,000,000	< 300	< 35

NMP = número más probable.

Los desechos orgánicos provenientes de fuentes domésticas e industriales, como los biosólidos, residuos de papeleras, compost, etcétera, muestran un potencial nutritivo además de representar una solución económicamente viable para reutilizarlos, y disminuir el problema ocasionado por el espacio demandado para su disposición. El uso de biosólidos favorece el establecimiento y proliferación de

vegetación y microorganismos. Razón por la cual juegan un papel importante en el mejoramiento de las propiedades físico-químicas de los suelos que son el sustrato para la proliferación de flora y micro flora. Asimismo el restablecimiento de la actividad microbiana en suelos degradados por la actividad minera, promueve la continuidad de los ciclos biogeoquímicos y el desarrollo del ecosistema (Kumar *et al.*, 2007).

CUADRO 5. Usos de biosólidos, de acuerdo a su clasificación, (NOM-004-SEMARNAT-2002)

TIPO	CLASE	APROVECHAMIENTO
EXCELENTE	A	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Usos urbanos con contacto público directo durante su aplicación. ✓ Los establecidos para clase B y C
EXCELENTE O BUENO	B	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Usos urbanos sin contacto público directo durante su aplicación ✓ Los establecidos para clase C
EXCELENTE O BUENO	C	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Usos forestales ✓ Mejoramiento de suelos ✓ Usos agrícolas

Por lo que al aplicar los biosólidos en suelo, podría inducirse un estrés abiótico a la planta con lo que tal vez resulte en una mayor toma de metales, pero se debe tener cuidado en adicionar un biosólido que sea fácilmente biodegradable y no represente alguna fitotoxicidad que reduzca la actividad buscada (Schmidt, 2003).

2.9 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las enzimas son los catalizadores biológicos conformados por aminoácidos, proteínas o RNA que disminuyen la energía requerida para activar diversas reacciones bioquímicas. En el caso del suelo, las enzimas son sub-sistemas moleculares de organismos del suelo que pueden ser usados como indicadores de la calidad del suelo afectado por distintas variables ambientales. El trabajo de las enzimas en los organismos vivos, como las plantas es un proceso complejo de

comprender sin embargo destaca su capacidad para regular procesos metabólicos relacionados con la nutrición y protección de estrés en la planta.

Las enzimas del suelo son proteínas sintetizadas que se pueden encontrar en organismos vivos (bióticas), en células de microorganismos y tejidos de plantas en descomposición (abióticas) o en forma acomplejada con coloides orgánicos y minerales. La mezcla heterogénea de enzimas del suelo controla de manera secuencial la despolimerización y transformación de la materia orgánica del suelo que sustenta al humus. La enzima β -glucosidasa despolimeriza celulosa en subunidades de glucosa que puede ser utilizada por heterótrofos como fuente de carbono y energía (Gregorich *et al.*, 1994).

Como es bien sabido diversos tipos de estrés abiótico como la sequia, salinidad, temperaturas extremas, radiación intensa, deficiencia de nutrientes, contaminantes entre otros, causan daño molecular a las plantas de manera directa o indirecta a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que incluye a los radicales súperoxido (O_2^-), hidroxilo (OH^*) así como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2). (Shah *et. al*, 2001).

Las células de las plantas han desarrollado un mecanismo de defensa antioxidante para hacer frente a las ROS, que varían de acuerdo a distintos niveles celulares y sub-celulares de acuerdo al tipo de planta y a la intensidad del estrés. La concentración de los radicales mencionados en las plantas dependen de la actividad de las enzimas antioxidantes involucradas en la detoxificación tales como súperoxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y distintas peroxidasas (Sinha *et al.*, 2010).

ANTECEDENTES

En el municipio de Natividad perteneciente al distrito de Ixtlán en el estado de Oaxaca se encuentra la compañía minera Natividad y anexas S.A. de C.V. La actividad extractiva se remonta 200 años atrás, generando alteraciones ambientales tanto a los suelos aledaños como a los cuerpos de agua ubicados en la zona, los cuales fueron detectados en el año 2007 por la delegación estatal de la Procuraduría Federal de Protección al ambiente (PROFEPA) en Oaxaca, donde se observó el incumplimiento a la NOM-157-SEMARNAT-2000 que establece los elementos y procedimientos para establecer planes de manejo de residuos mineros, derivó en un cierre parcial de la mina (Hernández y González, 2011). Las alteraciones ambientales no son el único lastre que deja la actividad minera a manos de las empresas transnacionales o nacionales, también se suman a esta actividad el desplazamiento de los pueblos debido a la destrucción e in-sustentable funcionamiento de la industria minera desarrollada en México y toda Latinoamérica; debido a esta problemática surgen redes de información y apoyo como la Red Mexicana de Afectados por la Minería en México y el Observatorio de Conflictos Mineros en América Latina, donde se pueden encontrar los conflictos mineros vigentes en el estado de Oaxaca, que crecen en número e impactos socio-ambientales debido a la existencia de vacíos legales y la carencia de una estricta vigilancia.

Se sabe del gran aporte de residuos que genera la actividad minera a través de la fracción de rocas sin interés económico obtenidas en el proceso de minería, conocidos comúnmente como “jales mineros” que tienen un importante efecto en el ambiente debido a los bajos valores de pH, altos contenidos de metales pesados y su susceptibilidad a erosionarse. Conesa, *et al.* (2007) mencionan 2 tipos de riesgo que presentan los depósitos de jales mineros: 1) afectación de la estabilidad estructural del depósito debido a procesos intensos de erosión, sismos y fenómenos meteorológicos que pudieran provocar un colapso, (ejemplo: Aznalcóllar, Sur de España, 1998); 2) liberación de metales a través del drenaje de la mina y erosión de los depósitos de jales. Los anteriores efectos pueden tener afectaciones locales, o

incluso regionales afectando zonas urbanas y agrícolas con el consecuente riesgo en los humanos.

La falla en el depósito de jales de Aznalcóllar (SE España), liberó aproximadamente 5 000 000 m³ de lodo ácido y tóxico afectando un total de 4,286 hectáreas a lo largo de las cuencas de los ríos Guadiamar y Agrio. Una banda de 400 m de ancho por 40 km de largo en ambos lados del cauce del río se cubrió con una capa de lodo tóxico de hasta 30 cm. Posterior al derrame se inicio rápidamente el procedimiento de limpieza, consistiendo en el retiro del lodo con medios mecánicos durante 6 meses. Debido a la persistencia de problemas de contaminación por elementos traza (As, Au, Bi, Cd, Cu, Pb, Sb, Tl y Zn) en la zona se inicio una restauración de suelos con la adición de enmendadores ricos en materia orgánica y calcio (espuma azucarera, suelos rojos, abonos orgánicos), adicional a un plan de restauración a gran escala consistente en una reserva natural, llamada corredor verde donde se utilizó en las primeras etapas vegetación nativa tolerante a altas concentraciones de metales, con el objetivo de inmovilizar los elementos traza presentes en el sitio (Cabrera *et al.*,1999).

La fitoestabilización es una tecnología de bajo costo usada para disminuir la movilidad, toxicidad y dispersión de contaminantes llevada a cabo principalmente por las raíces de las plantas, se ve beneficiada por el sistema de raíces extendidas de los arboles (Vamerali *et al.*, 2009), razón por la cual se han estudiado la estabilización de contaminantes en el tejido de especies maderables, utilizado con éxito arboles de rápido crecimiento (*Alnus rubra*, *Platanus occidentalis*, *Betula pendula* entre otros) en la llamada “short-rotation forestry SRF (silvicultura de rápida rotación) y adicional a tales efectos benéficos se han reportado dos posibles problemas, que el desarrollo de las raíces pueda facilitar la entrada de contaminantes en la cadena alimenticia y que puede generar macroporos en el suelo donde los contaminantes pueden lixiviarse (Roulier *et al.*,2008).

Madejón y Murillo, (2004), utilizaron arboles en combinación con una enmienda orgánica para cuantificar los efectos de estabilización y/o toxicidad de elementos

traza en los suelos afectados del corredor verde del Guadamar, reserva generada tras el accidente de Aznalcóllar. La estrategia se basó en el uso de árboles útiles para técnicas de fitoestabilización (*Olea europea L. var. Sylvestris* y *Quercus ilex L. subesp. Ballota*), que mejoran la calidad del suelo y evitan la dispersión de contaminantes que puede ocasionar el agua o el viento, tomando como base los árboles de rápido crecimiento usados en la fitorremediación. A la par del uso de estos árboles, se usó una enmienda orgánica, rica en ácidos fúlvicos que bien pueden obtenerse de biosólidos provenientes de plantas de tratamiento de agua residual, agua residual y otros residuos, estrategia especialmente útil cuando se requieren grandes cantidades de agua o nutrientes y se contribuye a resolver el problema de ubicación de estos residuos. En muchos casos se emplea la “fitoestabilización asistida”, que consiste en la aplicación de enmiendas que disminuyen la concentración de elementos traza disponibles y mejoran las condiciones físico-químicas del suelo para un mejor establecimiento de la cubierta vegetal (Madejón *et al.*, 2006; Vangrosveld *et al.*, 2009).

El uso de las enmiendas a generado resultados controversiales, por un lado se ha mencionado un aumento en la absorción mientras que también se ha encontrado una menor biodisponibilidad al agregar residuos orgánicos en suelos contaminados con distintos metales (Lasat, 2002). Asimismo la cantidad de enmienda adicionada y su efecto ha generado una discusión referente a la tasa de aplicación, variando su uso desde 12-24 Mg Ha⁻¹ con incrementos en la actividad enzimática hasta valores de 200-600 Mg Ha⁻¹ que incrementaron la presencia de elementos traza sin ser tomados por la vegetación (Hargreaves *et al.*, 2008).

Sánchez *et al.*, (2003) experimentaron con 17 especies con el objetivo de encontrar especies capaces de sobrevivir y recuperar sitios afectados por la minería a cielo abierto en Holguinero de Mayarí, Cuba; encontrando en *S. glauca* una de las 2 especies usadas en el citado trabajo, con mayor potencial de ser usadas debido a su alta tasa de regeneración natural y su contribución como refugio de fauna.

JUSTIFICACIÓN

Considerando las exitosas experiencias previas en el uso sinérgico de enmiendas orgánicas y árboles, se planteó para el presente trabajo el uso de una enmienda orgánica que en general ha sido probada con éxito, realizada a partir del compostaje de biosólidos.

Adicional al uso de la enmienda se planteó el uso de vegetación arbórea propia de las zonas subtropicales del país con el fin de explorar la capacidad de especies que se encuentran en la región desde un punto de vista enfocado a la fitorremediación, considerando los pocos informes referentes a vegetación arbórea nativa (*Tecoma stans*, *Platanus mexicana*), usada para rehabilitar zonas contaminadas con elementos traza en México.

De tal manera que el planteamiento de una fitoestabilización asistida usando compost de biosólidos y una especie arbórea, representa aplicar por primera vez esta fitotecnología para el estado de Oaxaca, e incrementar el conocimiento para las demás zonas mineras del País.

HIPÓTESIS

El uso de la enmienda biológica (compost de biosólido) en el suelo contaminado, incrementará el contenido de materia orgánica y la actividad biológica; modificando la disponibilidad de elementos traza para favorecer los mecanismos de fitoextracción o fitoestabilización de *Simarouba glauca*.

La presencia de elementos traza en concentraciones tóxicas en suelos, inducirá estrés oxidativo en *Simarouba glauca*.

OBJETIVOS

6.1 GENERAL

Evaluar a nivel invernadero el potencial de *Simarouba glauca* como especie fitoestabilizadora.

6.2 PARTICULARES

- Diagnosticar la presencia de elementos traza y evaluar el riesgo actual de contaminación en suelos de Natividad.
- Determinar el efecto de los biosólidos como enmienda en el suelo contaminado con metales traza, utilizando las propiedades físico-químicas y la actividad enzimática β -glucosidasa, como indicadores.
- Demostrar que *Simarouba glauca* es una planta tolerante a elementos traza, a través de la medición de los niveles de estrés en las enzimas Catalasa (CAT) y Guayacol Peroxidasa (POD).

MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MUESTREOS Y ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS

7.1.1 SUELO

La mina de extracción “Natividad” se ubica en el municipio Natividad, distrito de Ixtlán, en la sierra norte del estado de Oaxaca a 0.14 kilómetros al Suroeste del centro de la población. Su localización es 17° 17’ 46” latitud norte y 96° 26’ 2.1” longitud oeste con una altitud de 1917 msnm (Figura 5). Los suelos circundantes al sitio cuentan con antecedentes de más de 100 años, sobre la presencia de elevadas concentraciones de minerales, razón por la cual la mina es atractiva para compañías mineras nacionales y extranjeras. Asimismo, INEGI (1980) reportó para el municipio de Natividad, distrito de Ixtlán, suelo del tipo Acrisol en un 98% además de Regosol y Rendzina en 1% para ambos. Asimismo otras referencias mencionan para dicho municipio un suelo del tipo Luvisol, aunque ambas unidades presentan la característica de facilidad para la erosión y son similares en cuanto a la cantidad de materia orgánica, valores aproximados en la capacidad de intercambio catiónico y proporción de arcilla (cuadro 6).

CUADRO 6 Algunas características fisicoquímicas de Acrisol y Luvisol encontradas en México. (Zuñiga *et al.*, 2000; Vivanco *et al.*, 2010)

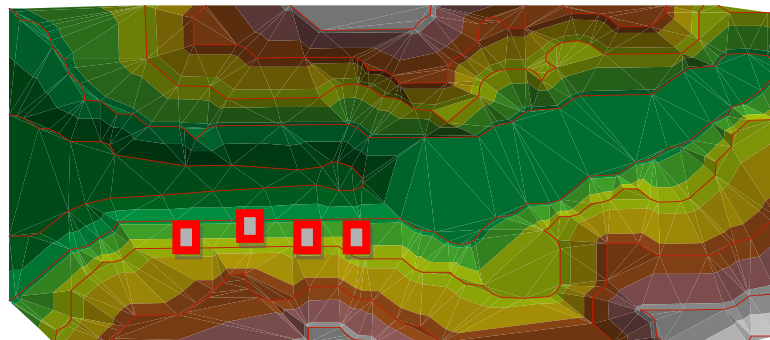
Parámetro	Acrisol	Luvisol
CIC	< 24 cmol kg ⁻¹	≥ 24 cmol kg ⁻¹
Materia orgánica	< 3 %	≤ 3%
% Arcilla	44 %	32 %
pH	< 5 ^a	≤ 5.1 ^b
Textura	Arcillosa	Franco arcillosa

^a fuertemente ácido y ^b moderadamente ácido de acuerdo a NOM-021-SEMARNAT-2000



FIGURA 5 Localización de la mina Natividad y anexas S.A DE C.V. y cabecera municipal de Natividad.

La zona de muestreo se seleccionó mediante muestreo aleatorio estratificado (MAS), se tuvieron 4 sitios de muestreo con características aparentemente homogéneas en cuanto a textura, color y pendiente. Utilizando como apoyo los sistemas de información geográfica (SIG). Estas áreas fueron de aproximadamente 100 m². Las figuras 6 a y b muestran la ubicación de las zonas de muestreo usando los valores vectoriales de la ortofoto E-1409 (INEGI, 1980) procesadas por el software Arcview 3.1.



a)

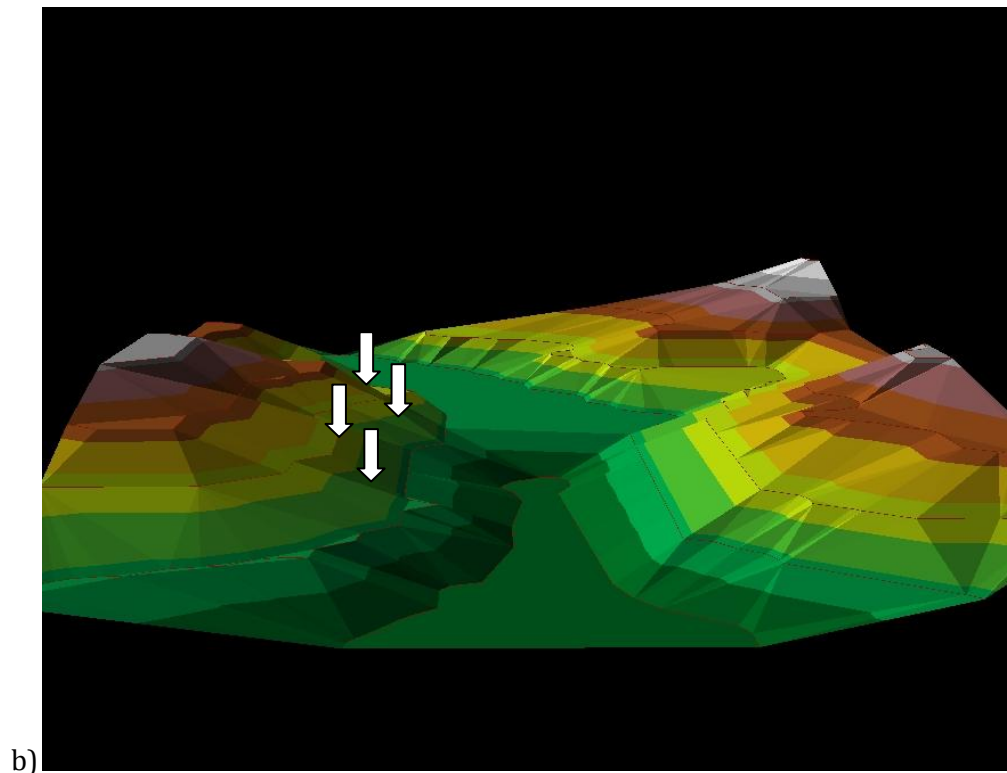


FIGURA 6 Ubicación aproximada de sitios de muestreo, se representan las alturas sobre el nivel del mar, de los 1500 msnm (verde) a 2050 msnm (blanco) en vista superior (a) y modelo extruido (b) (ERB. 2008).

De cada sitio de muestreo se definieron los sitios de colecta de muestra mediante el procedimiento de zig zag. Se tomaron muestras simples a una profundidad entre 0 - 30 cm, utilizando palas rectas en buen estado, y bolsas de polietileno con capacidad de 2 kilogramos (kg) para el transporte de la muestra. Una vez obtenidas las 20 muestras de 2 kg se preparó una muestra compuesta, mezclando todas las muestras sobre una cubierta plástica tomando 1.0 kg para acondicionarlo y proceder a su caracterización, el resto se utilizó para establecer el experimento.

Elaborada la muestra compuesta de suelo, se secó a temperatura ambiente y tamizó con malla de 2 mm para tener una muestra homogénea.

El suelo control fue tomado de la zona de invernadero de la Universidad del Mar campus Puerto Ángel.

7.1.2 PLANTA

Las plántulas y semillas germinadas de *Simarouba glauca* utilizadas para el experimento, se colectaron en el periodo posterior a la madurez del fruto, de la temporada 2008, durante los meses de mayo y junio. La colecta se realizó en las zonas de reserva de área verde de la Universidad del Mar, campus Puerto Ángel. Las plántulas seleccionadas se colocaron junto con las semillas germinadas en bandejas de plástico con una mezcla de suelo y hojarasca en relación 1:1, esperando un tiempo de crecimiento de 5 meses, y seleccionando las plantas de tamaño homogéneo (25 – 30 centímetros) para usarlas en el experimento.

7.1.3 BIOSOLIDO

Se colectaron los biosólidos digeridos aeróbicamente del filtro de bandas con un porcentaje de humedad de aproximadamente 75% de la planta de tratamiento de aguas residuales de FONATUR – Bahías de Huatulco. La muestra de 50 kg fue homogénea y se transportó en bolsas de polietileno al invernadero de la Universidad del Mar, campus Puerto Ángel para posterior uso.

Las muestras de biosólido colectadas para su aplicación en el experimento, tuvieron un proceso de estabilización aerobio a más de 40° C (composteo; relación 1:1 biosólido y hojarasca) durante 48 días, con la finalidad de reducir la masa de sólidos volátiles a una tasa menor al 40% y de esta manera controlar la atracción de vectores.

7.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

El experimento se realizó con un diseño experimental en bloques al azar de la siguiente manera (figura 7): se tuvieron 6 tratamientos diferentes con distinto número de unidades experimentales por tratamiento, realizados con el suelo proveniente de Natividad y el suelo control, los cuales se dividieron de la siguiente manera:

Grupo 1) *S. glauca* en suelo de Natividad,

Grupo 2) *S. glauca* en suelo de Natividad mas enmienda,

Grupo 3) suelo de Natividad mas enmienda,

Grupo 4) *S. glauca* en suelo control (mismo suelo de germinación y crecimiento).

El arreglo de los tratamientos fue de la forma siguiente, los grupos 1, 2 y 4 estuvieron compuestos por 6 unidades experimentales (macetas) mientras que el grupo 3 se compone de 3 unidades experimentales. Todas las unidades experimentales fueron de una capacidad de 1.2 kg cada una.


	Grupo	Tratamiento	Suelo	Adición de enmienda	N° de macetas	N° de plantas
	1	1	Natividad	0	6	6
	2	2	Natividad	5%	6	6
		3		10%	6	6
		4		15%	6	6
	3	5	Natividad	5% A	1	0
				10% B	1	0
				15% C	1	0
	4	Control	Puerto Ángel	0	6	6

FIGURA 7 Esquema general del diseño experimental.

En el tratamiento 1 se trasplantaron 6 plantas de *S. glauca* en suelo de Natividad. En el grupo 2 las plantas de *S. glauca* se trasplantaron en macetas con: Tratamiento 2, 5% (60 g) de compost de biosólido y 1,140 g de suelo de Natividad; tratamiento 3, 10% (120 g) de compost de biosólido y 1,080 g de suelo de Natividad y tratamiento

4 con 15% (180 g) de compost de biosólido y 1020 g de suelo de Natividad. El grupo 3 estuvo compuesto de macetas con 5% (60 g), 10%(120 g) y 15% (180 g) de compost de biosólido, completando la capacidad de las unidades experimentales con suelo de Natividad. Para el grupo 4, que corresponde al control se llenaron 6 macetas con suelo de puerto Ángel y fueron trasplantadas 6 plantas de *S. glauca*.

El experimento se realizó por un periodo de 3 meses, tomando muestras por duplicado al inicio del experimento (tiempo 0), y posteriormente cada 30 días.

En los suelos de Natividad y el control se analizaron metales biodisponibles, metales pseudo-totales, porcentaje de carbono orgánico (%CO), porcentaje de materia orgánica (%MO), nitrógeno total (N_{total}), capacidad de intercambio cationico (CIC) y actividad de β -glucosidasa al inicio y final del experimento; la clase textural y densidad aparente fueron cuantificados al inicio del experimento; los valores de pH y conductividad eléctrica fueron medidos al inicio y los días 30, 60 y 90 del experimento. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

Para el caso de las plantas de *S. glauca* se determinó la concentración de elementos traza, en hojas, tallos y raíces con la finalidad de observar el sitio blanco de los metales en la planta al inicio y final del experimento. La actividad de las enzimas Catalasa (CAT), y guaiacol peroxidasa (POD), la extracción de proteína soluble en hojas y raíces, niveles de clorofila, peso fresco y seco, altura de planta y longitud de raíces de *S. glauca* fueron medidos a los días 30, 60 y 90 del experimento como medidas indirectas de los daños producidos por metales en plantas. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

7.3 DETERMINACIONES EN SUELO.

7.3.1 pH

Se determinó el pH de acuerdo al método electrométrico AS-02 de la NOM-021-SEMARNAT-2000 en una solución de agua destilada con una relación suelo - agua 1:2.5. Primero se pesaron 5 gramos (g) del suelo homogenizado, y se solubilizaron en 15 mililitros (ml) de agua destilada. Se agitaron con agitador magnético por aproximadamente 10 minutos (min) y se dejaron reposar durante 15 min, a manera de estabilizar la suspensión. Pasado este tiempo se decantó la solución y se hizo la medición con el potenciómetro OAKTON pH/mv/°C meter, tomando la lectura directa.

7.3.2 CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA.

Se determinó la conductividad eléctrica de acuerdo al método con conductímetro AS-18 de la NOM-021-SEMARNAT-2000, en el fondo de un embudo Buchner se colocó papel filtro Whatman # 42 y se preparó un sistema para generación de vacío, después se preparó una pasta con 5 g de la muestra de suelo saturado y se colocó en el fondo del embudo para realizar la extracción de la solución. Con la solución obtenida en vaso de precipitados se realizó la medición directa con conductímetro OAKTON CON110.

7.3.3 DENSIDAD REAL.

La densidad real del suelo se calculó con el método AS-4 con picnómetro de la NOM-021-SEMARNAT-2000, primero se tomó el peso del picnómetro limpio y perfectamente seco, para después colocar en el interior del picnómetro suelo hasta el nivel de llenado y se tomó nuevamente su peso. Después se retiró el suelo del

picnómetro y se le adicionó agua destilada hervida y fría hasta el nivel de llenado, tomando nuevamente su peso. Se usó la ecuación (1) para determinar la densidad.

$$\rho_{real} = \frac{P_m - P_p}{P_{agua}} \quad (1)$$

Donde:

P_m = peso del picnómetro mas la muestra,

P_p = peso del picnómetro

P_{agua} = peso del picnómetro más agua.

7.3.4 CAPACIDAD DE RETENCION DE AGUA (CRA) Y PORCENTAJE DE HUMEDAD

Para determinar la capacidad de retención de agua (CRA) del suelo se utilizó el método de Black, (1965). Se colocaron 20 g de suelo en papel filtro añadiendo 40 ml de agua destilada, filtrando por veinticuatro horas y cubriendo el embudo contenedor de las muestras para evitar las perdidas por evaporación. Pasadas las 24 horas se tomaron los datos usados en la ecuación (2).

$$CRA = \left[\left(E + \frac{(A \times D) / 100}{\text{peso de muestra}(g)} \right) \left(1 - \frac{D}{100} \right) \right] [100] \quad (2)$$

$$E = C - B - A$$

Donde:

C = peso de la muestra húmeda,

B = peso del blanco (papel húmedo),

A = peso de la muestra,

E = peso del agua contenida en la muestra.

El porcentaje de humedad por gravimetría se realizó a través del método AS-05 (SEMARNAT, 2000), primero se pesaron 20 g de suelo, los cuales se secaron en capsulas de vidrio a 95° C por veinticuatro horas en una mufla FELISA para después utilizar la ecuación (3).

$$D(\% \text{ de humedad}) = \left(\frac{\text{peso del suelo húmedo} - \text{peso del suelo seco}}{\text{peso del suelo húmedo}} \right) 100 \quad (3)$$

7.3.5 CLASE TEXTURAL

La textura del suelo se obtuvo por el método del hidrómetro de Bouyoucos (SEMARNAT, 2000) se colocó en un vaso metálico una muestra de 50 g de suelo a la cual se le agregó 15 ml de solución dispersante de hexametáfosfato de sodio $[\text{NaPO}_3]_6$ 1.0 N, se mezcló con un agitador de motor Hamilton-Beach drink master, para después transferir las muestras a una probeta de 1L la cual se aforó con agua destilada, y posteriormente se agitó por un minuto para medir la densidad usando un hidrómetro de Bouyoucos a los 40 segundos (s) y 2 horas (h) después de la agitación. Los valores obtenidos se sustituyeron en las ecuaciones 4, 5 y 6 para obtener los porcentajes de arcilla, limo y arena:

$$\% \text{ de limo} + \% \text{ de arcilla} = \left(\frac{L1 + (T1 - 20) \times 0.36}{\text{peso muestra}(g)} \right) 100 \quad (4)$$

$$\% \text{ de arcilla} = \left(\frac{L2 + (T2 - 20) \times 0.36}{\text{peso muestra}(g)} \right) 100 \quad (5)$$

$$\% \text{ de arena} = 100 - (\% \text{ de limo} + \% \text{ de arcilla}) \quad (6)$$

Donde:

L1= primera lectura con el hidrómetro,

L2 = segunda lectura con el hidrómetro,

T1= temperatura 1, T2= temperatura 2

0.36 = factor de ajuste de la temperatura.

7.3.6 CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO (CIC)

Para la determinación de la capacidad de intercambio cationico se utilizó el método del acetato de Bario ($C_4H_6BaO_4$) (APHA, 1989). Se tomaron 2 g de suelo homogenizado, y se colocaron en tubos para centrifuga de 50 ml cada uno, a los cuales se les añadió 25 ml de solución de $C_4H_6BaO_4$ y se centrifugaron por 5 min a 3000 revoluciones por minuto (rpm) en centrifuga Hettich mikro 22R. Posteriormente se tomó todo el sobrenadante y a la pasta del tubo se le añadió una solución de 25 ml de sulfato de magnesio ($MgSO_4$) 0.1 N, agitándolo por un minuto; para después nuevamente centrifugarlo durante 5 min a 3000 rpm, se tomaron 10 ml del sobrenadante y vertieron en un matraz erlenmeyer de 250 ml para diluirlo con 100 ml de agua destilada. Para el blanco se tomaron 10 ml de la solución de $MgSO_4$ diluyendo a 100 ml con agua destilada en un matraz erlenmeyer de 250 ml. A cada uno de los matraces anteriores se les añadió 10 ml de la solución tampón de hidróxido de sodio (NaOH) 1 N y 6 gotas del indicador negro de ericromo, valorando el Mg hasta la aparición de un color azul, con la solución acomplejante 0.05 N de acido etilendiaminotetracético (EDTA). Se utilizó la ecuación 7 para los cálculos correspondientes.

$$CIC = \frac{(M - N)0.05 \times 2.5 \times 100}{P} \quad (7)$$

Donde:

M = ml de la solución gastados para valorar el blanco,

N = ml de la solución gastados para valorar la muestra,

P = peso en g de la muestra,

2.5 = factor de disolución, 0.05 = concentración de la solución acomplejante,

CIC se expresa en meq/100 g.

7.3.7 NITROGENO TOTAL, CARBONO ORGÁNICO Y MATERIA ORGÁNICA.

Los parámetros nutricionales tales como el nitrógeno y carbono orgánico fueron analizados de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT-2000. El Nitrógeno total se determinó por el método Kjeldahl, que consistió en 2 fases: una digestión y una destilación, las dos fases convierten todas las formas de nitrógeno con excepción de nitritos y nitratos en amonio. Para la digestión, se colocaron en tubos de destilación Kjeldahl 0.5 g de suelo, 5 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4), 2 g de sulfuro de potasio (K_2SO_4) y una muy pequeña porción de óxido de mercurio (HgO) como catalizador, los tubos con la mezcla se colocaron en un digestor BÜCHI-K-435 por 3 horas, hasta que la muestra estuvo totalmente digerida y obtuvo un color claro (blanco). Una vez completada la primera parte, se dejaron enfriar los tubos y se les adicionó suficiente agua destilada para colocar en suspensión el digestado. La destilación se llevó a cabo, adicionándole a los tubos con la muestra digerida y en suspensión, 30 ml de NaOH al 32% y colocándolos en el destilador BÜCHI-K-314. En el tubo de salida del destilado se colocó un matraz erlenmeyer con 50 ml de ácido bórico (H_3BO_3) más el indicador verde de bromocresol y rojo de metilo, y se destiló hasta alcanzar un volumen de 150 ml. Para determinar el Nitrógeno total presente en el destilado, se tituló con H_2SO_4 0.5 N, hasta notar el cambio de color de la muestra, de verde a rosado intenso en el punto final de la titulación. También se prepararon los blancos siguiendo exactamente el mismo procedimiento que en las muestras. Los cálculos se realizaron con la ecuación 8:

$$\% N_{total} = \left(\frac{(Vm - Vb) * N * 1.4}{P} \right) \quad (8)$$

Donde

Vm = volumen de H_2SO_4 empleado en titular la muestra,

Vb = volumen de H_2SO_4 empleado en titular el blanco,

N = normalidad exacta del H_2SO_4 ,

P = peso de la muestra de suelo en gramos.

El carbono orgánico se estimó por el método AS - 07 de Walkley y Black, (1934). Se pesaron 0.5 g de suelo seco y tamizado, colocándolos en un matraz erlenmeyer de 500 ml, procesando un blanco de reactivos por triplicado. Se le adicionaron 10 ml de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) 1.0 N, agitando perfectamente de manera manual, para que el suelo entrara en contacto con la solución, después se añadieron 20 ml de H_2SO_4 concentrado agitando por 1 minuto más. Las muestras se dejaron reposar durante 30 min para que ocurriera una oxidación del carbono orgánico más completa. Pasando este tiempo se le adicionaron 200 ml de agua destilada, 5 ml de ácido fosfórico (H_3PO_4) y 10 gotas del indicador de difenilamina. La disolución obtenida se tituló gota a gota con sulfato ferroso ($FeSO_4$) 1.0 M hasta vire de verde claro. Los cálculos de porcentaje de materia orgánica (% MO) y porcentaje de carbono orgánico (% CO) se realizaron con las ecuaciones 9 y 10.

$$\%C_{orgánico} = \left(\frac{B - T}{g}\right) (N)(0.39)(1.298) \quad (9)$$

$$\%MO = \%C_{orgánico}(1.724) \quad (10)$$

Donde:

B = volumen de $FeSO_4$ gastado para valorar el blanco

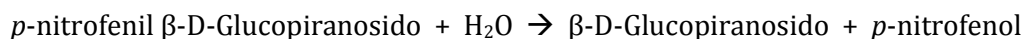
T = volumen de $FeSO_4$ gastado para valorar la muestra

N= normalidad exacta del $FeSO_4$.

g = peso de la muestra empleada, factor de corrección de humedad=1.298

7.3.8 ACTIVIDAD β -GLUCOSIDASA (EC 3.2.1.21)

La actividad de β -glucosidasa (EC 3.2.1.21) relacionada con el ciclo del carbono se determinó mediante el método de Tabatabai (1982) adaptado por el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, el cual se basa en la determinación colorimétrica del *p*-nitrofenol obtenido por la acción de β -glucosidasa después de incubar el suelo. Efectuándose la siguiente reacción enzimática.



Primero, se preparó la curva de calibración del producto (0, 10, 20, 30, 40 y 50) en μg mediante una disolución madre de *p*-nitrofenol (PNF) de $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$. En las muestras se incubó 1 g de suelo con el sustrato, para dar lugar a la reacción enzimática y en los patrones se incubó el suelo sin sustrato pero con las cantidades crecientes en μg de PNF. Las muestras se prepararon con 1 g de muestra de suelo y se añadieron 4 ml del tampón universal modificado MUB-HCl pH 6 y 1 ml de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (PNG) 25 mM, dejando incubar por 1 hora a 37°C . Una vez pasada la hora, las muestras se refrigeraron a 10° por 10 min, para después añadir 1 ml de cloruro de calcio CaCl_2 0.5 M y 4 ml de tampón Tris buffer (THAM-NaOH) a pH 12. Finalmente se agitaron las muestras por 10 min en agitador Eberbach, se centrifugaron en centrifuga Hettich mikro 22R y filtraron en Whatman #2. La absorbancia de los filtrados se midió en un espectrofotómetro UV/Vis Beckman DU a 400 nm.

Con las lecturas de absorbancia provenientes de los 6 patrones se calculó la ecuación de la recta en la curva de calibración, con dicha recta se obtuvo el valor de PNF en μg en el extracto. La actividad neta se calculó con la ecuación 11.

$$AE = \frac{C \times V}{P_m \times G \times T} \quad (11)$$

Donde

AE = actividad de β -glucosidasa en μ moles de PNF liberado por g de suelo seco.

C = concentración de PNF en el extracto,

V = factor de dilución,

Pm = peso molecular del PNF,

G = factor referente al peso de suelo seco utilizado en el ensayo

T = factor relativo al tiempo de incubación, de 1 hora para el presente análisis.

7.3.9 CUANTIFICACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA BIODISPONIBLES.

A la muestra homogenizada se le realizó una prueba para determinar los elementos traza solubles ó más biodisponibles con el método del cloruro de calcio (CaCl_2). Diversos estudios han demostrado que la fracción de elementos traza extraíbles con CaCl_2 es la que más afecta a la funcionalidad y diversidad de los microorganismos del suelo y plantas (Madejón *et al.*, 2009). El procedimiento consistió en formar una mezcla relación 1:3 de suelo y CaCl_2 0.01 M con 3 g de suelo, sometiéndolo a agitación por 3 h en agitador Eberbach y posteriormente centrifugación a 10,000 rpm por 10 min en centrifuga Hettich mikro 22R, una vez realizado el anterior procedimiento se filtra la muestra en Whatman #1 y el extracto obtenido es cuantificado por espectrómetro de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) Perkin-Elmer optimus 7000 por el método 6010B de EPA.

7.3.10 CUANTIFICACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA PSEUDO-TOTALES

Para extraer los elementos traza pseudo-totales de la muestra de suelo se utilizó el método 3050B digestión acida del suelo, de la agencia de protección ambiental de estados unidos (EPA).

Del suelo previamente homogenizado, se tomó una muestra de 0.250 g base seca y se colocó en un matraz erlenmeyer de 25 ml, al cual se le añadió 10 ml de ácido nítrico (HNO_3) 1:1 y se agitó; posteriormente se cubrió con un dispositivo para recuperación de vapores y se calentó la muestra sin llegar a ebullición por alrededor de 10 o 15 min, después se dejó enfriar la muestra y se le añadieron 5 ml de HNO_3 concentrado y con el matraz cubierto se calentó con reflujo por 30 min, este último procedimiento se repitió hasta que la muestra dejó de emitir vapores de color café, lo cual indicaba la oxidación completa. Una vez completada esta primera parte y con la muestra ya fría, se añadieron 2 ml de agua destilada y 3 ml de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30%, se colocó la cubierta al matraz nuevamente y se calentó para iniciar la reacción cuidando no existieran proyecciones por la efervescencia de la misma. Se continuó añadiendo alícuotas de 1 ml de H_2O_2 al 30% hasta que la muestra ya no presento cambios significativos de color.

La muestra acida obtenida continuó calentándose hasta reducir su volumen hasta aproximadamente 5 ml, se dejó enfriar y diluyó con agua destilada a un volumen de 100 ml. Después de la dilución la muestra se filtró en Wathman # 41 y centrifugó por 10 min a 2500 rpm en centrifuga Hettich mikro 22R, se volvió a filtrar y se colocó en viales para su posterior lectura. A la par de la digestión de muestras se elaboraron blancos con el mismo procedimiento, sin la adición de muestra.

Después de obtener el extracto ácido de suelo se realizó la cuantificación de los elementos traza pseudo-totales en el suelo tanto en el tiempo cero, como al final del experimento mediante un espectrómetro de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) Perkin-Elmer-optimus 7000 por el método 6010B de EPA .

La cuantificación a través del método 6010B se inició posterior a la estabilización y calibración con estándares del equipo ICP-OES. Una vez realizado lo anterior se limpiaron las mangueras de toma de muestra mediante un enjuague con la solución blanco por aproximadamente 30 s, después se colocó la manguera del equipo en el vial que contenía la muestra y se tomó la lectura. Cada 10 muestras se verificó la

sensibilidad del equipo tomando lecturas de los controles elaborados con estándares para Ni, Zn, Pb, Cu, Cd y As.

El reporte de resultados para metales totales está con base al peso seco mediante la ecuación 12.

$$\text{Concentración en Peso seco } \left(\frac{mg}{Kg} \right) = \frac{C \times V}{W \times S} \quad (12)$$

Donde:

C = la concentración de la muestra digerida (mg L⁻¹)

V= volumen final de la muestra en litros después de la preparación de la muestra

W= Peso en kilogramos de la muestra húmeda

S = % sólidos / 100

Siguiendo la citada metodología se realizó una primera determinación diagnóstica para encontrar los elementos traza que presentan mayores concentraciones así como problemas de toxicidad en el suelo donde se realizó este trabajo.

7.4 DETERMINACIONES EN PLANTA.

Las plantas de *S. glauca* tuvieron un monitoreo de sus niveles de clorofila a, b y total, actividad de las enzimas guayacol peroxidasa (POD), catalasa (CAT), tamaño del tallo y raíz, peso fresco y seco. Así como también extracción de proteína soluble y cuantificación para inicio del experimento (no se reportan resultados).

7.4.1 CLOROFILA A, B Y TOTAL

Se extrajo y cuantificó clorofila mediante el método de Arnon (1949). Para dicha prueba se tomaron plantas de *S. glauca* con 5 meses de crecimiento a condiciones controladas, correspondientes al tiempo cero así como para los demás tiempos del experimento. Se realizó una mezcla homogénea de las hojas de las plantas identificando los estratos alto, medio y bajo.

Se colocó 1 g de hoja en un mortero previamente enfriado y se le adicionó 5 mL de una solución fría (10° C) de acetona (C₃H₆O) al 80% y se maceró hasta obtener una pasta homogénea.

Después la mezcla se centrifugó por 30 minutos a 6000 rpm en centrifuga Hettich Mikro22R, se extrajo el sobrenadante de los tubos y se tomaron las lecturas a 645 y 663 nm en el espectrofotómetro Beckman DU530.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia se utilizaron las ecuaciones 13, 14 y 15 para obtener la concentración de clorofila a, b y total (C_a, C_b, C_t) de las hojas en g L⁻¹.

$$C_a = 0.0127D_{663} - 0.00269D_{645} \quad (13)$$

$$C_b = 0.0229D_{645} - 0.00468D_{663} \quad (14)$$

$$C_t = C_a + C_b \quad (15)$$

Donde D₆₄₅ y D₆₆₃ representaron los valores de absorbancia a 645 y 663 nm de longitud de onda.

7.4.2 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE

Para la extracción y cuantificación de proteína soluble en plantas se utilizó el método de Lowry y col. (1951). La extracción se realizó a 1 g de hojas y 1 g de raíces de *S. glauca*, poniéndolas por separado en morteros previamente enfriados. Una vez colocadas las muestras en los morteros se les adicionó 10 ml de la mezcla extractora (2% PVP, 1mM EDTA, 50mM de Buffer de fosfatos pH 7, 1mM de ácido ascórbico, 0.05% tritón) hasta obtener una pasta homogénea que posteriormente se centrifugó a 6000 rpm por 30 min en centrifuga Hettich Mikro22R, todo realizado bajo condiciones frías (10°) para prevenir la desnaturalización de las proteínas.

Posterior a la centrifugación se tomó 0.5 ml de sobrenadante pasándolo a viales de 25 ml. El mismo día de la cuantificación de proteínas se preparó el reactivo de Lowry con las soluciones A (NaOH, Na₂CO₃), B (CuSO₄.5H₂O), C (C₄H₄Na₂O₆ .2H₂O), mezcladas en la proporción 100:1:1 respectivamente. Se tomaron los viales con las

muestras y se les adicionó 0.7 ml de la solución de Lowry mezclando en vortex, posteriormente se incubaron por 20 min a temperatura ambiente. A la par de esto se preparó un estándar de seroalbumina de bovino (BSA) el cual fue sujeto al mismo tratamiento. En los 5 minutos finales a la incubación se preparó el reactivo de Folin (5 ml del reactivo de Folin Ciocalteu 2.0 N + 5 ml de H₂O ultra pura) y se adicionaron 0.1 ml a las muestras y blancos incubados, para posteriormente agitar en vortex e incubando por otros 30 min en obscuridad a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se agitaron de nueva cuenta en vortex. Se tomaron las lecturas de las muestras en el espectrofotómetro Beckman DU530 a 750 nm.

7.4.4 ACTIVIDAD DE CATALASA (CAT) EC 1.11.1.6

El ensayo de actividad de la enzima CAT (EC 1.11.1.6) se realizó mediante el método de Kalir *et al.*, (1984) y Badiani *et al.*, (1990).

La muestra previamente obtenida en la extracción de proteína se filtró con 4 capas de gasa y posterior a esto se centrifugó a 11500 rpm por 20 min en centrifuga Hettich Mikro22R, para posterior uso del sobrenadante. Se colocó en un tubo de ensayo los reactivos en el siguiente orden: 0.75 ml de buffer fosfato sódico 25 mM (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) pH = 7 más 0.75 ml de EDTA-Na 0.8 mM con 1 ml de H₂O₂ mM y los 0.5 ml del extracto enzimático obtenido del sobrenadante. Después de adicionar los reactivos se agitaron los tubos en vortex, y se procedió con las lecturas a 240 nm en el espectrofotómetro Beckman DU530, siguiendo la disminución del sustrato (H₂O₂) a través de la absorbancia en intervalos de 20 segundos durante 3 minutos. La actividad de CAT se expresó como $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ reducidos x mg prot}^{-1} \text{ x min}^{-1}$.

7.4.5 ACTIVIDAD DE GUAYACOL PEROXIDASA (POD) EC 1.11.1.7

La actividad de POD en los extractos enzimáticos de hoja y raíz, se evaluó mediante el método de Shah *et al.*, (2001).

Se preparó una mezcla de reacción con 1200 μL de buffer 40mM de NaH₂PO₄ pH 6.1, 1350 μL de guayacol mM, 400 μL H₂O₂ 2mM y 50 μL de extracto enzimático obtenido

en la extracción de la proteína soluble total y posteriormente se midió el incremento en absorbancia a una longitud de onda de 420 nm durante un tiempo de 2 minutos en intervalos de 30 segundos en un espectrofotómetro UV visible Beckman DU530. Se cuantificó la cantidad de H₂O₂ reducido con un coeficiente de extinción de 26.6 mM⁻¹cm⁻¹.

7.4.6 PRODUCCIÓN DE BIOMASA

Durante el desarrollo del experimento, las plantas se midieron en su longitud de raíz, así como altura promedio del tallo al momento de ser plantadas para el experimento (t=0), al igual que al momento que fueron extraídas y separadas en hojas, tallo y raíz para realizar las cuantificaciones al día 30 (t=2), 60 (t=3) y 90 (t=4) del experimento. Adicionalmente se obtuvo el peso en fresco y seco de la biomasa.

7.4.7 CUANTIFICACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA

Se realizó la extracción de elementos traza en la raíz, tallo y hoja de *S. glauca*, a través del método 3050B de EPA al igual que en las muestras de suelo, utilizando 0.250mg de raíz, tallo y hoja de manera separada, usando de referencia los que se encontraron en mayor medida en el suelo.

Una vez obtenido el extracto ácido de planta se realizó la cuantificación de los elementos traza tanto en el tiempo cero, como al final del experimento mediante espectrómetro de emisión óptico con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) Perkin-Elmer optimus 7000 por el método 6010B de EPA. Usando como referencia de cuantificación los elementos traza encontrados en mayor medida en el suelo de Natividad (As, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn). Con los datos obtenidos de concentración de elementos traza en suelo y planta (raíz, tallo y hoja) se hizo el cálculo del factor de translocación (TF) con la ecuación 16 propuesta por Baker y Brook (1989)

$$TF = C_s / C_r \quad (16)$$

Donde:

C_s = Concentración en brotes

C_r = Concentración en raíz

Los valores de $TF > 1$ indican que la planta transloca metales de manera efectiva de la raíz a las partes aéreas de la planta. También con los datos de concentración de metales, se calculó el factor de bioacumulación (BAF) con la ecuación 17:

$$BAF = C_p / C_s \quad (17)$$

Donde:

C_p = Concentración en parte aérea de planta

C_s = Concentración en suelo

Los valores obtenidos se categorizan como hiperacumulador, acumulador y exclusor a las muestras que acumulen $> 10\mu\text{g g}^{-1}$, > 1 y < 1 respectivamente, según el método de Ma *et. al.*, 2001.

7.5 DETERMINACIONES EN BIOSÓLIDO

Con el fin de verificar que el biosólido utilizado en el compost es apropiado para su aplicación, se tomaron datos generados en el proyecto “evaluación de suelos salinos-sódicos mediante bioensayos y aplicación de mejoradores para la producción agrícola” (Pérez-Buceta, 2012) para los siguientes parámetros: metales pesados (Cd, Cr y Pb), coliformes fecales y huevos de helmintos, los cuales se realizaron mediante los procedimientos propuestos por la NOM-004-SEMARNAT-2002 y la normatividad de la agencia de protección ambiental de Estados Unidos (US-EPA). Asimismo se realizó la determinación de CIC, pH y conductividad a través de la metodología propuesta por la NOM-021-SEMARNAT -2000 y APHA 1989 las cuales fueron descritas en la sección de determinaciones en suelo.

7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se determinaron las medias y desviaciones estándar de todos los datos, realizando análisis de correlaciones para determinar posibles relaciones entre los valores de los distintos parámetros analizados en suelo y plantas, utilizando niveles de significación ($p < 0.05$) basados en el coeficiente de Person. Con el fin de establecer si existen diferencias significativas entre los tratamientos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a los datos que cumplan con los supuestos del modelo para realizar análisis post hoc, mediante el test de Tukey. Los datos que no cumplieron con los supuestos del modelo, fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis. Todos los análisis se hicieron utilizando el paquete estadístico SPSS 17.0

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 SUELO

8.1.1 FISICOQUÍMICOS

Para la adecuada utilización del biosólido como enmienda biológica se deben tener en cuenta el cumplimiento a las especificaciones y límites máximos permisibles contemplados en la NOM-004-SEMARNAT-2002; los biosólidos usados no mostraron restricciones para uso en suelos agrícolas (cuadro 7).

CUADRO 7 Características fisicoquímicas del compost de biosólido y suelo de Natividad, Oaxaca antes de la aplicación de la enmienda.

VARIABLE	Natividad	Compost Biosólidos
Carbono orgánico %	3.82	13.7 *
Materia orgánica %	6.6	23.6 *
Nitrógeno total %	0.1	0.43 *
pH	6.87	5.6
Conductividad (dS m ⁻¹)	0.008	0.012
CIC (meq 100 g ⁻¹)	2.51	S.D.
% Limo	17.8	Orgánico
% Arena	69.5	Orgánico
% Arcillas	12.6	Orgánico
Clase textural	Franco arenoso	Orgánico
Coliformes fecales (NMP CF/g)	S.D.	0.93 *
Huevos de helminto	S.D.	0 *
Cd, Cr y Pb	a	< valores cuadro III *
Densidad real (g cm ⁻³)	1.38	S.D.
Capacidad retención de agua	44.7	S.D.

a Los valores de metales se tratan en la sección de elementos traza, * Valores de Pérez-Buceta, 2012,

S.D. sin determinar.

Las características fisicoquímicas y bioquímicas del suelo, se presentan en el cuadro 7 y figuras 8 y 9. Mientras que el efecto de la adición de compost de biosólidos en los mismos parámetros del suelo se presentan en cuadros 8 y 9, además de las figuras 8 y 9, los cuales se describen a continuación.

El porcentaje de Materia Orgánica (% MO) presentó una disminución con respecto al valor inicial (3.8 % MO) en los tratamientos 1 (sin adición de enmienda), 2 y 3 (con enmienda 5% y 10% respectivamente y planta) y 5 (con enmienda en 5 y 10% , sin planta) a valores hasta un 75% menor (tratamiento 1) sin mostrar diferencias significativas, excepto en el tratamiento 4 (15% enmienda y *Simarouba glauca*) y tratamiento 5 (15% de enmienda sin *Simarouba glauca*) en la cual se incrementó 12 y 15% el valor inicial respectivamente (Cuadro 8).

Los valores correspondientes al porcentaje de Carbono Orgánico (% CO) tuvieron comportamientos relacionados al % MO, con una correlación de 0.98 ($p < 0.05$) respecto a % MO; derivada de la suposición de que la MO contiene un 58% de Carbono que se representa en el valor 1.724 de la ecuación 10.

Las disminuciones en CO y MO se pueden atribuir principalmente a procesos de mineralización ó a procesos de lixiviación, considerando que la estructura inicial del suelo presenta porosidad a simple vista y que las disminuciones son contrarias al efecto relatado por Kim y Owens, (2010), y Guacaneme y Barrera-Cataño, (2007), donde los incrementos de CO y MO son proporcionales a la adición de biosólidos además del incremento en las propiedades de retención de humedad y estructura del suelo. Cabe destacar que Kim y Owens, (2010) hicieron aplicaciones continuas, en tanto que en el citado experimento y Guacaneme y Barrera-Cataño, (2007) realizaron la aplicación de biosólido estabilizado sin compostear a diferencia del presente trabajo. El caso de los incrementos en T4 y T5 C puede atribuirse a la presencia de una mayor cantidad de compost (15%); el menor incremento en T4 se puede atribuir a procesos de transformación y asimilación de la planta y microorganismos de la rizosfera, considerando la ganancia de biomasa que presentó *Simarouba glauca* en el experimento. Con el valor de T5 C como mayor incremento con respecto a los demás tratamientos, se confirma el aporte de carbono y nitrógeno

de la enmienda susceptible de mineralización, evidenciándose a través de la disminución de las cantidades iniciales y el consecuente crecimiento de *S. glauca* en los demás tratamientos (cuadro 8). Por lo tanto resultará viable determinar la dosis adecuada de compost de biosólido a través del seguimiento a los consumos y pérdidas de carbono y nitrógeno en el suelo considerando que la presencia de vegetación incrementa la actividad rizosférica de microorganismos, así como aumento en la aireación, degradación y mineralización.

CUADRO 8 CIC, %N total, %CO y %MO en suelos de los distintos tratamientos después de 90 días. Los valores representan la media de tres replicados \pm desviación estándar.

		Variables			
		CIC (meq/100 g)	% N total	% C org.	% Materia org.
Tratamientos	1	22.7 \pm 1.25	0.02 \pm 0.05	2.3 \pm 0.0	4.0 \pm 0.04
	2	21.4 \pm 1.08	0.02 \pm 0.0	2.8 \pm 0.01	4.8 \pm 0.06
	3	19.7 \pm 1.80	0.02 \pm 0.0	3.0 \pm 0.01	5.2 \pm 0.07
	4	17.6 \pm 1.87	0.03 \pm 0.0	4.2 \pm 0.01	7.3 \pm 0.0
	5A	15.1 \pm 1.25	0.04 \pm 0.01	2.5 \pm 0.0	4.4 \pm 0.0
	5B	17.1 \pm 1.25	0.04 \pm 0.01	3.8 \pm 0.01	6.5 \pm 0.0
	5C	11.1 \pm 2.3	0.08 \pm 0.0	4.4 \pm 0.01	7.6 \pm 0.0
	Control	18 \pm 0.0	0.004 \pm 0.0	2.7 \pm 0.01	4.6 \pm 0.0

En la figura 8 se presentan los valores de pH, los cuales no muestra diferencias significativas a los 90 días en los tratamientos 1, 2 y 3 con un pH cercano a la neutralidad (6.6–7.3). Sin embargo los tratamientos 2 y 3 con presencia de *Simarouba glauca* y adición de compost, mostraron el comportamiento más dinámico iniciando en valores moderadamente ácidos (5.3 y 5.5) y llegar a los valores neutros mencionados. Tanto los tratamientos control, 4 y 5 si mostraron diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos con presencia de planta, teniendo valores finales en el rango de moderadamente ácidos (5.1-6.5). Comparativamente los tratamientos con enmienda y el control también presentaron diferencias, mientras que el control oscilo entre 6.8 y 6.41 (valor inicial y final respectivamente), los tratamientos 4 y 5 concluyeron con incrementos de hasta el 25% para el tratamiento 4 (figura 8). De acuerdo a los resultados obtenidos en pH se puede confirmar lo mencionado en la literatura referente a la acción del compost de

biosólido como un elemento de ayuda en el incremento de pH, debido al aporte de carbonatos contenidos en los biosólidos; además de a) adsorción de los iones Al^{3+} , b) formando complejos solubles con los iones Al^{3+} , y c) reemplazando los iones H^+ y Al^{3+} de la solución del suelo por iones Ca^{2+} (Brady y Weil, 2002). Asimismo todos los tratamientos con compost y planta tuvieron incrementos en el pH dentro del rango de neutro (NOM-021-SEMARNAT-2000), y moderadamente ácidos para tratamientos sin planta, esto probablemente por la pérdida del efecto estabilizador de los carbonatos debido al agotamiento la lixiviación (Guacaneme y Barrera-Cataño, 2007). Asimismo los incrementos presentados en tratamientos con planta podría relacionarse con la capacidad de las raíces para modificar el pH rizosférico por la segregación de iones H^+ debido a la absorción de cationes provenientes de procesos de mineralización del carbono orgánico que no se pudieron determinar.

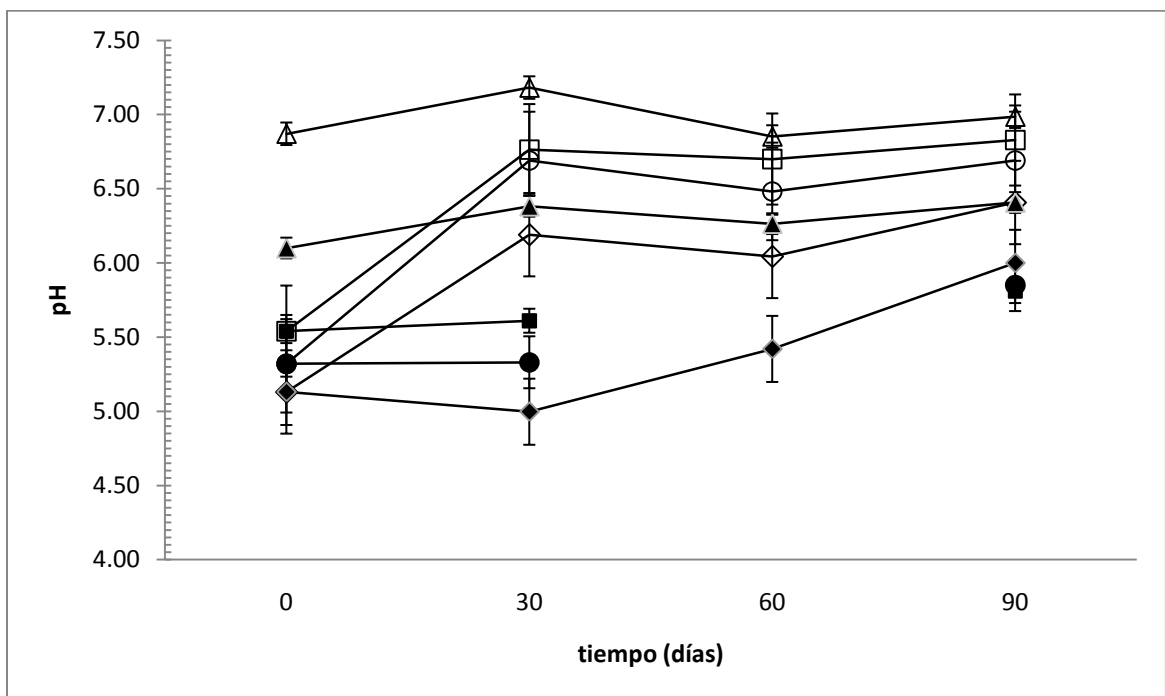


FIGURA 8 Efecto de la adición de enmienda en el pH del experimento en T1 (Δ), T2 (\square), T3 (\circ), T4 (\diamond), T5 A (\blacksquare), B (\bullet), C (\blacklozenge) y Control (\blacktriangle). Los valores representan la media basada en tres replicas y las barras indican las desviaciones estándar.

Con respecto a la capacidad de intercambio catiónico (CIC) del suelo, está registró un aumento significativo en todos los tratamientos (hasta 9 veces el valor inicial) (cuadro 8). Estos incrementos no mostraron mayores diferencias entre los tratamientos con uso de solo enmienda (T5 5%, 10% y 15%), enmienda con presencia de *Simarouba glauca* (T2, T3 y T4) y con uso solo de *Simarouba glauca* (T1). Con lo anterior se puede mencionar que: 1) la relación que existe entre la CIC y el % de materia orgánica, identificado por el aumento de cationes que favorecen el almacenamiento de nutrientes. 2) La influencia del incremento de cationes en el aumento de pH, con lo que se puede suponer una liberación lenta de cationes, preferentemente Ca, Mg, K y Na (Guacaneme y Barrera-Cataño, 2007). Con las dos consideraciones anteriores se podría comprobar la influencia benéfica al adicionar el compost. El valor de CIC en T1 podría indicar un adicional efecto inhibitor de lixiviación ocasionado por la presencia de *Simarouba glauca*, considerando el menor contenido de materia orgánica (Cuadro 8).

Como se observa en el cuadro 9, todos los tratamientos tuvieron una disminución significativa en la conductividad eléctrica ($p = 0.026$) ($T5 A > T3 > T1 > T2 > T4$, Control $> T5 B > T5 C$). Donde el tratamiento control presentó una mayor dinámica en sus valores durante el experimento. Todos los valores del experimento se encontraron en la categoría de efectos despreciables de salinidad ($< 1 \text{ dS m}^{-1}$). Tales disminuciones pueden atribuirse al lavado de sales que sufrieron estos suelos a causa de procesos de lixiviación. Lo cual se confirmaría con las disminuciones de % CO y %MO que se presentaron en T1, T2, T3 y T5 5%. En el caso del T4, T5 10%, T5 15% y probablemente el control, se puede encontrar una mayor influencia posiblemente a la mineralización (Guacaneme y Barrera-Cataño, 2007) considerando el incremento en % CO y a problemas de compactación del suelo derivado de la adición de un mayor porcentaje de compost.

CUADRO 9 Valores de conductividad eléctrica en ds m^{-1} en los distintos tratamientos durante el experimento. Los valores representan la media de tres replicados \pm desviación estándar.

Tiempo (días)	Tratamientos							
	1	2	3	4	5A	5B	5C	Control
0	0.008 \pm 0.0	0.018 \pm 0.0	0.012 \pm 0.01	0.018 \pm 0.001	0.018 \pm 0.0	0.012 \pm 0.001	0.018 \pm 0.0	S.D.
30	0.006 \pm 0.001	0.005 \pm 0.0	0.008 \pm 0.01	0.024 \pm 0.048	S.D.	S.D.	S.D.	0.003 \pm 0.0
60	0.005 \pm 0.001	0.006 \pm 0.0	0.005 \pm 0.007	0.006 \pm 0.0	S.D.	S.D.	S.D.	0.008 \pm 0.01
90	0.004 \pm 0.0	0.010 \pm 0.005	0.005 \pm 0.040	0.008 \pm 0.003	0.007 \pm 0.0	0.014 \pm 0.001	0.016 \pm 0.0	0.004 \pm 0.0

S.D. sin dato para la muestra.

8.1.2 β - GLUCOSIDASA.

Los valores medios de actividad de β -glucosidasa encontrados en este experimento (figura 9) solo mostraron diferencias significativas ($p > 0.001$) entre los tratamientos con uso del suelo de Natividad *versus* el suelo control, para el tiempo inicial en el control, (0.18 μ moles PNF/g de suelo seco h) el valor fue 150% mayor con respecto a los otros tratamientos y en el tiempo final (0.32 μ moles PNF/g de suelo seco h) 230% más; con estos valores encontrados se verifica que el suelo utilizado como control se encuentra menos perturbado (Cerón y Melgarejo, 2005). Sin embargo el tratamiento 4 uno de los que presentó mayores % de CO, parámetro relacionado con la actividad enzimática (Pajares-Moreno *et al.*, 2010) presentó una de las menores actividades de β -glucosidasa a diferencia del T5 15%, que correspondió a una de las mayores actividades enzimáticas con la presencia de un alto % CO (4.43). A diferencia de lo encontrado por Morales-Chávez (2010) donde la presencia de planta (leguminosas) y lodo significó una mayor actividad de β -glucosidasa en suelos, en los tratamientos de este experimento no hubo diferencias significativas entre la presencia y ausencia de *Simarouba glauca*, lo que nos puede indicar que ante la perturbación que presenta el suelo, la adición de una enmienda es de más rápida respuesta. Con la consideración que el suelo usado en el experimento presenta cierto grado de perturbación comparado con el suelo control, se puede inferir que el suelo de Natividad se encuentra en una etapa inicial de descomposición de la materia orgánica (Navas *et al.*, 2009) muy probablemente de

la adicionada con la enmienda biológica lo que representaría un efecto benéfico. Con la finalidad de demostrar que las diferencias entre actividades del suelo control (menos perturbado y menor contenido de materia orgánica) con respecto a los demás tratamientos (suelo perturbado y mayor contenido de materia orgánica) se deben a la presencia de elementos traza biodisponibles, sería necesario hacer cuantificaciones del carbono orgánico disponible y del grado de mineralización, para confirmar que el carbono orgánico disuelto se encuentra realizando funciones de secuestro con elementos traza o que la materia orgánica disponible no se encuentra lábil para la enzima en estudio.

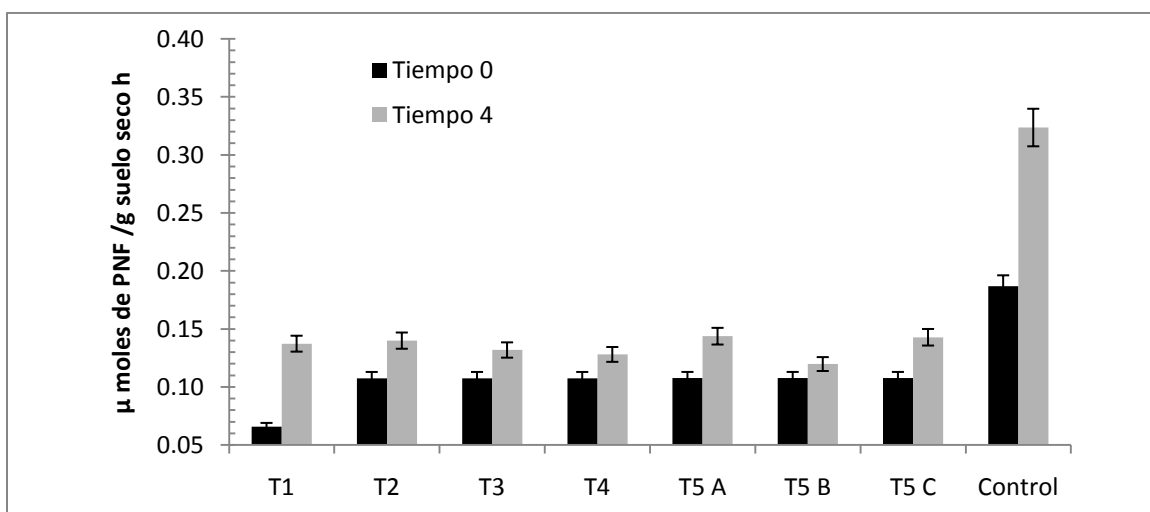


FIGURA 9 Actividad β -glucosidasa al tiempo cero y 90 días del experimento (tiempo 4) del experimento. Se presentan valores medios de tres replicas, barras indican \pm desviación estándar.

8.1.3 ELEMENTOS TRAZA

Los elementos traza totales en el suelo presentan un interesante campo de estudio debido a que concentraciones elevadas (dependiendo el elemento traza) pueden intervenir negativamente en la absorción y transporte de nutrientes básicos. Kabata-Pendias y Pendias (2001) muestra que los principales parámetros que regulan los procesos de lixiviación y complejación de elementos traza son:

1. Valores de pH y eH
2. Fracción granulométrica fina (<0.02 mm)
3. Materia Orgánica

4. Óxidos e Hidróxidos principalmente de Fe, Mn y Al.
5. Microorganismos.

Los elementos traza pseudo-totales presentes en el suelo de Natividad (cuadro 10) no mostraron el efecto esperado con la adición del compost de biosólidos, excepto para el Pb y solo en el tratamiento 4. Dicho efecto consiste en incrementar la movilización y biodisponibilidad para probar a *Simarouba glauca*, como especie acumuladora o estabilizadora de elementos traza.

CUADRO 10 Valores de concentración de elementos traza pseudo-totales en mg kg⁻¹ de suelo base seca, para suelo de natividad y suelo control en tiempo cero del experimento. Los valores representan la media de tres replicas ± desviación estándar.

Metal	Natividad	Control
Ni	3.98 ± 0.02	1.80 ± 0.01
Zn	157.15 ± 0.85	13.36 ± 0.07
Pb	68.86 ± 0.11	1.89 ± 0.03
Cu	11.73 ± 0.08	3.37 ± 0.01
Cd	0.720 ± 0.0	0.0
As	0.072 ± 0.0	0.0

Los incrementos en las concentraciones de todos los tratamientos excepto en algunos elementos traza de T4, control y T1 (cuadro 11), mostraron incluso niveles dentro del rango de fitotóxicidad para Pb (100 – 400 mg kg⁻¹) y Zn (70 – 400 mg kg⁻¹). Los resultados muestran un comportamiento similar al encontrado por Pérez-de-Mora et al., (2006) donde las concentraciones pseudo-totales de Cu y As se incrementaron debido a la adición de enmiendas provenientes de residuos, mientras que para Cd, Pb y Zn el comportamiento es poco claro y se atribuye a la heterogeneidad del muestreo. En el caso del Pb los niveles fitotóxicos en suelo se presentaron a los 90 días (tiempo 4) del experimento, en los tratamientos 2, 3 y 4, en este ultimo rebasando el intervalo de fitotoxicidad en suelo. Para el caso del Zn los niveles fitotóxicos se presentaron desde el inicio del experimento en los

tratamientos que usan el suelo proveniente de Natividad, mostrando una ligera disminución en el valor final de T4, sin diferencias estadísticamente significativas (cuadro 11). Las concentraciones de Ni, Cd y As fueron más altas en los tratamientos con suelo de Natividad (cuadro 11), excepto para el T4 y T1 en As a los 90 días del experimento y para el control en Cd y As. Los incrementos en Ni, Cd y As se dieron sin llegar a niveles de fitotoxicidad, 10 - 100 mg kg⁻¹, 3 - 8 mg kg⁻¹ y 20 mg kg⁻¹ respectivamente. Se presentaron diferencias estadísticamente significativas solo con el tratamiento control en As (p=0.036) y Cd (p=0.015). Al igual que el Pb, el Cu mostró incrementos en todos los tratamientos sin diferencias estadísticamente significativas, más que las atribuibles a la variable tiempo (p =0.044), y sin alcanzar concentraciones dentro del intervalo de fitotoxicidad (60 -125 mg kg⁻¹).

Los incrementos descritos anteriormente en T1 y en mayor medida en T2 y T3, podrían estar relacionados con la presencia de materia orgánica y el incremento en pH. Este último parámetro reviste un particular interés debido a lo encontrado por Kabata-Pendias y Pendias (2001), donde el Cd, Cu, Ni, Pb y Zn presentan una alta afinidad para reaccionar con carbonatos, co-precipitándose y pudiendo ser adsorbidos por óxidos principalmente de Fe y Mn, que para este caso tanto el incremento de MO como de pH, estuvo relacionado con la adición del compost de biosólido, que además es una importante fuente de carbonatos. Debido a los incrementos que se presentaron en el tratamiento control se puede atribuir un efecto adicional a la presencia de *Simarouba glauca*, considerando los procesos en los que se involucran las raíces tales como: a) asimilación/ producción de cationes/aniones, b) liberación de ácidos orgánicos y consumo de CO₂ y O₂, c) reacciones redox (Pérez-de-mora *et al.*, 2006). A pesar del incremento en las concentraciones de elementos traza, se considera un resultado ventajoso la inhibición de la movilidad de elementos traza en suelo, debido a la adición de compost de biosólido. Sin embargo como lo describieron Madejón *et al.* (2006), la solubilidad y biodisponibilidad de elementos traza puede ser más importante que las concentraciones pseudo-totales en los suelos contaminados para estudios de fitorremediación.

Cuadro 11 Valores de concentración de elementos traza pseudo-totales en los tratamientos (1=suelo + planta; 2= suelo + planta + enmienda 5%; 3= suelo + planta + enmienda 10%; 4= suelo + planta + enmienda 15%; control = suelo control) después de 90 días en mg kg⁻¹ de suelo base seca. Los valores representan la media de 3 replicados \pm desviación estándar.

Metales	Tratamientos				
	1	2	3	4	Control
Ni	5.34 \pm 0.009	6.11 \pm 0.021	7.19 \pm 0.029	3.65 \pm 0.03	1.91 \pm 0.009
Zn	240.3 \pm 1.49	276.2 \pm 1.42	312.0 \pm 1.04	150.4 \pm 0.720	3.70 \pm 0.107
Pb	91.06 \pm 0.108	110.9 \pm 0.44	124.7 \pm 0.115	558.4 \pm 1.82	2.21 \pm 0.023
Cu	19.41 \pm 0.064	20.6 \pm 0.06	25.26 \pm 0.029	16.65 \pm 0.109	3.62 \pm 0.017
Cd	0.84 \pm 0.015	1.01 \pm 0.009	1.08 \pm 0.0	0.62 \pm 0.0	0.12 \pm 0.0
As	0.066 \pm 0.241	0.087 \pm 0.414	0.094 \pm 1.29	0.038 \pm 0.315	0.00

Las concentraciones solubles de CaCl₂ de los elementos traza encontradas en el experimento son los primeros resultados obtenidos para la zona de Natividad. Estos resultados muestran una disminución en la concentración de los elementos traza analizados excepto para el Cd, para el que todos los tratamientos mostraron un incremento de la solubilidad. Estas concentraciones solubles por CaCl₂ son ampliamente utilizadas debido a que simulan la fase de solución del suelo para estimar el contenido de elementos traza biodisponibles (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Asimismo las concentraciones solubles (CaCl₂) de los elementos traza analizados en suelo, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, salvo algunas excepciones para Cu, Cd y As. Sin embargo se aprecia al control que mantuvo concentraciones solubles en cero excepto para el Cd (figura 12a), lo que nos podría indicar que durante la germinación de las semillas de *Simarouba glauca* hubo presencia de Cd.

En el caso de la concentración soluble de Ni (figura 10 a), se encontró un incremento de 316 %, en T5 C con respecto a T 4, efecto que puede atribuirse a la presencia de *S. glauca*, ya sea por acción de inhibición ó incremento causado por la presencia de la enmienda en un 15%. Tal efecto se puede relacionar a la presencia de ácidos orgánicos, que posiblemente muestra la correlación encontrada entre MO del suelo y concentración soluble de Ni (cuadro 12).

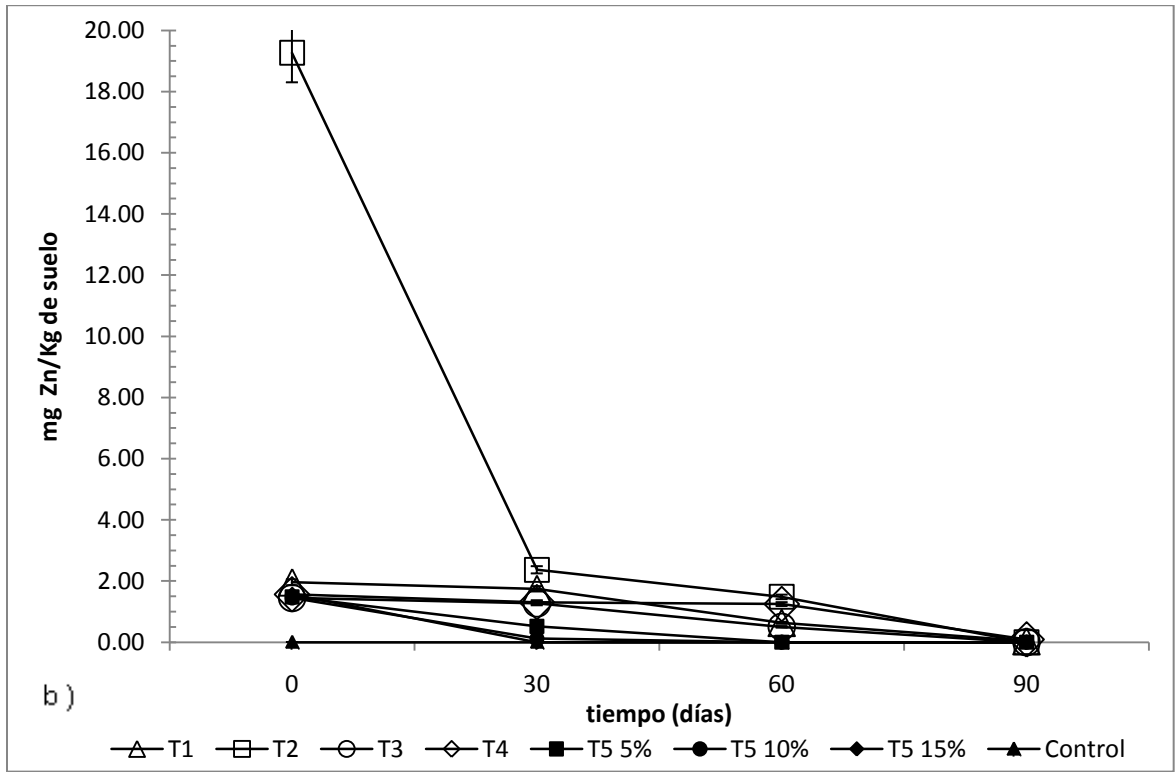
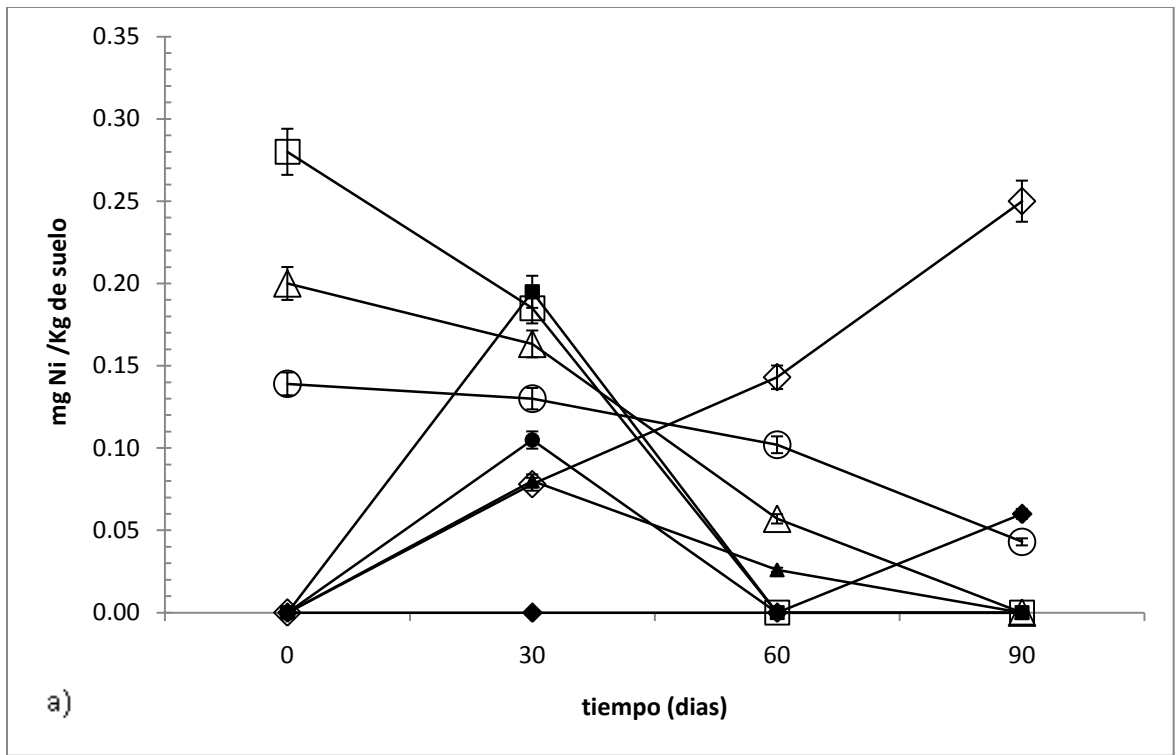


FIGURA 10 Concentración soluble (CaCl₂) de Ni y Zn en los distintos tratamientos. Se presentan valores medios de tres replicas, barras indican desviación estándar.

Aunque las concentraciones solubles de Zn fueron las más altas que se presentaron, a los 90 días todos los tratamientos disminuyeron a prácticamente cero (figura 10 b), siendo más notorio este comportamiento en el T2 posiblemente debido a su bajo pH inicial (5.3). Mostrando el mismo efecto para Pb, Ni y Cu (figura 11 y 10 a).

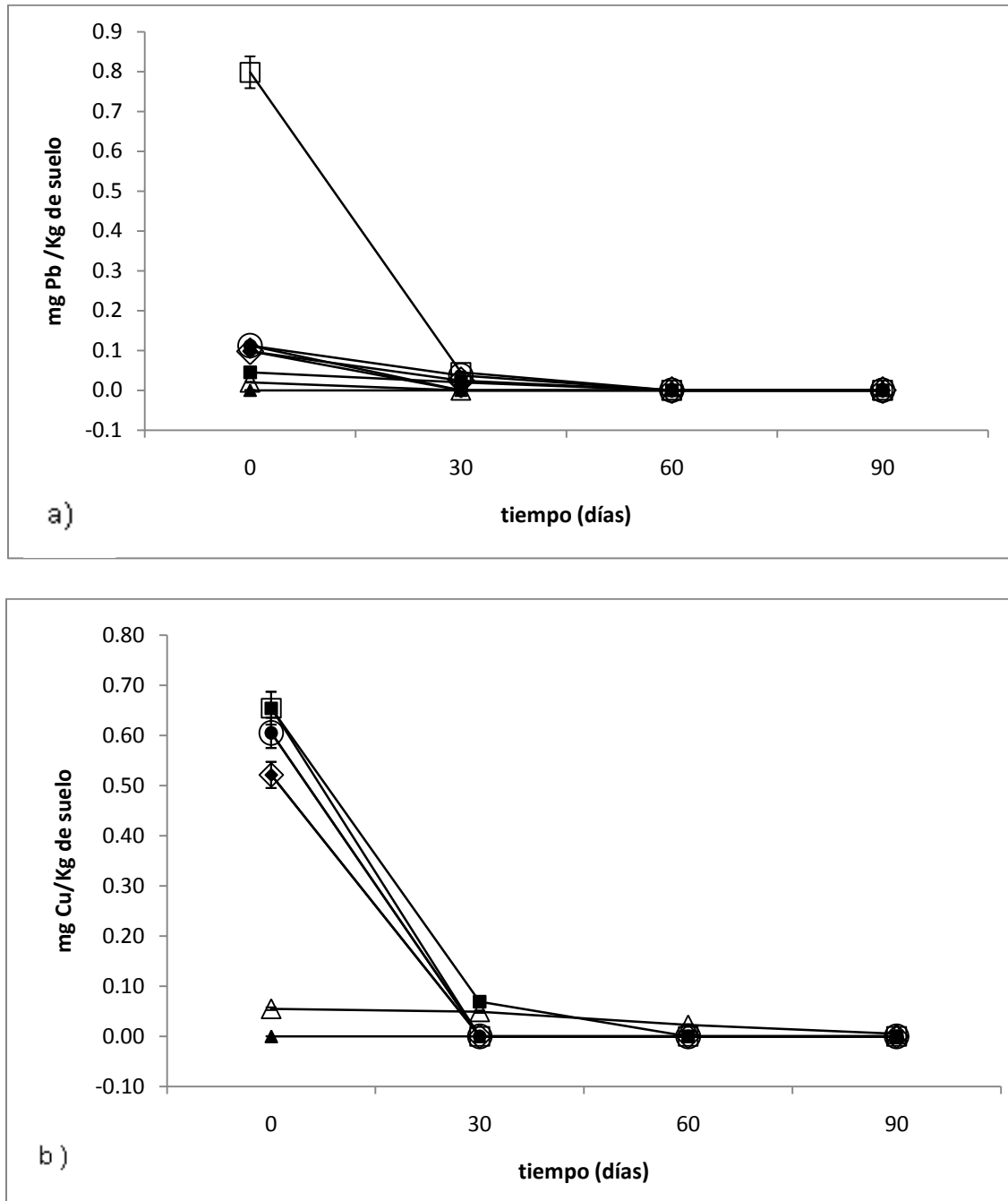


FIGURA 11 Concentración soluble (CaCl₂) DE Pb y Cu en T1 (△), T2 (□), T3 (○), T4 (◇), T5 A (■), B (●), C (◆) y Control (▲). Se presentan valores medios de tres replicas, barras indican desviación estándar.

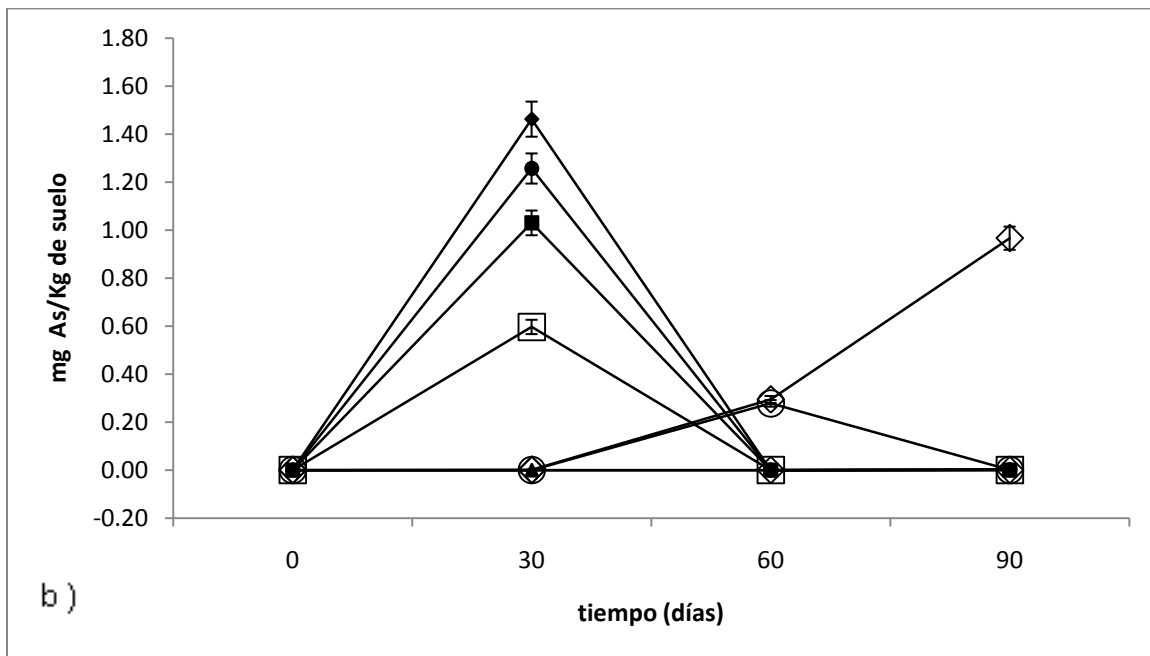
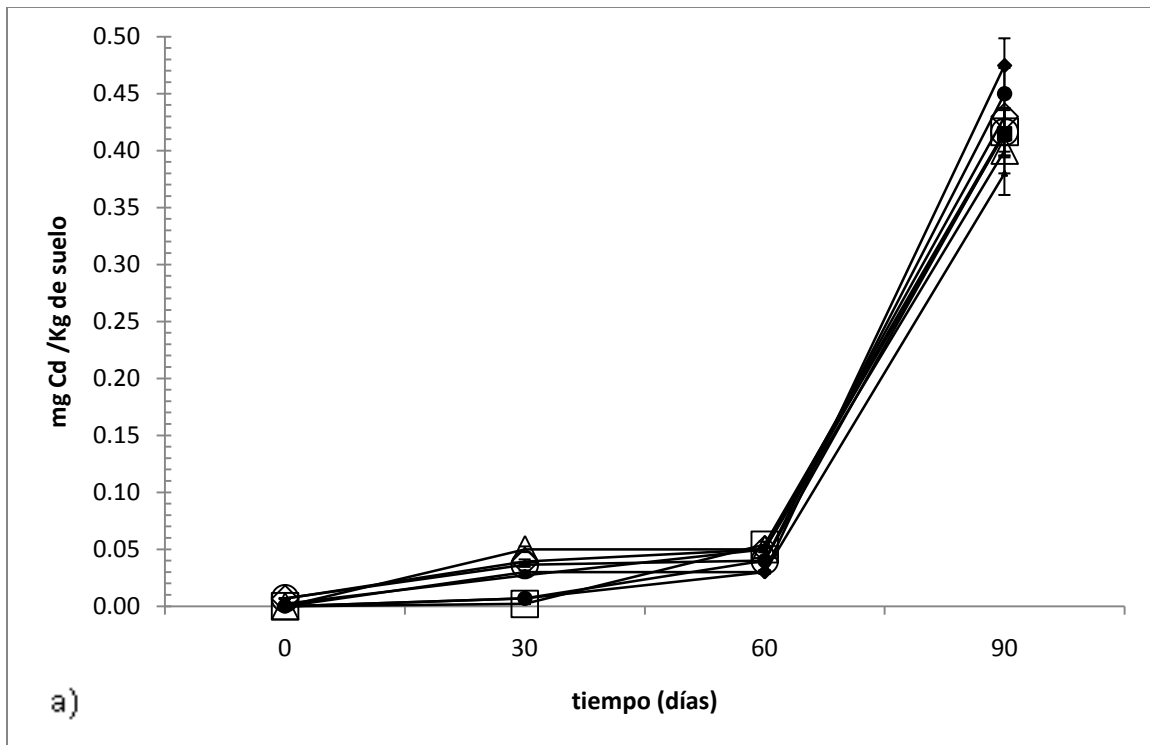


FIGURA 12 Concentración soluble (CaCl_2) de Cd y As en T1 (Δ), T2 (\square), T3 (\circ), T4 (\diamond), T5 A (\blacksquare), B (\bullet), C (\blacklozenge) y Control (\blacktriangle). Se muestran valores medios de 3 replicas, barras indican desviación estándar.

La correlación inversa entre la concentración soluble de Cu y pH, queda de manifiesto en la figura 11, donde las concentraciones solubles iniciales se presentan en T5 A, B y C; los cuales son los pH más bajos, y se incrementan en % del 10, 5 y 16 respectivamente, para disminuir a valores de cero, con una diferencia estadísticamente significativa en los tratamientos con uso de enmienda ($p=0.001$). De esta manera se comprueba que la concentración soluble de Cu es fuertemente influenciada por el pH (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Con respecto a las concentraciones solubles de As y Cd, destacan las diferencias estadísticamente significativas para As en tiempo 2 (30 días) ($p= 0.046$), así como para Cd ($p=0.001$) en tiempo 4 (90 días).

Debido a la dinámica observada en el experimento, se puede determinar que el compost de biosólido utilizado resulto efectivo para reducir las concentraciones solubles (CaCl_2) de Zn, Pb, Cu y As. Lo anterior se vincula con el comportamiento descrito por Madejon *et al.* (2006), el cual consiste en que los incrementos de pH disminuyen la movilidad de los elementos traza catiónicos, incrementando la capacidad de adsorción. En el presente experimento también se validó dicho comportamiento (Cuadro 12), excepto para Cd y Ni.

En el caso del Cd, el incremento de solubilidad a pesar de los incrementos de pH nos indicaría tal como lo menciona Kabata-Pendias y Pendias (2001) que la solubilidad de este elemento traza en suelos con $\text{pH} > 5.5$ está mayoritariamente influenciado por el contenido de Mn y Fe así como la formación de óxidos e hidróxidos de estos elementos. Con respecto a la concentración soluble de Ni se atribuye, a que su solubilidad esta inversamente relacionada con el pH del suelo, y se ha encontrado más relacionada con la materia orgánica en los horizontes superficiales del suelo (Kabata-Pendias y Pendias, 2001).

CUADRO 12 Correlaciones de pH y materia orgánica con la concentración soluble de elementos traza.

	Ni	Zn	Pb	Cu	Cd	As
pH	.124	-.163	-.291	-.592**	.302	-.305
MO	.369*	.135	.147	.230	-.245	.252

** p = 0.01, * p = 0.05

8.2 PLANTA

8.2.1 ELEMENTOS TRAZA

El estudio de los elementos traza en *Simarouba glauca* tenía especial interés debido a la hipótesis planteada y el objetivo de evaluar a *Simarouba glauca* como especie con posible potencial fitorremediador, además de dar seguimiento al efecto de los biosólidos en suelos que presentaron niveles fitotóxicos para Zn y Pb. La respuesta de *Simarouba glauca* fue particularmente interesante para el Zn, Cu y Ni (figuras 13, 14 y 16) los cuales presentaron concentraciones dentro del intervalo considerado como nivel normal en plantas superiores (15 – 150 mg kg⁻¹, 3 – 20 mg kg⁻¹, 0.1 – 5 mg kg⁻¹) y sobre todo para el Pb (figura 15) que tuvo concentraciones sobre el intervalo (2 – 5 mg kg⁻¹) (Chaney, 1989).

De manera general este experimento mostró diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre la absorción de elementos traza por parte de *Simarouba glauca* para los suelos con y sin adición de enmienda.

Bajo las condiciones experimentales usadas se puede notar que el Tratamiento 1 (sin enmienda) presentó en general las concentraciones más altas en tejido (hoja, tallo y raíces) de *Simarouba glauca*, pero no presentó el pH más bajo de los tratamientos, con lo que podemos confirmar que la adición de la enmienda de compost de biosólidos disminuye la concentración soluble (CaCl₂) de los elementos traza presentes en el suelo del experimento. El mecanismo de absorción de elementos traza depende principalmente de la especie y edad de la planta, pH,

concentración de sustancias orgánicas, concentración de elementos traza, régimen de humedad, contenido de arcilla, capacidad de intercambio catiónico, concentración de fósforo y de la constante de estabilidad del complejo órgano-metálico (Alva *et al.*, 2000). Un comentario especial merecen las condiciones climáticas como la temperatura y fenómenos de flujo de agua, que han mostrado su influencia en la absorción de elementos traza; siendo generalizado una mayor absorción de elementos traza por plantas en ambientes con altas temperaturas (> a 25°C) (Kabata-Pendias y Pendias, 2001).

En el caso del Zn la concentración en raíz fue significativamente mayor en comparación con hoja ($p=0.031$) y su reducción fue gradual en tallo y hoja respectivamente, encontrando también diferencias entre tallo y hoja ($p=0.006$) a los 90 días del experimento (figura 13). No se rebasó el intervalo considerado normal en plantas superiores (15 -150 mg kg⁻¹). Corresponde al T1 las concentraciones más altas en raíz, tallo y hoja, encontrando diferencias significativas, con el T4 ($p=0.026$) y el control ($p=0.040$), para el T4 estas diferencias podrían estar relacionadas con la disminución en la movilidad que presentó el Zn, y para el control se puede asumir debido a las bajas concentraciones encontradas. Las concentraciones de Zn en tejido de *Simarouba glauca* tuvieron diferencias entre el inicio y final del experimento ($p=0.039$) en todos los tratamientos y se encontró que las concentraciones mostraban el siguiente comportamiento: raíz > tallo > hoja. Asimismo para el Zn, se observó a través del factor de translocación (TF) (cuadro 14); que en todos los tratamientos excepto el control se transloca efectivamente el Zn de raíz a la parte aérea, y por el contrario para el factor de bioacumulación (BAF) (cuadro 13) solo el tratamiento control muestra a *Simarouba glauca* como una planta acumuladora de Zn. Sin embargo el factor BAF debe tomarse con cautela, debido a los niveles tan bajos encontrados en el control.

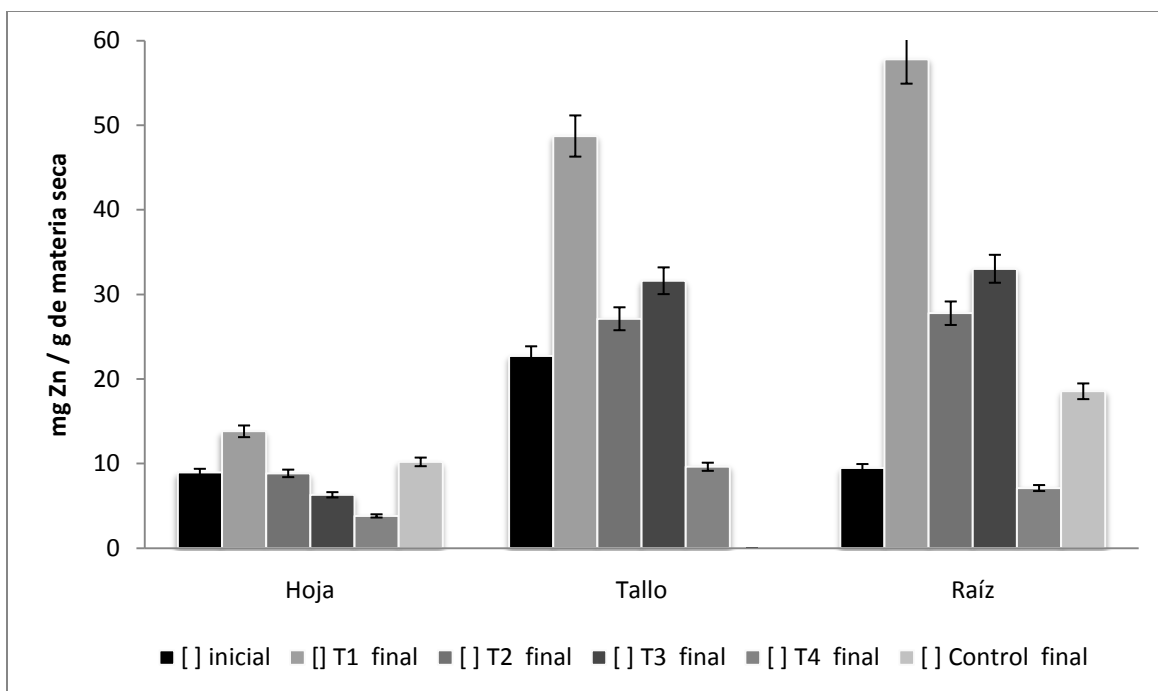


FIGURA 13 Concentración de Zn en tejidos de *Simarouba glauca*. Los valores representan la media de tres repeticiones. Las barras indican desviación estándar.

Las concentraciones de Cu en los tejidos de *Simarouba glauca* (figura 14) no mostraron diferencias significativas entre tallo y hoja, pero si entre hoja y raíz ($p=0.019$), donde la concentración fue superior sin exceder el nivel considerado como normal en plantas superiores ($3 - 20 \text{ mg kg}^{-1}$). Las mayores concentraciones se presentaron en el T1 que solo presento diferencias significativas con respecto a T4 ($p=0.031$) que no hubo detección en la medición al igual que en tratamiento control para tallo y hoja; asumiendo este comportamiento como normal debido a la reducción de la concentración soluble ocasionada por la adición de la enmienda de biosólido. En el caso de este elemento traza el factor de bioacumulación mostró a *Simarouba glauca* como una especie exclusora de Cu, así como un interesante comportamiento en T3 que mostró una buena capacidad para translocar Cu de raíz a parte aérea ($TF > 1$). El comportamiento encontrado en T3, sugiere realizar mayores estudios considerando la actividad biológica que presenta el Cu en los organismos y lo descrito por Madejón y Murillo (2004) respecto a que el Cu se acumula preferentemente en raíces impidiendo su transporte masivo a la parte aérea. Asimismo Kabata-Pendias y Pendias (2001) ha descrito que las altas

concentraciones de Cu en partes áreas se presentan únicamente en las fases de crecimiento intenso.

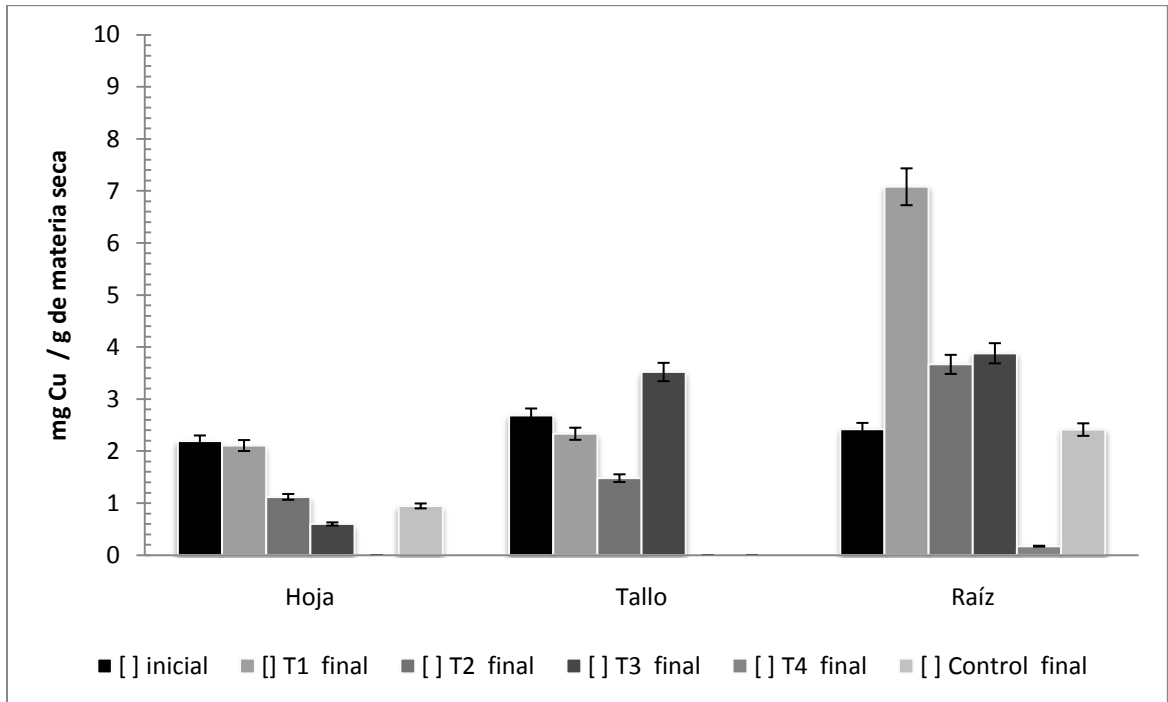


FIGURA 14 Concentración de Cu en tejidos de *Simarouba glauca*. Los valores representan la media de tres repeticiones. Las barras indican desviación estándar.

Para el caso del Pb se obtuvieron concentraciones mayores al intervalo considerado normal en plantas superiores ($2 - 5 \text{ mg kg}^{-1}$) sin alcanzar niveles de fitotoxicidad ($30 - 300 \text{ mg kg}^{-1}$) (Chaney, 1989). Las mayores concentraciones se presentaron en raíz de *Simarouba glauca* (figura 15), mostrando diferencias con respecto a la concentración en tallo ($p=0.028$) y hoja ($p=0.022$) sin encontrar diferencias entre tallo y hojas, con lo cual se puede visualizar el efecto descrito por Madejón et al., (2004) en el que las plantas suelen realizar una acumulación preferencial de Pb en sus raíces evitando así los niveles fitotóxicos que afectan los principales órganos fotosintéticos. Asimismo, se observó una vez más que la presencia del compost no incremento las concentraciones en planta a pesar de que el suelo de T2, T3 y T4 mostró concentraciones dentro del intervalo de fitotoxicidad ($100-400 \text{ mg kg}^{-1}$) (Ross, 1994); sin embargo se encontró un $TF > 1$ en los tratamientos 3 y 4. También

se presentó un factor BAF en el tratamiento control que ubica a *Simarouba glauca* como especie acumuladora de Pb, en ciertas condiciones fisicoquímicas y biológicas del suelo, así como de concentración de Pb. Razón que no hace posible declarar a *Simarouba glauca* como especie acumuladora a pesar del valor BAF encontrado.

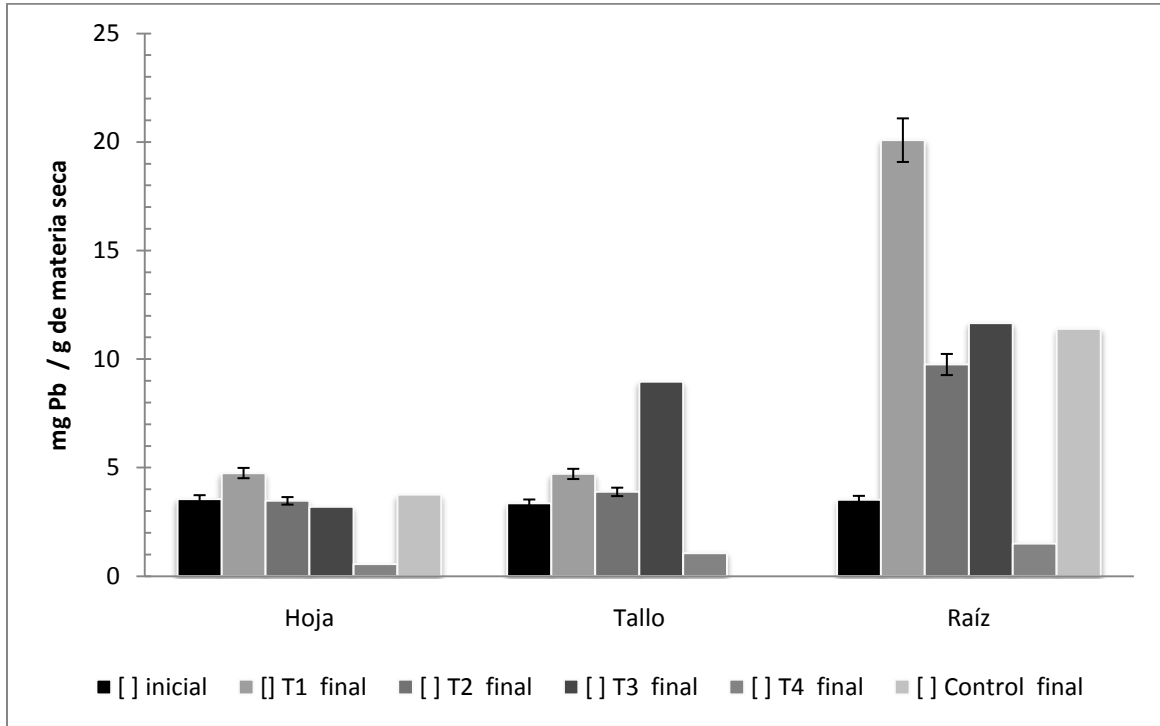


FIGURA 15 Concentración de Pb en tejidos de *Simarouba glauca*. Los valores representan la media de tres repeticiones. Las barras indican desviación estándar.

Las concentraciones de Ni en los tejidos de *Simarouba Glauca* (figura 16) solo mostraron diferencias significativas entre raíz y tallo ($p=0.007$) encontrándose estas concentraciones junto con las de hoja dentro del intervalo considerado como normal en plantas superiores ($0.1-5 \text{ mg kg}^{-1}$). Entre tratamientos únicamente se observaron diferencias significativas entre T1 y T4 ($p=0.031$). Considerando que las concentraciones solubles de Ni fueron de las pocas que presentaron valores con relevancia para ser discutidas desde el punto de vista de absorción por la planta, el efecto descrito para la concentración soluble (CaCl_2) en T4 y las correspondientes bajas concentraciones encontradas en planta; se pueden atribuir a una posible inhibición ocasionada por la presencia de más altas concentraciones pseudo-totales

de Zn y Cu, y de Zn para el caso de planta; tal como lo menciona Kabata-Pendias y Pendias, (2001) en donde Cu^{+2} , Zn^{+2} y Fe^{+2} inhiben la translocación de Ni de raíces a hojas. Dicha inhibición se manifiesta de manera más notable en el tratamiento control donde el TF fue menor a 1. Con respecto al BAF se encontró un comportamiento excluser que también podría estar influenciado por la presencia de Cu^{+2} y Zn^{+2} . Adicionalmente no podemos atribuir efectos tóxicos en *Simarouba glauca* por la concentración presente de Ni.

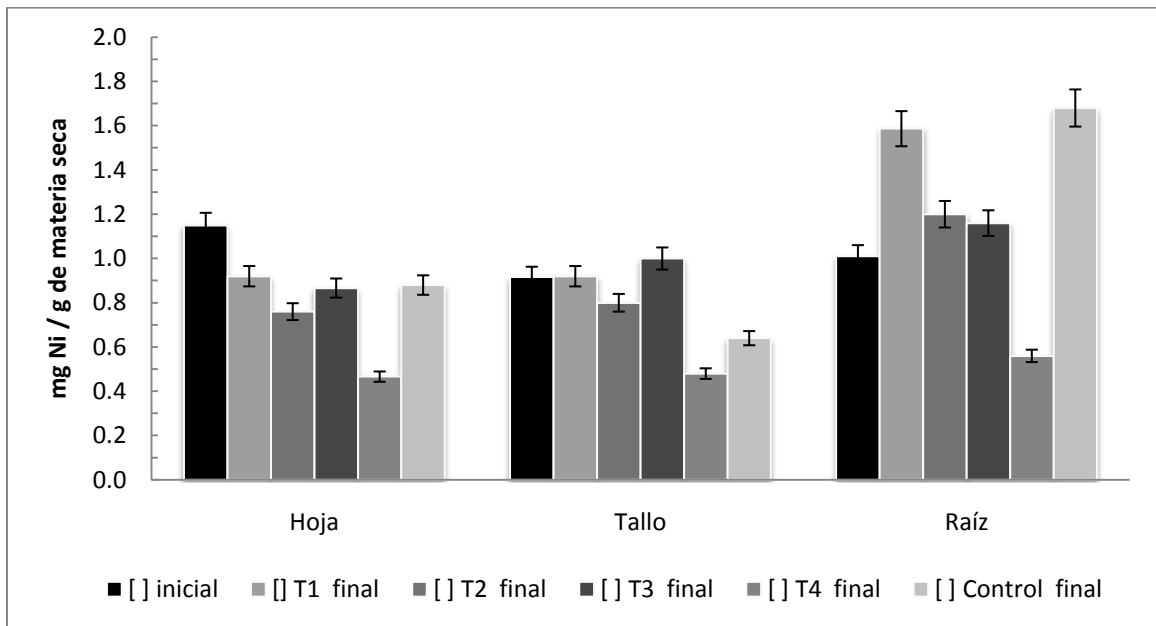


FIGURA 16 Concentración de Ni en tejidos de *Simarouba glauca*. Los valores representan la media de tres repeticiones. Las barras indican desviación estándar.

El As y Cd, dos de los elementos potencialmente más tóxicos, no alcanzaron concentraciones de relevancia. Para el caso del As (figura 18) sus niveles estuvieron muy por debajo del límite de fitotoxicidad ($3 - 10 \text{ mg kg}^{-1}$) sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos o sitios de alojamiento del elemento traza, además de presentar valores detectables únicamente en T1 y T3. Asimismo, los valores de TF y BAF fueron para todos los tratamientos menores a 1.

En el caso del Cd (figura 17) las concentraciones en el tejido de *Simarouba glauca* estuvieron en el intervalo considerado normal ($0.1-1 \text{ mg kg}^{-1}$), encontrando diferencias significativas entre hoja y raíz ($p=0.017$). Coincidiendo con lo reportado

por Kabata-Pedias y Pendias, (2001) referente a la relación entre el Cd en planta *versus* el Cd presente en el medio, podemos asumir que la única diferencia significativa se presentó debido a las concentraciones solubles que fueron mayores entre los suelos provenientes de natividad y el control ($p=0.047$). En general se ha reportado al Cd como un elemento traza efectivamente absorbido a pesar de no ser considerado un elemento esencial en procesos metabólicos. A pesar de un factor $BAF > 1$ en el tratamiento control para Cd en *Simarouba glauca* no puede aseverarse que se trata de una especie acumuladora, debido a los bajos valores de Cd en el suelo control; por otra parte *Simarouba glauca* mostró ser efectiva en la translocación de Cd ($TF > 1$) en todos los tratamientos.

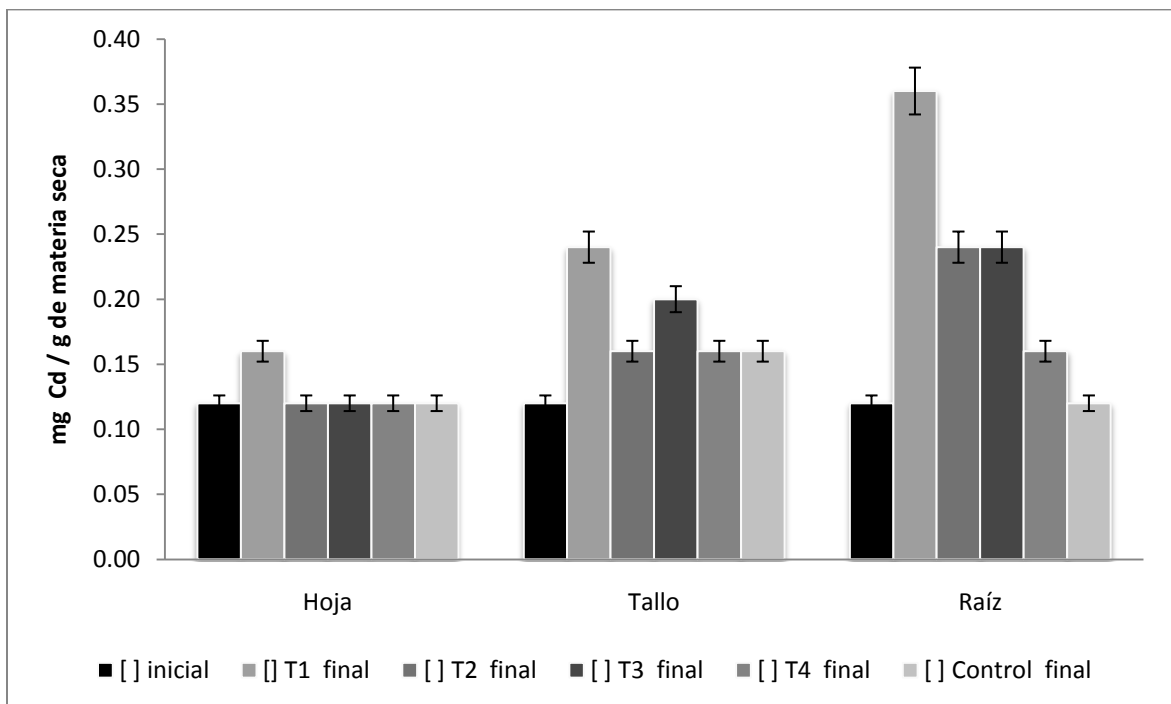


FIGURA 17 Concentración de Cd en tejidos de *Simarouba glauca*. Los valores representan la media de tres repeticiones. Las barras indican desviación estándar.

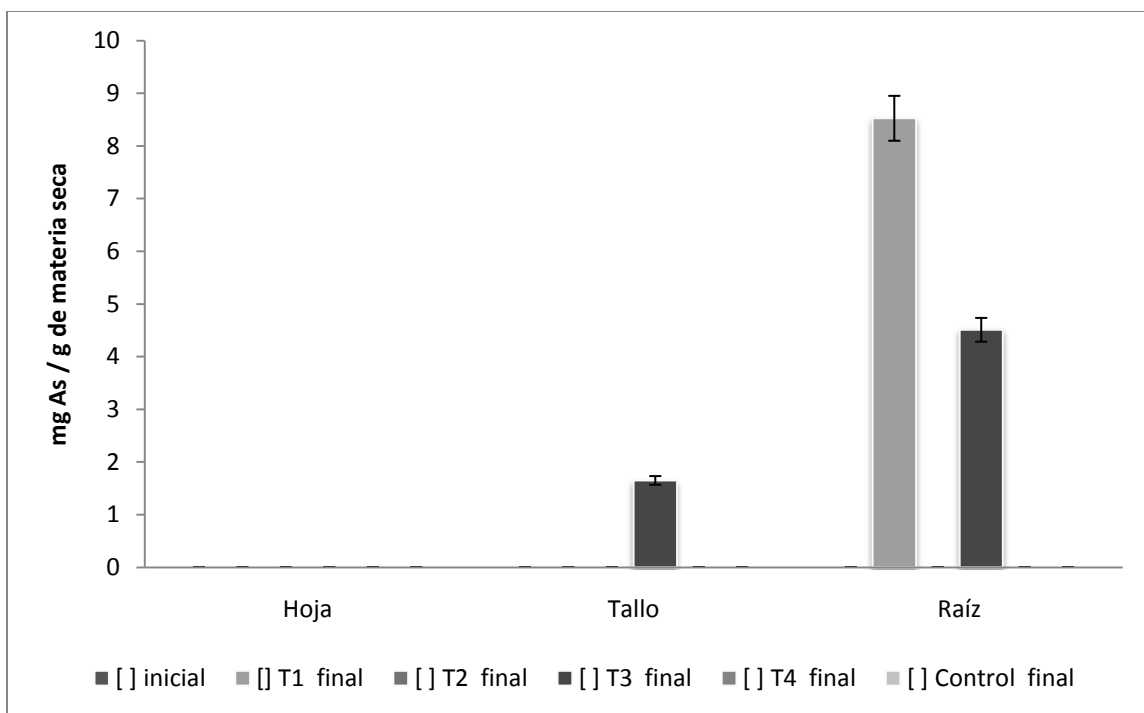


FIGURA 18 Concentración de Pb en tejidos de *Simarouba glauca*. Los valores representan la media de tres repeticiones. Las barras indican desviación estándar.

La nula presencia de efectos tóxicos y las altas concentraciones de Zn y Pb, sin llegar a niveles de fitotoxicidad, motivan a continuar con el análisis de la planta a un nivel más específico para identificar los procesos de descontaminación de elementos traza en suelos que pudieran estar relacionados con compuestos orgánicos liberados por las raíces de *Simarouba glauca* ó por microorganismos asociados a las raíces. Además de poder confirmar el mecanismo de consumo del elemento traza, donde Kabata-Pendias y Pendias (2001) menciona que el Zn es preferentemente absorbido de manera activa (vía metabólica) y el Pb es preferentemente absorbido de manera pasiva (no metabólica).

CUADRO 13 Factor de bioacumulación de los elementos traza analizados en los distintos tratamientos. Los valores representan el valor medio de tres repeticiones. \pm desviación estándar.

Factor de Bioacumulación (BAF) Ma et al., 2001					
	T1	T2	T3	T4	control
Ni	0.344 \pm 0.001	0.255 \pm 0.001	0.259 \pm 0.003	0.259 \pm 0.007	0.793 \pm 0.004
Zn	0.260 \pm 0.003	0.130 \pm 0.0	0.122 \pm 0.001	0.089 \pm 0.005	2.755 \pm 0.107
Pb	0.104 \pm 0.0	0.066 \pm 0.0	0.097 \pm 0.001	0.003 \pm 0.0	1.705 \pm 0.037
Cu	0.229 \pm 0.002	0.126 \pm 0.0	0.163 \pm 0.0	0.000	0.261 \pm 0.006
Cd	0.476 \pm 0.008	0.277 \pm 0.002	0.296 \pm 0.0	0.452 \pm 0.0	2.333 \pm 0.0
As	0.000	0.000	0.018 \pm 0.0	0.000	0.000

Al analizar el resultado conjunto de la adición del compost con la presencia de *Simarouba glauca* se encontraron interesantes efectos, debido a que los tratamientos que incluyeron *Simarouba glauca* mostraron invariablemente un aumento en la concentración pseudo-total de elementos traza en suelo, excepto para el As en tratamiento 1 (sin enmienda) y 4 (15% de enmienda), Zn en tratamiento control y T4, además de Ni y Cd en T4. Tal comportamiento podríamos vincularlo como un indicador del efecto estabilizador de *Simarouba glauca* en la rizosfera y al efecto demostrado en este experimento, referente a la reducción en la movilidad de los elementos traza por adición de la enmienda. Las anteriores aseveraciones se fundamentan en que las concentraciones más elevadas fueron encontradas en el siguiente orden: raíz > tallo > hoja. Asimismo los casos que mostraron diferencias, se pueden atribuir a: 1) la capacidad de la planta por absorber As en el tratamiento 1, y su lixiviación en T4, aunque sin contar datos para respaldar esta última teoría, y 2) la elevada absorción de Zn, considerando que es un elemento traza con funciones biológicas conocidas, esta mayor absorción de Zn la vemos reflejada en las altas concentraciones (3 veces mayor que Pb y 30 veces mayor que Ni) encontradas en raíz, tallo y hojas de *Simarouba glauca*, derivando en una posible interferencia en la absorción de Ni, Cu y en menor medida Pb y Cd.

CUADRO 14 Factor de translocación para los elementos traza analizados en los distintos tratamientos. Los valores representan el valor medio de tres repeticiones. \pm desviación estándar.

Factor de Translocación (TF) Baker & Brooks, 1989					
	T1	T2	T3	T4	control
Ni	1.160 \pm 0.017	1.300 \pm 0.0	1.609 \pm 0.020	1.690 \pm 0.041	0.905 \pm 0.0
Zn	1.082 \pm 0.007	1.295 \pm 0.007	1.148 \pm 0.10	1.891 \pm 0.098	0.550 \pm 0.013
Pb	0.471 \pm 0.001	0.754 \pm 0.006	1.043 \pm 0.012	1.079 \pm 0.101	0.331 \pm 0.008
Cu	0.627 \pm 0.008	0.709 \pm 0.004	1.062 \pm 0.0	0.000	0.392 \pm 0.013
Cd	1.111 \pm 0.0	1.167 \pm 0.0	1.333 \pm 0.0	1.750 \pm 0.0	2.333 \pm 0.0
As	0.000	0.000	0.366 \pm 0.067	0.000	0.000

Como se ha demostrado de acuerdo al factor de bioacumulación usado por Ma *et al.*, (2001) *Simarouba glauca* no es una planta hiperacumuladora (BAF >10), pero si acumuladora (BAF > 1) de Zn, Pb, y Cd. Sin embargo al presentarse únicamente en el control, el cual cuenta con bajos valores de elementos traza resulta pertinente no dar la clasificación de acumuladora a *Simarouba glauca*. Asimismo se puede dilucidar un potencial efecto inmovilizador de Ni y Cu. Resulta especialmente ventajoso lo encontrado para Pb, Cd y Ni ya que son elementos traza sin ninguna función biológica conocida hasta el momento y no representaron efectos adversos en *S. glauca*.

8.2.2 CRECIMIENTO Y NIVELES DE CLOROFILA

Los resultados de crecimiento (altura, longitud de raíz y peso seco) y niveles de clorofila demostraron que las concentraciones de elementos traza en los tejidos de *Simarouba glauca* no ocasionaron efectos por fitotoxicidad, así como también se demostró el efecto favorable de la adición de una enmienda biológica sobre el crecimiento vegetal. Con respecto a los valores de Clorofila “a”, “b” y total (cuadro 15) no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, aspecto que resulta positivo considerando la presencia de concentraciones por encima del intervalo normal (Pb) y concentraciones cercanas al límite superior (Cu) en los tratamientos que se uso suelo proveniente de Natividad, así como concentraciones de elementos traza solubles en valores igual a cero en el

tratamiento control. Los valores de clorofila total y "a" mostraron diferencias estadísticamente significativas entre tiempo cero y cuatro ($p=0.017$) para todos los tratamientos, efecto que podemos atribuir al crecimiento de las plantas.

CUADRO 15 Concentración de clorofila a, b y total en hojas de *Simarouba glauca* para los distintos tratamientos. Los valores representan el valor medio de tres repeticiones. \pm desviación estándar.

g L ⁻¹	tiempo (días)	Tratamientos				
		1	2	3	4	Control
Clorofila "total"	0	0.0191 \pm 0.013	0.0191 \pm 0.013	0.0191 \pm 0.013	0.0191 \pm 0.013	0.0191 \pm 0.013
	30	0.0231 \pm 0.014	0.022 \pm 0.010	0.0254 \pm 0.007	0.0333 \pm 0.008	0.0289 \pm 0.011
	60	0.0283 \pm 0.011	0.0374 \pm 0.019	0.0364 \pm 0.011	0.0558 \pm 0.015	0.0342 \pm 0.005
	90	0.0559 \pm 0.011	0.0611 \pm 0.006	0.0607 \pm 0.008	0.0366 \pm 0.005	0.0205 \pm 0.006
Clorofila "a"	0	0.0108 \pm 0.006	0.0108 \pm 0.006	0.0108 \pm 0.006	0.0108 \pm 0.006	0.0108 \pm 0.006
	30	0.015 \pm 0.008	0.0127 \pm 0.006	0.016 \pm 0.004	0.0202 \pm 0.005	0.016 \pm 0.007
	60	0.0178 \pm 0.006	0.0212 \pm 0.008	0.0225 \pm 0.006	0.0268 \pm 0.002	0.0203 \pm 0.003
	90	0.0282 \pm 0.002	0.0287 \pm 0.001	0.0302 \pm 0.001	0.023 \pm 0.002	0.0116 \pm 0.005
Clorofila "b"	0	0.0102 \pm 0.007	0.0102 \pm 0.007	0.0102 \pm 0.007	0.0102 \pm 0.006	0.0102 \pm 0.007
	30	0.0081 \pm 0.006	0.0099 \pm 0.004	0.0093 \pm 0.002	0.013 \pm 0.003	0.0127 \pm 0.004
	60	0.0018 \pm 0.004	0.0157 \pm 0.012	0.0138 \pm 0.004	0.0278 \pm 0.013	0.0139 \pm 0.002
	90	0.005 \pm 0.018	0.032 \pm 0.007	0.03 \pm 0.007	0.0135 \pm 0.002	0.0084 \pm 0.002

En el tratamiento 4 y en el control el contenido de clorofila a, b y total mostraron un incremento en el tiempo 3 (60 días) para disminuir en el tiempo 4 (90 días), solo para clorofila b en el tratamiento control la disminución representó tener un menor nivel de clorofila al registrado al inicio del experimento. Tal circunstancia la podríamos atribuir a que las plantas del tratamiento control mostraron un mayor crecimiento en la elongación radical comparado con el crecimiento en la parte aérea.

Para el caso de altura, las plantas mostraron incrementos con diferencias significativas entre el T2 y T1 ($p=0.028$), así como T2 *versus* control ($p=0.005$), además del T4 con respecto al control ($p=0.010$). Tales diferencias podrían estar

relacionadas con un mejor aporte nutricional proporcionado por la enmienda adicionada en T2 (10%), la cual presento las mayores alturas. Con respecto al desarrollo de las alturas en todos los tratamientos durante el tiempo que duro el experimento no se mostró una diferencia significativa (figura 19), teniendo una tasa promedio de crecimiento de 1.4 cm por mes, sin encontrarse bibliografía sobre esta variable. Caso inverso se presentó para longitud de raíz (figura 20) donde las diferencias significativas únicamente estuvieron dadas por la variable tiempo ($p=0.010$), y los mayores incrementos se dieron en el control (150%) y los menores en el tratamiento 4 (35%), efectos atribuibles en el caso del control (sin enmienda) a la presencia de menor materia orgánica asimilable en el suelo lo que repercute en un aumento de la elongación radical de *Simarouba glauca* y por consiguiente un mayor peso fresco. El caso del tratamiento 4 que mostró una menor longitud de raíz (figura 20) y una mayor altura, nos puede mostrar que la planta incrementa la actividad biológica en procesos de crecimiento en área foliar por la disponibilidad de nutrientes en la zona radical, disponibilidad derivada de la adición de enmienda en un 15% con respecto al peso total de las unidades experimentales usadas. En el T1, *Simarouba glauca* mostró una disminución del 5% en altura e incrementos discretos para longitud de raíz y peso (15% y 10%, respectivamente) efecto que podemos atribuir a la acción particular del Pb, el cual se encontró en mayor medida para dicho tratamiento, aunque sin alguna afectación aparente a los principales órganos fotosintéticos, como se menciona en la sección correspondiente a niveles de clorofila en planta. Los valores de peso seco y fresco no mostraron diferencia estadísticamente significativa.

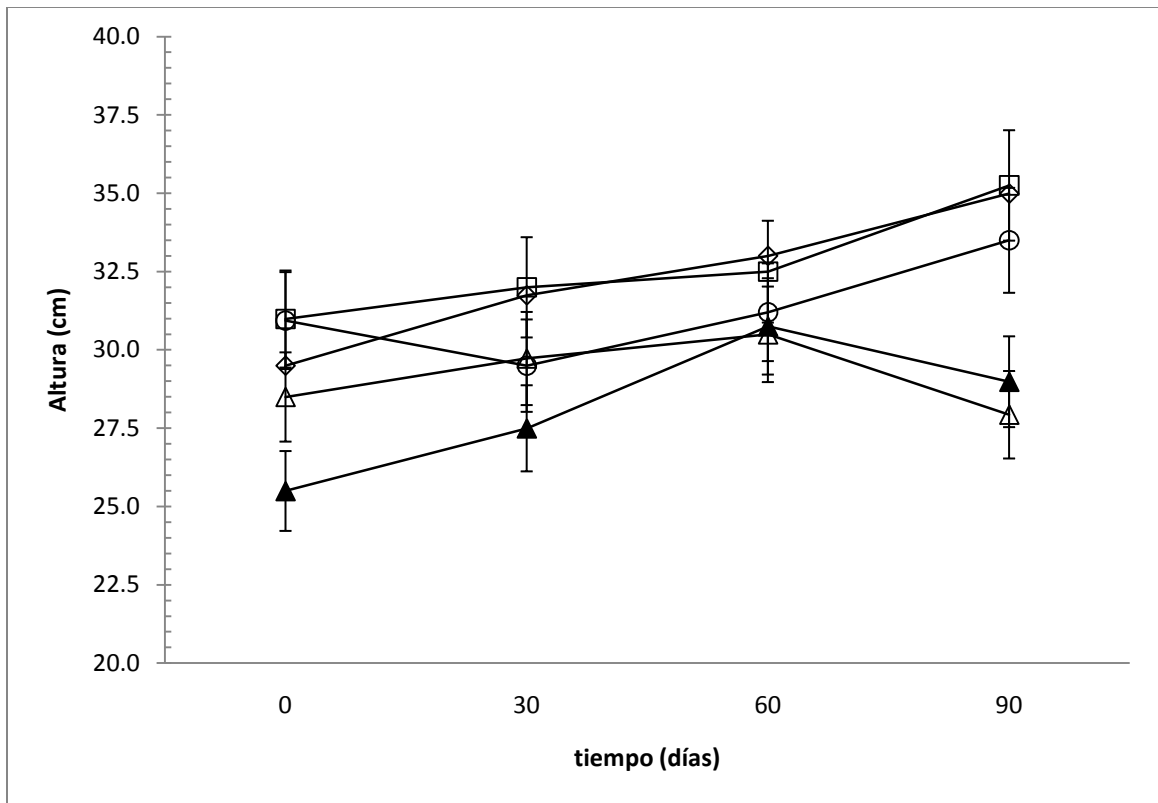


FIGURA 19 Cinética de crecimiento en altura de *Simarouba glauca* para T1 (△), T2 (□), T3 (○), T4 (◇) y Control (▲). Los valores representan la media de tres repeticiones. Las barras indican desviación estándar.

Al igual que los efectos en los resultados de crecimiento, los niveles de clorofila (a, b y total) (cuadro 15), demostraron que las concentraciones de elementos traza en los tejidos de las hojas de *Simarouba glauca* no resultaron tóxicas. El contenido de clorofila no mostró diferencias significativas registrando aumentos (3.3 veces) en todos los tratamientos excepto en las plantas del tratamiento 4 que mostró incrementos más discretos (2 veces) y las cuales tenían mayor presencia de enmienda (15%), así como en las plantas del tratamiento 1 y control que registró disminución (50% y 20% respectivamente) en los contenidos de clorofila b, recordando que dichos tratamiento no tuvieron presencia de la enmienda. Asimismo la disminución podría estar relacionada con la presencia de elementos traza en hoja, considerando que las concentraciones en hojas fueron comparativamente más altas en los tratamientos sin adición de enmienda y con un mayor porcentaje (15%) de la misma (T1>T4>control>T3>T2).

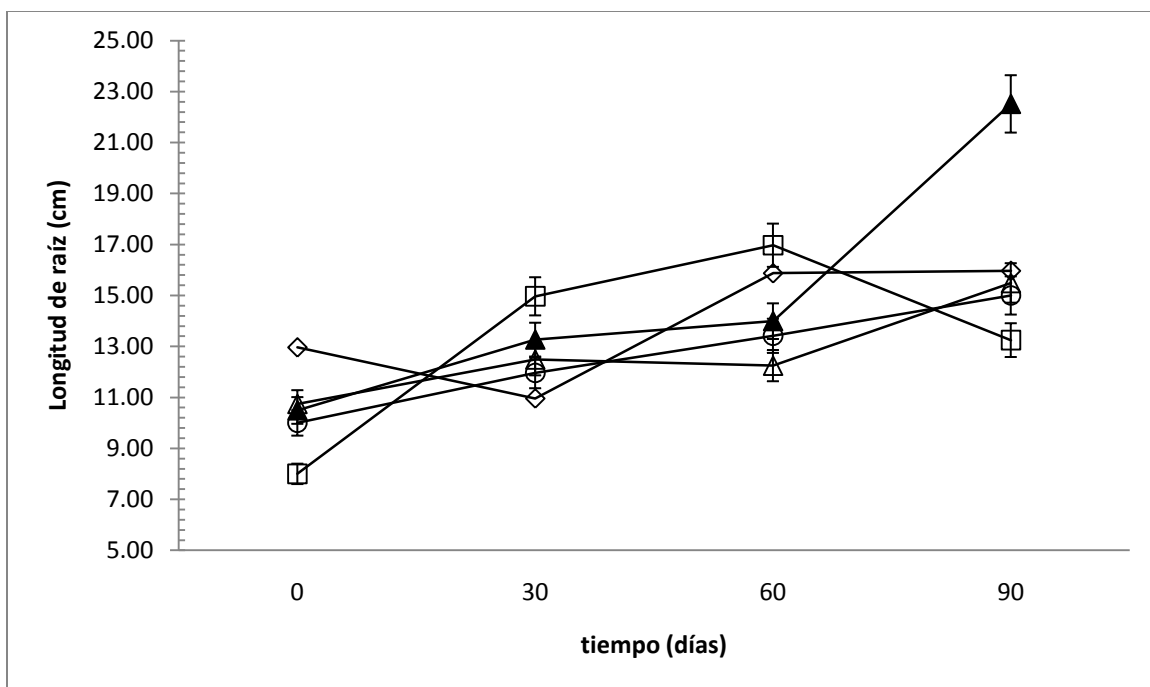


FIGURA 20 Cinética de crecimiento en longitud de raíz de *Simarouba glauca* para T1 (△), T2 (□), T3 (○), T4 (◇) y Control (▲). Los valores representan la media de tres repeticiones. Las barras indican desviación estándar.

8.2.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para el presente experimento se consideró la exposición de *Simarouba glauca* al estrés oxidativo provocado por la presencia de elementos traza en el suelo de Natividad, poniendo especial énfasis en el Pb, Zn, Cd y Ni de acuerdo a lo expuesto en la sección 6.2.1. Todos los ensayos enzimáticos fueron realizados a partir del extracto de proteína soluble sin purificar que se obtuvo de hojas y raíz.

La catalasa es una de las enzimas clave en la remoción del H_2O_2 , además de ser la principal óxidorreductasa que elimina el H_2O_2 a través de la transferencia de dos electrones produciendo O_2 y H_2O . Para nuestro experimento no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para los valores de CAT en hoja y raíz, sin embargo en el caso de CAT en hoja (figura 21) se encontró un incremento de actividad de catalasa para los tratamiento 2, 3 y 4 de 167%, 105% y 205% respectivamente, ninguno relacionado con la presencia de elementos traza;

que en el caso del Pb estuvo por encima de la concentración normal en plantas (2 – 5 mg kg⁻¹), nos indicaría que los incrementos están más relacionados con la presencia de sales provenientes de la aplicación de la enmienda. Shah *et al.*, (2001) reportaron incrementos en la concentración de CAT para concentraciones tóxicas de Cu, Pb y Zn, las cuales no se encontraron en nuestro experimento para hojas. Asimismo relaciona la actividad de CAT con presencia de estrés por salinidad o un exceso de luz solar, que nuestro caso existe la posibilidad de relacionarlo.

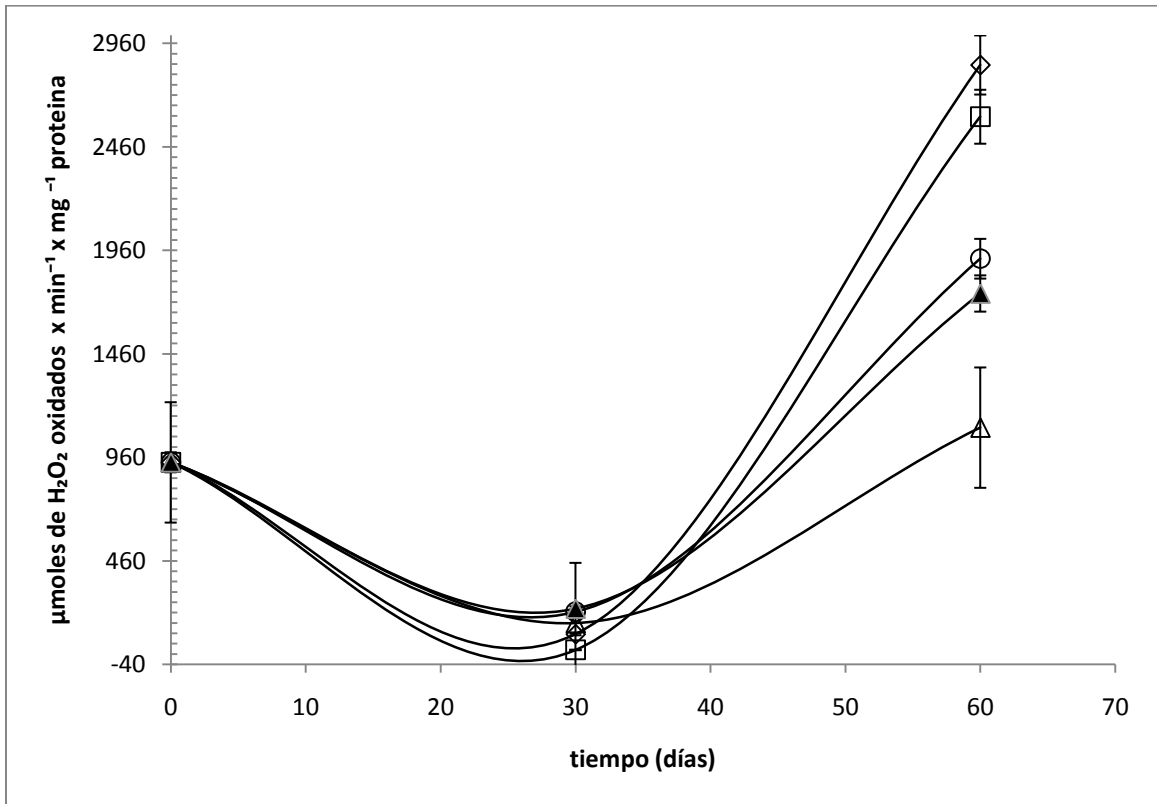


FIGURA 21 Efecto de la adición de enmienda y presencia de elementos traza en la actividad de catalasa en hojas de *Simarouba glauca* para T1 (△), T2 (□), T3 (○), T4 (◇) y Control (▲). Los valores representan la media de tres repeticiones. Las barras indican desviación estándar.

La actividad de CAT en las raíces de *Simarouba glauca* mostró los mayores incrementos de actividad en T1 (22.9%) seguido de T3 (12.8%), tratamientos que presentaron las concentraciones más altas de Pb en raíz en ese mismo orden. Dicho incremento concuerda con lo reportado por Shah *et al.*, (2001) y Chen *et al.*, (2007) referente al incremento en la actividad de CAT para ciertas especies de plantas expuestas a concentraciones tóxicas de Cu, Zn y en especial Pb. En lo que respecta a

T2, control y T4, los cuales mostraron disminución en la actividad de 38%, 96% y 100% respectivamente, podríamos vincularlo con la acción conjunta de salinidad y presencia de Pb para T2 y T4, y en el control al efecto sinérgico que pudieron haber ocasionado el Pb y Ni en raíz de *Simarouba glauca*.

La actividad de CAT tanto en hojas como en raíz, mostraron un incremento a partir del día 30 con una correlación de 0.840(>0.005), además de una diferencia estadísticamente significativa con respecto al día cero ($p=0.04$) y sesenta ($p=0.014$), efecto que podemos relacionar con el funcionamiento del sistema de defensa antioxidante.

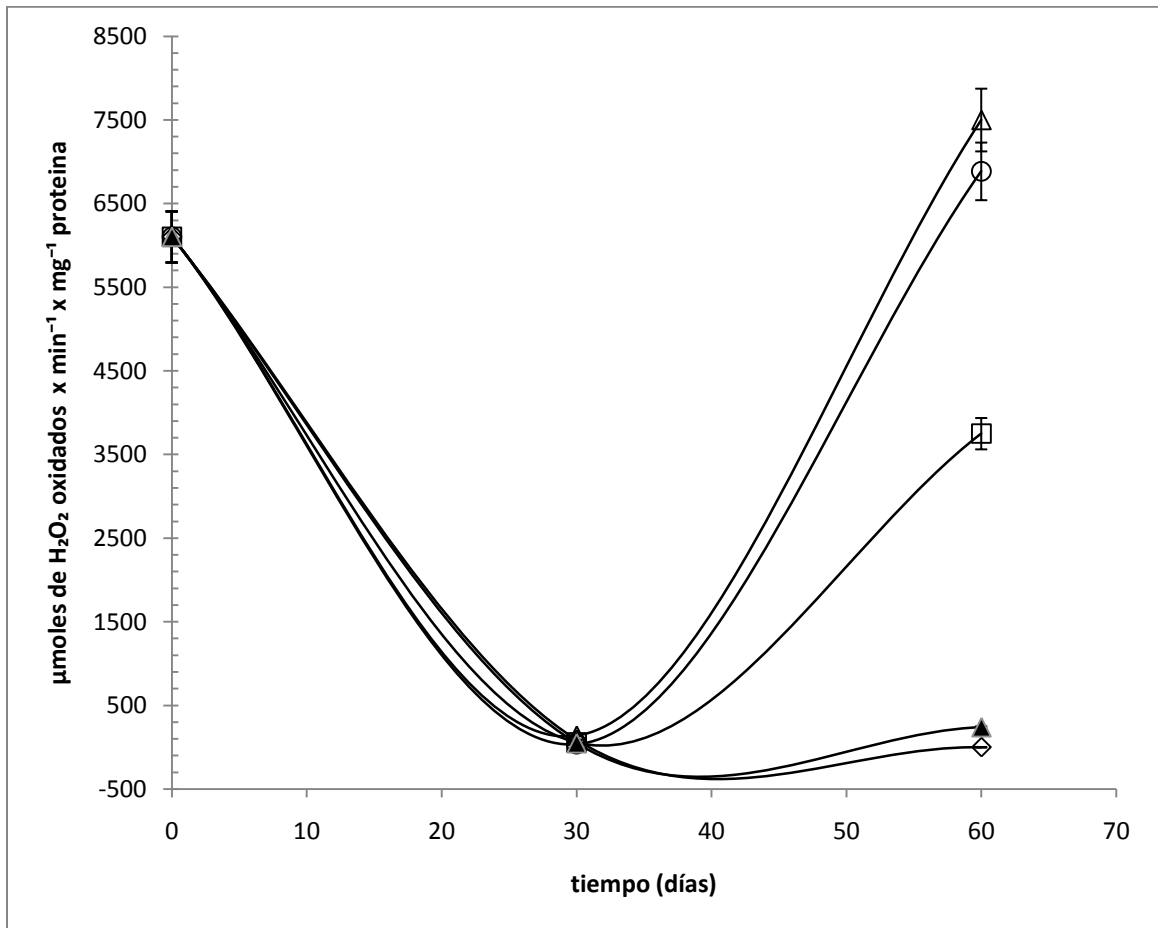


FIGURA 22 Efecto de la adición de enmienda y presencia de elementos traza en la actividad de catalasa en raíz de *Simarouba glauca* para T1 (△), T2 (□), T3 (○), T4 (◇) y Control (▲). Los valores representan la media de tres repeticiones. Las barras indican desviación estándar.

El rol de las peroxidadasas como enzimas relacionadas con el estrés en plantas, ha sido ampliamente aceptado como la actividad que puede usarse como un potencial biomarcador para concentraciones sub-letales de metales (Shah *et al.*, 2001). Dentro del espectro de las peroxidadasas la POD ha sido descrita como la principal enzima encargada de trabajar contra el incremento y toxicidad de H₂O₂ en apoplasto (Liu *et al.*, 2009).

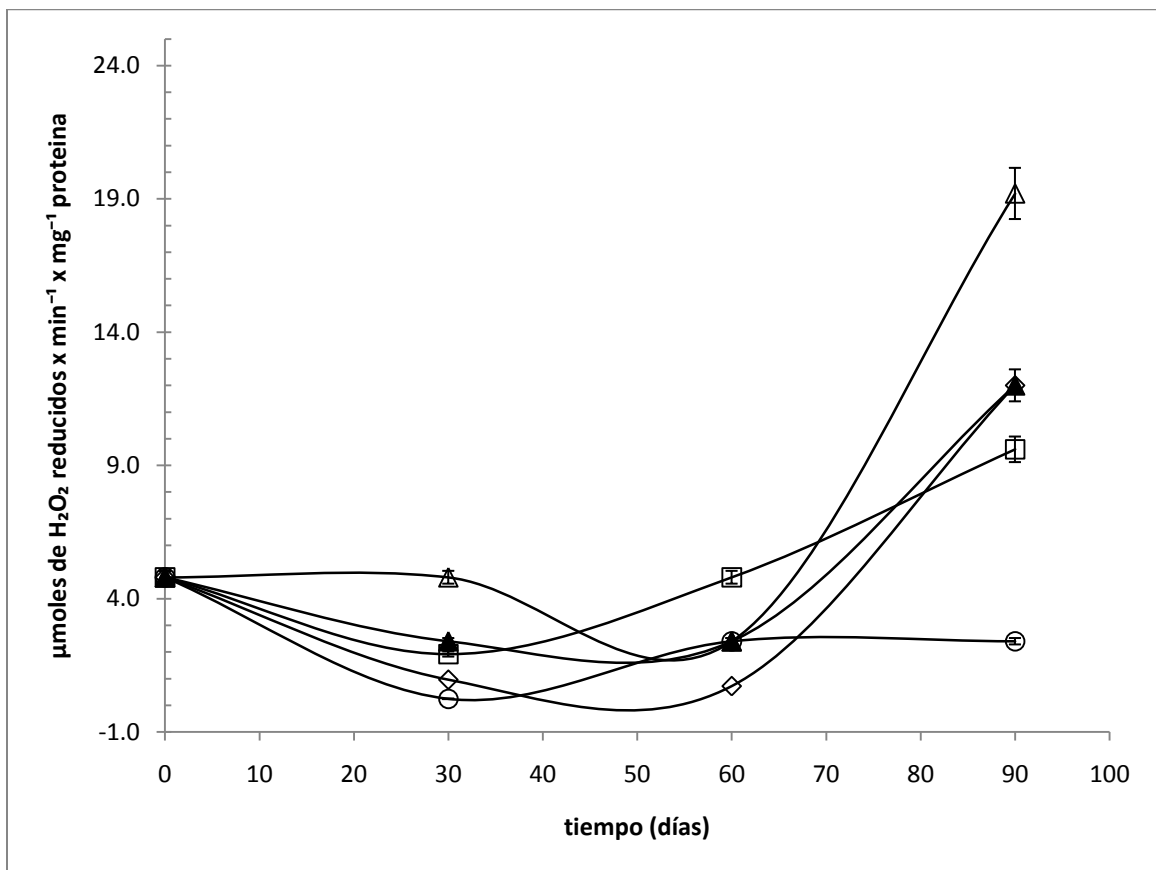


FIGURA 23 Efecto de la adición de enmienda y presencia de elementos traza en la actividad de guayacol peroxidasa en hojas de *Simarouba glauca* para T1 (Δ), T2 (□), T3 (○), T4 (◇) y Control (▲). Los valores representan la media de tres repeticiones. Las barras indican desviación estándar.

Nuestro experimento mostro un incremento de actividad de POD del 300% en hojas de T1 a los 90 días, lo cual nos confirma lo discutido por Shah *et al.*, (2001) sobre los incrementos en actividad de POD bajo concentraciones tóxicas de Cu, Pb, Zn y Cd; que en el caso de T1 tuvo las mayores concentraciones (sección 6.2.1) para estos

elementos traza sin llegar a niveles fitotóxicos, por lo que podríamos estar visualizando un efecto sinérgico, atribuyéndolo principalmente al Pb. En el caso del control se podría estar observando el efecto de bio-indicador por Pb en hojas. La inhibición encontrada en T3 (50%) no puede ser adjudicada a un efecto en especial, pero si podría relacionarse con la presencia de As en las raíces de la planta, considerando que es la zona donde se llevan los procesos de absorción - adsorción de manera más intensa para el As. Las diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas.

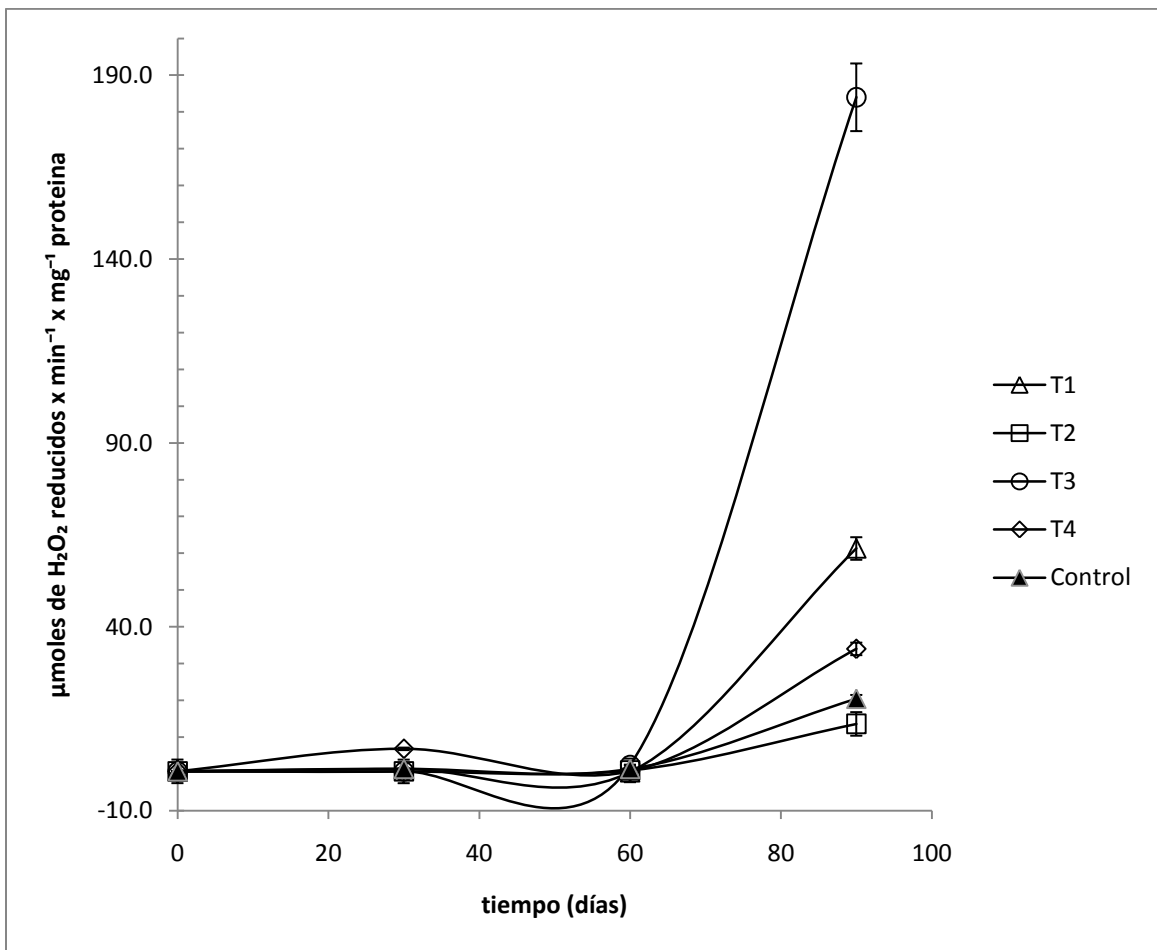


FIGURA 24 Efecto de la adición de enmienda y presencia de elementos traza en la actividad de guayacol peroxidasa en raíz de *Simarouba glauca* para T1 (△), T2 (□), T3 (○), T4 (◇) y Control (▲). Los valores representan la media de tres repeticiones. Las barras indican desviación estándar.

En raíz de *Simarouba glauca* los mayores incrementos fueron para T3 y T1 (> 500%), efecto que se puede relacionar con las concentraciones de Pb encontradas

en T1 y T3, además de un efecto adicional por la presencia de As en esos mismo tratamientos que aunque no se encontró en niveles normales de concentración en plantas, hubo translocación al tallo en el caso de T3. Aunque este efecto se contradice a lo encontrado por Sinha *et al.*, (2010) referente al poco incremento que ocasiona el As en la actividad de POD. Tanto en hojas como en raíz los incrementos en la actividad de POD se presentaron a partir del día 60 de nuestro experimento, encontrando diferencias estadísticamente significativas del tiempo final con respecto al día 30 ($p < 0.05$) y 60 ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES

- ✓ La adición de enmienda biológica (compost de biosólido) en el suelo de Natividad, significó una mejora en el contenido de materia orgánica (12-15% incremento), β -glucosidasa (descomposición de MO) y CIC (incremento hasta de 9 veces).
- ✓ Los cambios mostrados en pH no produjeron incrementos en la biodisponibilidad de todos los elementos traza; aunque representaron efectos benéficos al reducir la movilidad de Cu, Zn, Pb y As.
- ✓ *Simarouba glauca* es una especie capaz de tolerar concentraciones pseudo-totales en el intervalo de fitotoxicidad de Pb y Zn bajo las condiciones estudiadas.
- ✓ No debe considerarse *Simarouba glauca* una especie acumuladora, a pesar de los resultados obtenidos en el factor de bioacumulación (BAF); ya que esto solo es cierto a concentraciones por debajo del intervalo fitotóxico.
- ✓ Con el seguimiento a la actividad enzimática del sistema antioxidante de la planta podemos afirmar que *Simarouba glauca* realiza una acumulación preferencial de elementos traza en raíz, y pudiera tratarse de una especie estabilizadora.
- ✓ En los elementos traza analizados en suelo se pudo determinar que los valores base del suelo de Natividad no presentan concentraciones por encima de la normativa vigente.
- ✓ Los metales Cd y Ni no presentaron reducción de movilidad, por lo tanto pueden ser un potencial riesgo de contaminación en suelo y principalmente en aguas superficiales.
- ✓ En las condiciones estudiadas la hipótesis pudo comprobarse como cierta para favorecer mecanismos de fitoestabilización.
- ✓ La activación del sistema antioxidante y su función como biomarcador ante concentraciones fitotóxicas de elementos traza permitió validar la hipótesis planteada.

RECOMENDACIONES

El uso de compost de biosólido en esta investigación es un antecedente, para determinar dosis adecuadas que permitan seguir contribuyendo a la mejora de las propiedades fisicoquímicas, pero además encontrar cantidades viables de aplicación en campo que permitan el incremento en la movilidad de elementos traza a tasas que no representen un riesgo para la lixiviación y si favorezca las labores de fitorremediación.

Asimismo resultará importante escalar el experimento a plantas de mayor edad y en sitios abiertos donde intervienen de manera importante fenómenos de flujo de agua.

Los casos de Zn, Cu y Ni, deben estudiarse desde el punto de vista metabólico de *Simarouba glauca* debido a que son elementos traza necesarios para las plantas superiores y a pesar de que las concentraciones presentadas no significaron una afectación a los niveles de clorofila, si presentaron efectiva translocación en la planta.

Las concentraciones de Pb por arriba del intervalo normal, motivan a realizar ensayos con concentraciones dentro del intervalo de fitotoxicidad para discutir la clasificación de *Simarouba glauca* como planta acumuladora de acuerdo al factor de bioacumulación planteado por Ma *et al.*, (2001).

BIBLIOGRAFÍA

- Adriano, D. C. (2001). *Trace elements in the terrestrial environment biochemistry, bioavailability and risk of metals*. (2 ed) New York: Springer -Verlag.
- Alfort, E.R., Pilon-Smits, E.A.H., y Paschke, M.W. (2010). Metallophytes a view from the rhizosphere. *Plant Soil*, 337, 33-50.
- Alva, A., Huang, B., y Paramasivam, S. (2000). Soil pH affects copper fractionation and phytotoxicity. *Soil Science Society of America Journal*, 64, 955-962.
- APHA (American Public Health Association). (1989). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. (17 ed) Washington, USA: APHA.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24 (1), 1 - 15.
- Badiani, M., De Biasi, M., y Felici, M. (1990). Soluble peroxidase from winter wheat seedlings with penoxidase-like activity. *Plant Physiology*, 92, 489 - 494.
- Baker, A. (1981). Accumulators and Excluders - Strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, 3, 643 - 654.
- Baker, A. J., McGrath, S., Reeves, R. D., y Smith, J. (2000). Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. En N. Terry, *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Boca Raton: eds 2000 Lewis Publishers.
- Baker, A., Reeves, R., McGrath, S., y Sidoli, C. (1994). The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resources, Conservation and Recycling*, 11, 41-49.
- Barceló, J., y Poschenrieder, C. (2003). Phytoremediation: principles and perspectives. *Contributions to Science*, 2 (3), 333-344.
- Bautista, A., Etchevers Barra, J., Del Castillo, R., y Carmen, G. (2004). La calidad del suelo y sus indicadores. *Ecosistemas, revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*, 13 (2), 90-97.
- Becerril, J., Barrutia, O., García Plazaola, J., A, H., J.M., O., y C, G. (2007). Especies nativas de suelos contaminados por metales: Aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. *Ecosistemas, revista científica de ecología y medio ambiente*, 16 (2), 1-6.
- Behemer, S., Lloyd, C., Raubenheimer, D., Stewart-Clark, J., Knight, J., Leighton, R., y otros. (2005). Metal hyperaccumulation in plants: mechanisms of defence against insect herbivores. *functional Ecology*, 19, 55-66.
- Black, C. (1965). *Methods of Soil Analysis Chemical and Microbiological Properties. Agronomy No 9*. Wisconsin, U.S.A.: American Society of Agronomy,.
- Bowen, H. J. (1979). *Environmental Chemistry of the elements*. London: Academic Press.

Brady, N. C. (2001). *The Nature and properties of soils* (13 ed.). New York: MacMillan Publishing.

Brooks, R. R. (1998). Plants that hyperaccumulate heavy metals. En M. E. Farago, y R. R. Brooks, *Plants and the Chemical Elements: Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity* (1 ed., págs. 88-102). Palmerston North, Nueva Zelanda: John Wiley & sons.

Cabrera, F., Luis, C., Díaz-Barrientos, E., Rafael, L., y Manuel, M. J. (1999). Heavy metal pollution of soils affected by the Guadiamar toxic flood. *The Science of the total environment*, 242, 117-129.

Cala, V. (1998). Comportamiento de metales pesados en suelos. *Terceras Jornadas sobre suelos contaminados*, 1, págs. 57-78. Madrid.

Chaparro DB, A., Orozco de Amézquita, M., y Cogua S., J. (2002). *Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá*. Consultado en 2010, de Curso de fisiología vegetal: http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000051/docs_curso/descripcion.html

Chaulya, S., Singh, R., Chakraborty, M., y Srivastava, B. (2000). Quantification of stability improvement of a dump through biological reclamation. *Geotechnical and Geological Engineering*, 18, 193-207.

Chen, J., Zhu, C., Li, L.-P., Sun, Z.-y., y Pan, X.-b. (2007). Effects of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress. *Journal of Environmental Sciences*, 19, 44-49.

Conesa, H., Faz, Á., y Arnaldos, R. (2007). Initial studies for the phytostabilization of a mine tailing from the Cartagena-La Union mining district (SE Spain). *Chemosphere*, 66, 38-44.

Davies, B. (1980). Applied Soil Trace Elements. En B. Davies, *Trace element pollution* (págs. 287-351). (Ed Davies) Chichester: John Wiley & sons Ltd.

Doran, J., y Parkin, T. (1994). Defining and assessing soil quality. En J. Doran, D. Coleman, D. Bezdick, B. Stewart, y S., *Defining soil quality for a sustainable environment* Soil Science Society of America Special publication (Vol. 35, págs. 3-21). Wisconsin.

Environmental Protection Agency. (Diciembre de 1996). *Acid Digestion of Sediments, Sludges and Soils, method 3050B*. Consultado en septiembre de 2008, de Environmental Protection Agency: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf>

Environmental Protection Agency. (Diciembre de 1996). *Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (Method 6010B)*. Consultado en septiembre de 2008, de Environmental Protection Agency: <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/resources.htm>

Facchinelli, A., Sacchi, E., y Mallen, L. (2001). Multivariate statistical and GIS-based approach to identify heavy metal sources in soils. *Environmental Pollution*, 114, 313-324.

Gonzalez, R., y Gonzalez-Chavéz, M. (2006). Metal accumulation in wild plants surrounding mining wastes: soil and sediment remediation. *Environmental Pollution*, 144 (1), 84-92.

Gregorich, E.G., Carter, M.R., Angers, D.A., Monreal, C.M., y Ellert, B.H. (1994). Towards a minimum data set to assess soil organic matter quality in agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 74, 367-385.

Guacaneme, S., y Barrera Cataño, J. (2007). Efecto de la aplicación de biosólidos, como enmienda orgánica, en la recuperación de un suelo disturbado por actividad extractiva en la cantera de Soratama, Usaquén Bogotá. *Universitas Scientiarum*, 12 (2), 85-98.

Hargreaves, J., Adl, M., y Warman, P. (2008). A review of the use of composted municipal solid waste in agriculture. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 123, 1-14.

Hernández, A., (2011). *Determinación de metales pesados en suelos de Natividad, Ixtlan de Juárez, Oaxaca*. Tesis licenciatura, Universidad de la Sierra Juárez, Ixtlán de Juárez, Oaxaca.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2011). *La minería en México 2010*. Aguascalientes: INEGI.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (1980). *www.inegi.gob.mx*. Consultado en marzo de 2008, de <http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia>

Juwarkar, A., y Jambhulkar, H. (2007). Phytoremediation of coal mine spoil dump trough integrated biotechnological approach. *Bioresource Technology*, 99 (11), 4732-4741.

Kabata-Pendias, A., y Henryk, P. (2001). *Trace Elements in Soils and Plants* (3 ed.). CRC PRESS.

Kalir, A., Omri, G., y Poljakoff-Mayber, A. (1984). Peroxidase and catalase activity in leaves of *Halimione portulacoides* exposed to salinity. *Physiology Plant*, 62 (2) 238-244.

Kiely, G. (1999). *Ingeniería ambiental: Fundamentos, entornos, tecnología y sistemas de gestión*. (1 ed) Mc Graw-Hill.

Kim, K.-R., y Owens, G. (2010). Potential for enhanced phytoremediation of landfills using biosolids - a review. *Journal of Environmental Management*, 91 (4), 791-797.

Krämer, U., Cotter-Howells, J., Charnock, J., Baker, A., y Smith, J. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379, 635-638.

Kumar, G., Yadav, S., Thawle, P., Singh, S., y Juwarkar, A. (2007). Growth of *Jatropha curcas* on heavy metal contaminated soil amended with industrial wastes and *Azotobacter*. *Bioresource Technology*, 99, 2078-2082.

Lasat, M. M. (2002). Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *Journal Environmental Quality*, 31 (1), 109-120.

Liu, H., Tian, Y., Zheng, T., Yan, C., y Hong, H. (2008). Studies of glucosidase activities from surface sediments in mangrove swamp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 367, 111-117.

- Liu, Z.-J., Zhang, X.-L., Bai, J.-G., Suo, B.-X., Xu, P.-L., y Wang, L. (2009). Exogenous paraquat changes antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. *Scientia Horticulturae* , 121, 138-143.
- Lombi, E., F.J., Z., S.J., D., y S.P., M. (2001). Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: natural hiperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *Journal of Environmental Quality* , 30 (6), 1919-1926.
- Lowry, O. H., Rosebrogh, N. J., Farn, A. I., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with polyphenol reagent. *Journal Bio. chem.* , 193, 265 - 275.
- Madejón, E., Madejón, P., Burgos, P., Pérez de Mora, A., y Cabrera, F. (2009). Trace elements, pH and organic matter evolution in contaminated soils under assisted natural remediation: A 4-year field study. *Journal of Hazardous Materials* , 162, 931-938.
- Madejón, E., Pérez de Mora, A., Felipe, E., Burgos, P., y Cabrera, F. (2006). Soil amendments reduce trace element solubility in a contaminated soil and allow regrowth of natural vegetation. *Environmental Pollution* , 139 (1), 40-52.
- Madejón, P., y Murillo, J. M. (2004). Respuesta de acebuche y encina a la aplicación de una enmienda fúlvica en suelos contaminados por elementos traza. *Investigaciones agrarias* , 13 (3), 539-549.
- Madejon, P., Murillo, J., Marañón, T., Cabrera, F., y López, R. (2002). Bioaccumulation of As, Cd, Cu, Fe and Pb in wild grasses affected by the Aznalcóllar mine spill (SW Spain). *The science of the total environment* , 290 (1-3), 105-120.
- Martens, N. S., y Boyd S, R. (1994). The ecological significance of nickel hyperaccumulation: a plant chemical defense. *Oecologia* , 98 (3-4), 379-384.
- McLaughlin, M., Hamon, R., McLaren, R., y Speir, T. (2000). Review: A bioavailability-based rationale for controlling metal and metalloid contamination of agricultural land in Australia. *Australian Journal of Soil Research* , 38 (6), 1037 - 1086.
- McLean, J. E., y Bert Bledsoe, B. E. (1992). *Behavior of Metals in Soils*. United States Environmental Protection Agency, Special report, Research Laboratory. Ada, Oklahoma: Environmental Protection Agency.
- Mendez, M., y Maier, R. (2008). Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. *Reviews in environmental science and biotechnology* , 7 (1), 47-59.
- Morales-Chávez, P., (2010). *Efecto de Lodos urbanos y serradela amarilla (Ornithopus Compressus L.) sobre la calidad de un alfisol degradado*. Tesis de Maestría , Universidad de Concepción, facultad de agronomía, Concepción-Chile.
- Mulligan, C., Yong, R., y Gibbs, B. (2001). Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology* , 60 (1-4), 193 -207.
- Museum national d'Histoire Naturelle. (1811). *Annales du museum d'histoire naturelle tome 17*. Paris: Biodiversity Heritage Library.

- Navas, M., Benito, M., y Masaguer, A. (2009). Evaluation of biochemical parameters in a calcareous skeletal Cambisol under different ground uses. *Agronomía Tropical* , 59 (2), 219-225.
- Pérez-Buceta, Z., (2012). *Evaluación de suelos salino-sódicos mediante bioensayos y aplicación de mejoradores para la producción agrícola*. Tesis de Maestría, Universidad del Mar, Pochutla, Oaxaca.
- Pérez-de-Mora, A., Madejón, E., Burgos, P., y Cabrera, F. (2006). Trace element availability and plant growth in a mine-spill contaminated soil under assisted natural remediation I. *Soils. Science of the Total Environment* , 363 (1-3), 28-37.
- Pilon-Smits, E. (2005). *Phytoremediation*. Annual Review Plant Biology , Colorado State University, Biology, Fort Collins.
- Porta, J., López-acevedo, M., y Carlos, R. (2003). *Edafología para la agricultura y el medio ambiente* (3 ed.). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Presidencia municipal Natividad. (2011). *Plan municipal de desarrollo Natividad, Ixtlán, Oaxaca (2011-2013)*. Natividad, Oaxaca: Secretaría de Finanzas Oaxaca.
- Quartacci, M., Argilla, A., A.J.M., B., y Navari-Izzo, F. (2005). Phytoextraction of metals from multiply contaminated soil by Indian mustard. *Chemosphere* , 63 (6), 918-925.
- Sánchez, N., Matos Viñales, A., y Ciro, M. (2003). Prueba de especies forestales en áreas devastadas por la minería a cielo abierto en Holguín. *Agroecología* , 30 (1), 80-83.
- Schmidt, U. (2003). Enhancing phytoextraction: the effect of chemical soil manipulation on mobility, plant accumulation, and leaching of heavy metals. *Journal Environmental Quality* , 32 (6), 1939-1954.
- SEMARNAT. (2000). *Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio muestreo y análisis NOM-021-SEMARNAT-2000*. Normativo (Protección Ambiental) , México D.F.
- SEMARNAT. (2002). *Lodos y biosólidos, especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final NOM-004-SEMARNAT*. Normativo (Protección Ambiental) , México, D.F.
- Servicio Geológico Mexicano. (2012). *Anuario estadístico de la Minería Mexicana Ampliada 2011*. Pachuca, Hidalgo: Servicio geológico mexicano.
- Shah, K., Kumar, R., Verma, S., y Dubey, R. (2001). Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science* , 161, 1135 - 1144.
- Sinha, S., G, S., R. K., M., y Shekhar, M. (2010). Metal accumulation, growth, antioxidants and oil yield of Brassica juncea L. exposed to different metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* , 73, 1352-1361.
- Sposito, G. (2008). *The Chemistry of soils* (2 ed.). New York: Oxford University Press.

Tabatabai, M. (1982). Chemical and Microbiological Properties. En A. Miller, y D. R. Keeney, *Methods of Soil Analysis Part. 2 Chemical and microbiological properties*. Agronomy, No.9, American Society of Agronomy ASA, Soil Science Society of America SSSA.

United States Department of Agriculture. (2001). *Guidelines for soil quality assessment in conservation planning*. Soil Quality Institute, Natural Resources Conservation Service. Washington D.C.: USDA United States Department of Agriculture.

Vamerali, T., Bandiera, M., Coletto, L., Zanetti, F., Dickinson, N., y Mosca, G. (2009). Phytoremediation trials on metal - and arsenic - contaminated pyrite wastes (Torviscosa, Italy). *Environmental Pollution*, 157 (3), 887-894.

Vangronsveld, J., Herzing, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., y otros. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science Pollution Research*, 16, 765-794.

Vazquez, S., Goldsbrough, P., y Carpena, R. (2006). Assessing the relative contributions of phytochelatin and cell wall to cadmium resistance in white lupin. *Physiologia Plantarum*, 128 (3), 487-495.

Vivanco, J., Bojórquez, J., Murray, R., Hernández, A., y Flores, F. (2010). Características de los principales suelos de la cuenca del Río Molola, Nayarit, México. *Cultivos Tropicales*, 31 (1), 32-40.

Walkley, A., y Black, I. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining organic carbon in soils: Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. *Soil Science*, 37 (1), 251 - 263.

Wenger, K. (2000). *Ligand-assisted phytoextraction of heavy metals from contaminated soils using common crop plants*. Tesis Doctoral, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zürich, Suiza.

Wong, M. (2003). Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, 50, 775-780.

Yan-Ming, Z., Chao-Yang, W., y Lin-Sheng, Y. (2010). Rehabilitation of a tailing dam at Shimen County, Hunan Province: Effectiveness. *Acta Ecologica Sinica*, 30 (3), 178-183.

Zuñiga, F., Durán, M. d., y Lozano, R. (2000). Cambios químicos en el suelo por aplicación de materia orgánica soluble tipo vinazas. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 16 (3), 89 - 101.