

BIODISPONIBILIDAD DE METALES EN SUELOS DE MINA: CAMBIOS INDUCIDOS POR EL CRECIMIENTO DE *alyssum serpyllifolium* ssp. *Lusitanicum*

P. S. KIDD y C. MONTERROSO

Departamento de Edafología e Química Agrícola, Facultade de Bioloxía, Universidade de Santiago de Compostela, 15782. edcarmel@lugo.usc.es.

Abstract. The efficiency of *Alyssum serpyllifolium* ssp. *lusitanicum* (Brassicaceae), a Ni-hyperaccumulator that grows in the Tras-os-Montes region of NE Portugal on serpentine soil, for use in phytoextraction of polymetallic contaminated soils was evaluated. Here we assess changes in the bioavailability of Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn, and the ability of *A. serpyllifolium* to access different soil metal pools. *Alyssum serpyllifolium* was grown on two mine-spoil soils (MS1 and MS2). The MS1 soil is contaminated with Cr ($283 \mu\text{g g}^{-1}$) and has slightly elevated background concentrations ($25\text{-}100 \mu\text{g g}^{-1}$) of the metals Ni, Zn and Pb, while the MS2 soil is moderately contaminated with Cr ($263 \mu\text{g g}^{-1}$), Cu ($264 \mu\text{g g}^{-1}$), Pb ($1433 \mu\text{g g}^{-1}$) and Zn ($377 \mu\text{g g}^{-1}$). Mine-soils were limed to about $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} 6.0$ with calcium carbonate (MS1/Ca and MS2/Ca) or limed and amended with NPK fertilisers (MS1/NPK and MS2/NPK). Mine-soils that were not amended were lethal to *A. serpyllifolium*, plants died within 2-3 days. Biomass was reduced on MS2/Ca due to phytotoxic effects of Cu, and plants did not grow on MS2/NPK soil. In contrast, amendment with NPK fertilisers increased plant biomass by about 10-fold on MS1/NPK. However, in the same soil root dry weight was reduced by about 7-fold compared with MS1/Ca. *Alyssum serpyllifolium* accumulated Mn, Ni and Zn in its aerial parts ($\text{shoot}_{[\text{metal}]}/\text{root}_{[\text{metal}]} > 1$) and both metal content and transportation were generally greater in MS2 than MS1. However, metal yields were significantly increased in plants grown on MS1/NPK, due to the increment in biomass. After plant growth, concentrations of EDTA-, NH_4Cl - and Mehlich 3 (M3)-extractable metals were generally lower. However, concentrations of extractable Mn and Zn were frequently greater after growth. Concentrations of M3-extractable Cr, Ni, Pb and Zn were often significantly increased in rhizosphere soils. In addition, sequential (BCR) extractions suggested that *A. serpyllifolium* could potentially mobilise metals from soil pools normally considered to be non plant-available, and provided that these metals are then absorbed by the plant this would increase total metal extraction. These results suggest that *A. serpyllifolium* could be suitable for phytoextraction uses in polymetallic-contaminated soils, and especially where the contaminants are Mn, Ni and Zn. However, its small biomass production, even on NPK fertilised mine-spoil soils, continues to be a major limiting factor for its use in phytoextraction.

Keywords: *Alyssum serpyllifolium*, metal bioavailability, mine-soils, phytoextraction, sequential extractions.

Resumen. Se evalúa la eficiencia de *Serpyllifolium* ssp. *Lusitanicum* (Brassicaceae), un hiperacumulador de Ni que crece en los suelos serpentínicos de la región de Tras Os Montes (NE Portugal), para su uso en fitoextracción de metales en suelos de mina. Para ello se hizo un ensayo de invernadero con *Alyssum serpyllifolium* y dos suelos de mina (SM1 y SM2). Se estudió la capacidad de esta espe-

cie para acceder a diferentes fracciones metálicas del suelo, así como los cambios que inducía sobre la biodisponibilidad de Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb y Zn. El suelo SM1 estaba contaminado con Cr ($283 \mu\text{g g}^{-1}$) y tenía concentraciones ligeramente elevadas ($25\text{-}100 \mu\text{g g}^{-1}$) de Ni, Zn y Pb; el suelo SM2 estaba moderadamente contaminado en Cr ($263 \mu\text{g g}^{-1}$), Cu ($264 \mu\text{g g}^{-1}$), Pb ($1433 \mu\text{g g}^{-1}$) y Zn ($377 \mu\text{g g}^{-1}$). Los suelos fueron encalados hasta pH 6.0 con carbonato cálcico (SM1/Ca y SM2/Ca) o encalados y fertilizados con NPK (SM1/ NPK y SM2/ NPK). Los suelos sin enmienda fueron letales para *A. serpyllifolium*, las plantas se morían en 2 o 3 días. En los sustratos SM2/Ca había una reducción de la biomasa debido al efecto fitotóxico del Cu y las plantas no crecieron en SM2/NPK. Por el contrario, la fertilización con NPK hizo aumentar en torno a 10 veces la biomasa en MS1/NPK. Sin embargo en el mismo suelo, el peso seco de raíz era 7 veces menor que el de SM1/Ca. *Alyssum serpyllifolium* acumulaba Mn, Ni y Zn en sus partes aéreas ($[\text{metal}]_{\text{hoja}}/[\text{metal}]_{\text{raíz}} > 1$) y, tanto la concentración de metales, como su transporte eran generalmente mayores en SM2 que en SM1. Sin embargo, las cantidades totales de metales extraídos (rendimientos metálicos) eran significativamente mayores en las plantas desarrolladas en MS1/NPK, debido al aumento de la biomasa. Generalmente, la concentración de los metales del suelo extraídos con EDTA, NH_4Cl y Mehlich 3(M3) era más baja después del crecimiento de las plantas, aunque frecuentemente ocurría lo contrario para Mn y Zn. Las concentraciones de Cr, Ni, Pb y Zn aumentaban significativamente en el suelo de la rizosfera. Además, las extracciones secuenciales (BCR) sugerían que *A. serpyllifolium* podría movilizar los metales de las fracciones consideradas no disponibles, permitiendo su absorción por la planta, lo que haría aumentar la extracción total de los metales. Esto sugiere que *A. serpyllifolium* podría ser adecuada para fitoextracción en suelos contaminados con varios metales, especialmente donde los contaminantes son Mn, Ni y Zn. No obstante, su escasa producción de biomasa, incluso en los suelos de mine fertilizados, continúa siendo el principal factor limitante para su uso en fitoextracción.

Palabras clave. *Alyssum serpyllifolium*, biodisponibilidad de metales, suelos de mina, fitoextracción, extracciones secuenciales.

INTRODUCCIÓN

El uso de plantas hiperacumuladoras de metales para la limpieza de suelos contaminados es una de las principales estrategias de fitoextracción que actualmente se están desarrollando (fitoextracción natural, Lombi *et al.*, 2001). Las plantas hiperacumuladoras tienen la capacidad de absorber y translocar a sus hojas grandes cantidades de metales, alcanzando concentraciones de más de 1000 mg kg^{-1} de metal en hoja de Co, Cu, Ni o Pb, o más de 10000 mg kg^{-1} de Zn y Mn (Baker *et al.*, 2000). La fitoextracción viene determinada por numerosos factores, como resistencia de la planta a los metales, proliferación radicular, etc, y su eficiencia puede ser calculado por el producto de una ecuación simple: (biomasa x concentración del elemento en la biomasa) (McGrath *et al.*, 2002). La principal limitación de la fitoex-

tracción natural es que la hiperacumulación de metales no es un fenómeno común en las plantas superiores terrestres; estas plantas son relativamente raras y frecuentemente se encuentran en áreas geográficas remotas. Además, los tamaños de las poblaciones de estas plantas suelen ser extremadamente pequeñas y la mayoría de las plantas hiperacumuladoras de Europa tienen escasa biomasa y crecimiento lento (Baker *et al.*, 2000). El aumento de la concentración metálica en la biomasa vegetal aérea y la optimización de la producción por medio de técnicas agrícolas (como fertilización, ajuste del pH, adición de acondicionadores del suelo,...) podría ser, por tanto, una combinación clave en el desarrollo último de esta técnica. En algunos estudios se ha evaluado el uso de fertilizantes para el incremento de la producción vegetal (Chiarucci *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1997; Bennett *et al.*, 1998). Robinson *et al.*, 1997

consiguieron un incremento del 300% en la biomasa de *Alyssum bertolinii* en 12 meses con fertilización nitrogenada. Sin embargo, con el aumento de la biomasa se producía un ligero, pero significativo, descenso de la absorción de Ni.

Aunque las plantas hiperacumuladoras tienen una extraordinaria capacidad de absorber metales, su eficiencia puede ser reducida significativamente por la baja biodisponibilidad de los metales en los suelos contaminados (Knight *et al.*, 1997). El equilibrio dinámico que se establece entre las principales fracciones metálicas del suelo (cambiable, orgánica, óxidos de hierro y manganeso y estructuras minerales) determina la disponibilidad de metales a la planta. Además, la planta puede modificar las condiciones de la rizosfera a través de procesos como la producción de exudados radiculares o la alteración del pH, favoreciendo la liberación de formas metálicas no lábiles (Adamo *et al.*, 2002; Adriano, 2001; Morel, 1997). Existe un escaso conocimiento del efecto de la absorción de las plantas hiperacumuladoras sobre las fracciones de metales pesados del suelo y aún es tema de debate si estas plantas tienen acceso a las mismas o distintas fracciones metálicas que las plantas no hiperacumuladoras. Son escasos los estudios que abordan la relación entre la extracción de metales por plantas hiperacumuladoras y la localización de los metales en el suelo.

Thlaspi caerulescens es una de las especies más estudiadas para propuestas de fitoextracción de metales (Brown *et al.*, 1994; Lasat, 1996; Knight *et al.*, 1997; McGrath, 1997; Baker y Whiting, 2002). En este trabajo nosotros evaluamos el uso potencial de otra planta hiperacumuladora, *Alyssum serpyllifolium ssp. Lusitanicum* (Brassicaceae), una de las tres subespecies ibéricas de *Alyssum serpyllifolium*. Menezes de Sequeira (1969) fue el primero en citar la hiperacumulación de Ni en *Alyssum serpyllifolium ssp. Lusitanicum*. Brooks y Radford (1978) obtuvieron una

concentración media de 5860 μ Ni g⁻¹, con un intervalo entre 1949 y 9000 μ g⁻¹. Estos valores son concordantes con los de Diez *et al.* (2002), quienes obtuvieron un valor medio de 6652 μ g⁻¹ de Ni, con un intervalo de 5850-7440 μ g⁻¹.

El presente estudio se planteó con los objetivos de: i) determinar los cambios en la biodisponibilidad y el fraccionamiento de Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb y Zn inducidos en el suelo tras el crecimiento de *Alyssum serpyllifolium ssp. Lusitanicum* y ii) evaluar la capacidad de esta planta para acceder a las fracciones metálicas no biodisponibles. Para ello se realizó un ensayo de maceta con plantas de *A. serpyllifolium* procedentes de la región de Tras Os Montes (NE Portugal) y dos suelos de mina con diferentes niveles de contaminación metálica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Recolección del material vegetal

En julio de 2002 se recolectaron semillas de *Alyssum serpyllifolium ssp. Lusitanicum* Dudley y P.Silva (*A. serpyllifolium* a partir de ahora) a partir de plantas que crecían en suelos serpentínicos de la región de Tras Os Montes en el NE de Portugal (Samil; 41° 47' N 6° 45' W). Las áreas serpentínicas del NE de Portugal ocupan sobre 80 km² (entre las latitudes 45° 25' y 41° 54' N) y el clima de la zona es Mediterráneo, oscilando entre Mediterráneo húmedo y variantes más áridas (Menezes de Sequeira y Pinto da Silva, 1992). Los suelos (*Litic Udorthents* según Soil Survey Staff, 1999) eran ligeramente ácidos (pH_{H2O} 6.0-6.5), con elevadas concentraciones de metales pesados (especialmente Co, Cr y Ni), una elevada relación Mg/Ca y bajos niveles de P y K disponibles. *Alyssum serpyllifolium*, frecuentemente referido como *Alyssum pintodasilvae* Dudley, es el único hiperacumulador en el NE de Portugal. Esta especie aparece en todas las asociaciones serpentínicas típicas, pero especialmen-

te en *Taeniathero-Alysetum pintodasilvae* (Menezes de Sequeira y Pinto da Silva, 1992).

Ensayos en maceta

Las semillas recogidas se esterilizaron con NaClO al 2,5%, se lavaron con agua desionizada, se sembraron en una mezcla de turba y arena en bandejas y se dejaron crecer durante un mes en invernadero con régimen natural de luz (día:noche).

Los suelos de mina (SM) utilizados proceden de As Pontes (SM1) y La Poderosa (SM2). La mina de As Pontes (43° 27' N 7° 15' W) es una explotación de lignito a cielo abierto, situada al NE de la provincia de A Coruña, que cubre un área aproximada de 12 km². La mayor parte de los estériles de esta mina son sedimentos terciarios, arcillas carbonosas y filitas, con presencia frecuente de pirita. La Poderosa (37° 44' N 6° 39' W) es una antigua explotación de depósitos de sulfuros metálicos, situada en el S de la provincia de Huelva, en la que se han generado estériles con una fuerte contaminación en metales como resultado de las actividades de extracción y procesado.

Las muestras de suelos fueron secadas al aire, homogeneizadas y tamizadas (<5 mm). Cada una de las muestras se repartió entre tres contenedores a los que se aplicaron los siguientes tratamientos: 1) control (sin enmiendas; SM1/Con y SM2/Con); 2) encalado con dosis de caliza agrícola equivalentes a 2000 kg CaCO₃ ha⁻¹ (SM1/Ca) y 15000 kg CaCO₃ ha⁻¹ (SM2/Ca); 3) encalado (igual que en el tratamiento 2) más fertilización con KH₂PO₄ y NH₄NH₃, en dosis equivalentes a 150 kg P ha⁻¹, 200 kg K ha⁻¹ y 100 kg N ha⁻¹ (SM1/NPK y SM2/NPK). Los suelos se mezclaron bien con las enmiendas, se humectaron hasta el 80% de su capacidad de campo y se dejaron durante 4 semanas hasta alcanzar su equilibrio. Los valores de pH en este momento se encontraban entre 6.0 y 6.3 en los tratamientos 2) y 3).

Las plántulas de *A. serpyllifolium*, desarrolladas durante 1 mes en sustrato no contaminado, se trasplantaron a macetas (11 cm de diámetro) rellenas con suelo húmedo (equivalente a 1 kg de suelo seco) procedente de los distintos tratamientos. Se puso una planta por maceta y se hicieron cinco réplicas por tratamiento. Las plantas se dejaron crecer durante 24 semanas en invernadero con régimen natural de luz (noche:día), a temperatura de 15-30° C y riego con agua desionizada sin permitir el lixiviado de las macetas. Se hizo una reposición de las plantas muertas durante las primeras dos semanas, asumiendo que la mortandad se producía como resultado de su manejo. La mortalidad de las plantas sólo se produjo en los suelos SM1/Con, SM2/Con y SM2/NPK.

Análisis de los suelos

Todos los análisis de suelo (fracción < 2 mm) se realizaron en muestras representativas de los suelos iniciales, submuestras de los suelos a tiempo cero del experimento en maceta y después 24 semanas, cuando las plantas fueron cosechadas. Todos los análisis se hicieron en las cinco réplicas. Adicionalmente, tras la cosecha se separó el suelo de la rizosfera de acuerdo con Chung y Zazoski (1994).

Se determinó el pH en H₂O y KCl 0.1N usando una relación suelo:disolución de 1:2,5. Carbono y azufre total se analizaron por combustión con analizador LECO (Modelo SC-144 DR, LECO Corp., St Joseph, MI) y el C orgánico disuelto (COD) fue medido con analizador TOC-5000 (Modelo FLOWSYS, SYSTEAL, Italia) en un extracto de agua obtenido tras agitación de 1 hora de una suspensión con relación suelo:agua de 1:5. Los cationes de cambio se extrajeron con NH₄Cl 1M sin tamponar (Peech et al., 1947) y se determinaron por espectrofotometría de emisión (Na y K) y absorción (Ca, Mg y Al) atómica (Perkin-Elmer 2380, CT). Los H⁺ de cambio se determinaron por titulación

del extracto con NaOH (titulador Crison, Modelo TT2022, Alella, Spain). La capacidad de intercambio catiónico efectiva (CEC) se estimó a partir de la suma de todos los cationes de cambio. El P disponible se obtuvo por extracción con NaHCO_3 y determinación colorimétrica (Olsen y Somers, 1982). La concentración total de Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb y Zn se determinó por espectrofotometría de absorción atómica de llama, y cámara de grafito cuando fue necesario (Perkin-Elmer 4110 ZL Norwalk, CT) tras la digestión ácida ($\text{HNO}_3\text{:HCl:HF}$, 2,7:1:1) de la muestra en horno microondas. Los mismos metales se determinaron en la disolución del suelo obtenida tras la saturación del suelo al 40% con agua desionizada, agitación durante 24 horas y centrifugación a 5000 x g.

La fracción metálica *disponible a plantas* se estimó utilizando tres extracciones simples: NH_4Cl 1M (pH 4,6), reactivo Mehlich 3 (M3) y EDTA 0.05 M (pH 4,6). La composición del reactivo M3 es: NH_4F 0,015 M + NH_4NO_3 0,25 M + CH_3COOH 0,2 M + HNO_3 0,013 M + EDTA 0,001 M (Mehlich, 1984). Las relaciones suelo:extracto utilizados fueron de 1:10 (NH_4Cl y M3) or 1:5 (EDTA). La extracción M3 también se usó para determinar la fracción metálica biodisponible en los suelos de la rizosfera.

Por último se aplicó un esquema de fraccionamiento metálico siguiendo el procedimiento de extracción secuencial BCR propuesto por *Standards, Measurements and Testing Programme (originalmente BCR) of the European Comisión* (Rauret et al., 1999). Primero se hace una extracción (1 g de suelo) con CH_3COOH 0,11 M durante 16 horas; así se extraen las formas solubles, cambiables y ligadas débilmente a materia orgánica y carbonatos (fracción extraíble en ácido). En segundo lugar, se añaden 20 ml de NH_2OH . HCl 0.10 M ajustado a pH 2 con HNO_3 al residuo resultante y se agita 16 horas. En este paso se extraen principalmente las formas ligadas a óxidos de hierro y manganeso (frac-

ción reducible). En el tercer paso se extraen las formas ligadas a materia orgánica y sulfuros (fracción oxidable). Para ello el residuo resultante del paso anterior se ataca el con H_2O_2 30% y se lleva a sequedad, tras lo cual se hace una extracción con NH_4OAC ajustado a pH 5,0 con HOAC durante 16 h para evitar la re-adsorción de los metales extraídos sobre el residuo oxidado. Finalmente, la fracción residual (metales ligados a silicatos) se extrajo usando agua regia (Shuman, 1979). Los metales se analizaron en todos los extractos filtrados por espectrofotometría de absorción atómica con cámara de grafito. Todos los análisis de suelo se realizaron por duplicado.

Acumulación de metales en plantas

Las plantas, recogidas después de 24 semanas de crecimiento, se dividieron en raíz, tallo y hojas, se lavaron, se secaron a 60 °C, se pesaron y molieron. Las muestras vegetales se digirieron con $\text{HNO}_3\text{+HCl}$ y se determinó la concentración de Cd, Co, Cu, Cr, Mn, Ni, Pb y Zn, como antes.

Análisis estadístico

Las diferencias de biomasa vegetal y concentración metálica fueron evaluadas con un análisis ANOVA. Se hizo una transformación logarítmica de los datos, cuando fue necesario, para obtener homogeneidad de la varianza. Para detectar cambios significativos en el suelo antes y después de las 24 semanas de experimento se aplicó el test t de Student.

RESULTADOS

Caracterización de los suelos de mina

En la tabla 1 se recogen las características físico-químicas de los suelos de mina (SM) utilizados para el ensayo. Los dos suelos son fuertemente ácidos, el $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ oscila entre 3,7 y 4,3 y el pH_{KCl} entre 3,3 y 3,4. Sus contenidos en materia orgánica ($\%C < 0,5$),

TABLA 1. Valores medios (\pm error típico) de distintas propiedades de los dos suelos de mina utilizados en este estudio (SM1 y SM2).

	SM1	SM2
pH _{H2O} [†]	3,7 \pm 0,0	4,3 \pm 0,2
pH _{KCl} [‡]	3,3 \pm 0,0	3,4 \pm 0,1
P _{olsen} ($\mu\text{g g}^{-1}$)	9,7 \pm 0,7	1,4 \pm 0,3
C orgánico (%)	0,29 \pm 0,01	0,29 \pm 0,05
S (%)	0,08 \pm 0,01	0,67 \pm 0,01
CIC (cmol _c kg ⁻¹)	3,3 \pm 0,1	7,5 \pm 0,2
Co total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	20,3 \pm 1,1	18,7 \pm 1,3
Cr total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	282,8 \pm 1,1	263,2 \pm 1,5
Cu total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	9,2 \pm 0,2	263,5 \pm 18,4
Mn total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	328,3 \pm 3,7	151,0 \pm 4,9
Ni total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	47,0 \pm 0,7	33,7 \pm 0,7
Pb total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	25,5 \pm 0,2	1433,3 \pm 33,3
Zn total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	93,7 \pm 1,6	376,5 \pm 16,5

[†], suelo : agua 1:2,5; [‡], suelo : KCl 0,1M 1:2,5

capacidad de intercambio catiónico (CEC < 10 cmol_c kg⁻¹) y fósforo disponible (P_{olsen} < 10 $\mu\text{g g}^{-1}$) son considerablemente bajos. Los principales contaminantes metálicos son Cu (264 $\mu\text{g g}^{-1}$ en SM2), Cr (263-283 $\mu\text{g g}^{-1}$ en SM1 y SM2), Pb (1433 $\mu\text{g g}^{-1}$ en SM2) y Zn (377 $\mu\text{g g}^{-1}$ en SM2). Las concentraciones totales de Cr eran similares en los dos suelos, mientras que las concentraciones de Cu, Pb y Zn eran 29, 56 y 4 veces, respectivamente, mayores en el suelo SM2 que en SM1 (Tabla 1). En concordancia, las cantidades de Cu, Pb y Zn extraídos con los reactivos M3, NH₄Cl y, generalmente, EDTA eran significativamente mayores en SM2 que en SM1 (Tabla 2). Igualmente, Cu y Zn en la disolución del suelo eran significativamente mayores en SM2 que en SM1: en SM2 se obtuvieron concentraciones medias de 1200 μM de Cu y 1100 μM de Zn, mientras que en la disolución del suelo de SM1 eran < 5 μM . En el caso de Co, Cr, Cu y Pb, las concentraciones biodisponibles (EDTA, M3 y NH₄Cl) eran similares en los dos suelos. Los reactivos M3 y NH₄Cl extrajeron en el suelo SM2 hasta 4 y 5 veces más Mn y Zn, respectivamente, que el EDTA. Por el contrario, el EDTA extrajo en el suelo SM1 hasta 4 y 9 veces más Mn y

Ni, respectivamente que los otros dos extractantes simples (Tabla 2).

En la figura 1 se presenta el fraccionamiento metálico, obtenido por extracción secuencial, de ambos suelos. En los dos suelos la fase geoquímica mayoritaria de Cr, Mn, Ni, Pb y Zn era la fracción residual, que representaba más del 90% en SM1 y entre el 70 y el 90% del metal total en SM2. En la fracción oxidable se encontraban proporciones importantes (10-30% del total) de Co (SM1), Cu (SM1 y SM2), Mn (SM2) y Zn (SM2). En los dos suelos la fracción extraída en ácido representaba < 5 % del total, con la excepción de Cu (12 % en SM1) y Mn (11 % en SM2).

Producción de biomasa en maceta

Sin enmienda, los dos suelos de mina resultaban letales para *A. serpyllifolium*; las plantas morían a los pocos días de ser transplantadas en los sustratos SM1/Con y SM2/Con. Adicionalmente, *A. serpyllifolium* tampoco sobrevivía en el suelo SM2/NPK, por lo que sólo se presentan los resultados de los tres sustratos restantes: SM1/Ca, SM1/NPK y SM2/Ca. En estos tres casos, el peso seco de hoja oscilaba entre 34 mg y 611

TABLA 2. Valores medios de la concentración de metales ($\mu\text{g g}^{-1}$, \pm error típico) extraídos con los reactivos Mehlich 3 (M3), NH_4Cl y EDTA en los dos suelos de mina utilizados en este estudio (SM1 y SM2).

	SM1	SM2
<i>Extraídos con M3 ($\mu\text{g g}^{-1}$)</i>		
Co	n.d.	n.d.
Cr	$4,0 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,2$
Cu	$0,7 \pm 0,0$	$10,7 \pm 0,2$
Mn	$7,8 \pm 0,2$	$10,1 \pm 0,1$
Ni	$0,3 \pm 0,0$	$0,4 \pm 0,0$
Pb	n.d.	$116,7 \pm 17,6$
Zn	$0,7 \pm 0,0$	$11,3 \pm 0,3$
<i>Extraídos con NH_4Cl ($\mu\text{g g}^{-1}$)</i>		
Co	$0,1 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,0$
Cr	n.d.	n.d.
Cu	$0,5 \pm 0,0$	$2,2 \pm 0,0$
Mn	$3,7 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,2$
Ni	$0,6 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,0$
Pb	$0,1 \pm 0,0$	$55,8 \pm 1,9$
Zn	$0,4 \pm 0,0$	$8,9 \pm 0,1$
<i>Extraídos con EDTA ($\mu\text{g g}^{-1}$)</i>		
Co	$0,7 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,0$
Cr	$0,7 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,0$
Cu	$1,8 \pm 0,5$	$6,5 \pm 0,5$
Mn	$20,9 \pm 6,8$	$2,8 \pm 0,2$
Ni	$1,9 \pm 0,2$	n.d.
Pb	$3,6 \pm 0,1$	$161,3 \pm 10,5$
Zn	$1,4 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,4$

n.d., no detectable: $< 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ de Co, Cr, Pb y $< 0,03 \mu\text{g g}^{-1}$ de Ni

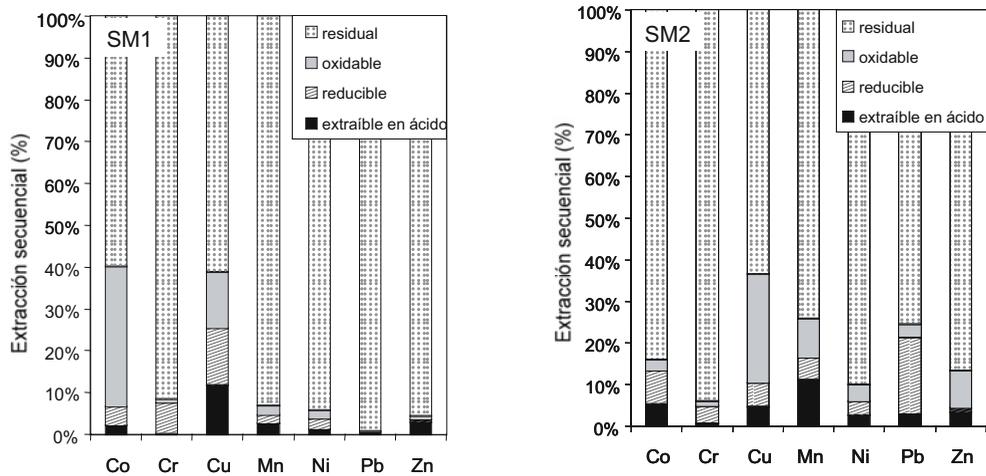


FIGURA 1. Extracción secuencial de metales pesados en los suelos de mina SM1 y SM2

mg por maceta (Tabla 3), siendo las plantas desarrolladas en SM2/Ca las que daban los menores rendimientos. La fertilización con NPK producía un aumento significativo de la biomasa aérea en el suelo (Tabla 3): el peso seco de hoja en las plantas de SM1/NPK era hasta 10 veces mayor que el de las plantas desarrolladas en SM1/Ca ($P < 0.001$). Por el contrario, el crecimiento de las raíces no seguía el mismo patrón; el peso de las raíces SM1/NPK era hasta 7 veces menor que en SM1/Ca ($P < 0.001$). La relación raíz/hoja (en peso seco) de las plantas del sustrato SM1/Ca era 10 veces mayor que en SM1/NPK ($P < 0.001$).

Extracción de metales por *A. serpyllifolium* desarrolladas en los suelos de mina

La concentración total de Mn, Ni y Zn en las hojas de *A. serpyllifolium* descendía de la siguiente forma: SM2/Ca > SM1/Ca > SM1/NPK (Tabla 3). Se encontraron concentraciones de hasta 360 $\mu\text{g Mn g}^{-1}$, 187 $\mu\text{g Ni g}^{-1}$ y

405 $\mu\text{g Zn g}^{-1}$ en ejemplares desarrollados en SM2/Ca. Adicionalmente, *A. serpyllifolium* transportaba de forma efectiva estos metales a sus hojas en los tres sustratos. En las plantas de SM2/Ca se obtuvieron relaciones $\text{Ni}_{\text{HOJA}}/\text{Ni}_{\text{RAIZ}}$ de 13. Esta relación descendía sustancialmente en el suelo SM1 ($\text{Ni}_{\text{HOJA}}/\text{Ni}_{\text{RAIZ}} = 4$ en SM1/Ca), y aún más después de la fertilización ($\text{Ni}_{\text{HOJA}}/\text{Ni}_{\text{RAIZ}} = 2$ en SM1/NPK). En los tres sustratos también se encontraron altas relaciones $\text{Mn}_{\text{HOJA}}/\text{Mn}_{\text{RAIZ}}$ (2-4.3) y el transporte era más efectivo en SM1/Ca que en SM1/NPK. La relación hoja/raíz seguía un patrón similar para el Zn ($\text{Zn}_{\text{HOJA}}/\text{Zn}_{\text{RAIZ}}$), pero el transporte hacia las hojas era menos eficiente que para el Ni o el Mn: SM2/Ca (1.8) > SM1/Ca (1.1) > SM1/NPK (0.9). Los factores de bioacumulación de Ni y Zn (FB, concentración de metal en hojas/concentración extraída con NH_4Cl en suelo) eran significativamente mayores en SM2 que en SM1, mientras que el FB del Mn era significativamente mayor en SM1 (Tabla 4).

TABLA 3. Valores de materia seca (MS, g \pm error típico) y concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$) de metales en hoja y raíz de *A. serpyllifolium* después de 24 semanas de crecimiento en las macetas.

Sustrato		MS	Co	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
		g	$\mu\text{g g}^{-1}$						
SM2/Ca	hojas	33,5 \pm 10,6	12,1 \pm 8,1	18,1 \pm 0,0	40,9 \pm 5,8	281,3 \pm 49,3	136,4 \pm 34,2	135,6 \pm 50,5	368,8 \pm 27,7
	raíz	5,2 \pm 1,3	4,0 \pm 4,0	25,6 \pm 0,0	56,9 \pm 7,1	94,0 \pm 15,7	10,8 \pm 9,3	650,3 \pm 138,5	208,9 \pm 13,2
SM1/Ca	hojas	69,8 \pm 11,8	1,3 \pm 0,8	14,7 \pm 7,3	17,2 \pm 4,2	233,8 \pm 48,3	106,1 \pm 24,1	35,3 \pm 3,9	79,0 \pm 10,0
	raíz	27,3 \pm 4,6	30,4 \pm 12,9	29,6 \pm 0,6	25,2 \pm 11,9	54,7 \pm 1,5	26,1 \pm 5,7	25,1 \pm 3,9	74,1 \pm 9,3
SM1/NPK	hojas	611,2 \pm 65,4	10,3 \pm 4,2	12,4 \pm 4,5	8,7 \pm 1,9	208,7 \pm 38,6	67,3 \pm 16,0	17,9 \pm 5,5	31,7 \pm 4,5
	raíz	3,9 \pm 0,8	10,2 \pm 8,1	94,3 \pm 58,8	17,8 \pm 8,2	100,7 \pm 35,9	30,0 \pm 2,5	15,5 \pm 2,7	35,8 \pm 6,0

TABLA 4. Factores de bioacumulación (FB) para Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb y Zn en *Alyssum serpyllifolium*. $\text{FB} = [\text{metal}]_{\text{HOJA}}/[\text{metal}]_{\text{SUELO}}$, siendo $[\text{metal}]_{\text{HOJA}}$ la concentración media del metal en las hojas de *A. serpyllifolium* y $[\text{metal}]_{\text{SUELO}}$ la concentración de metal extraído con NH_4Cl en el suelo a tiempo cero.

Sustrato	Co	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
SM2/Ca	666	28	125	38	743	1003	132
SM1/Ca	40	26	38	132	130	2062	8
SM1/NPK	279	16	45	186	219	1788	3

TABLA 5. Extracción total media de metales por *Alyssum serpyllifolium* ($\mu\text{g planta}^{-1}$) para Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb y Zn en los diferentes sustratos.

Sustrato	Co	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
SM2/Ca	0,6	0,6	1,7	8,7	6,0	3,3	12,3
SM1/Ca	0,1	0,8	1,1	12,2	6,9	2,5	5,3
SM1/NPK	6,4	7,6	9,7	129,6	41,1	11,1	27,5

A. serpyllifolium también transportaba Co a su parte aérea en SM2/Ca: el valor medio de la relación $\text{Co}_{\text{HOJA}}/\text{Co}_{\text{RAIZ}}$ era de 3 en estas plantas. Aunque la concentración de Co en hoja era baja en todos los casos ($\leq 20 \mu\text{g g}^{-1}$), las mayores concentraciones se encontraron en las plantas desarrolladas en este sustrato. Por el contrario, en los suelos SM1 la concentración de Co en raíz tendía a ser mayor que en hojas, hecho particularmente marcado en el tratamiento SM1/Ca, donde la concentración de Co en raíz era 30 veces mayor que en hoja (Tabla 3). Los valores de FB en SM2/Ca eran entre 2 y 16 veces mayores que en SM1/Ca o SM1/NPK (Tabla 4).

El transporte de Cr, Cu o Pb hacia la biomasa aérea estaba restringido en *Alyssum serpyllifolium*. En SM2/Ca la concentración de estos metales en hoja era más baja que en raíz y, por tanto, la relación hoja/raíz correspondiente era siempre <1 (Tabla 3). A pesar de la gran desviación de la media, la mayor concentración de Cr en raíz tendía a encontrarse en plantas desarrolladas en SM2/NPK (en un individuo se obtuvo $158 \mu\text{g Cr g}^{-1}$). Sin embargo, no había diferencias significativas entre suelos para la concentración de Cr en hoja ($15 - 20 \mu\text{g g}^{-1}$). Las mayores concentraciones de Cu y Pb en hoja (hasta $47 \mu\text{g Cu g}^{-1}$ y $190 \mu\text{g Pb g}^{-1}$) se encontraron en las plantas desarrolladas en SM2/Ca y, en este suelo, los valores de FB de Cu era hasta 3 veces mayores que en SM1 (Tabla 4). En un ejemplar de *A. serpyllifolium* desarrollado en SM2/Ca se encontró una concentración de $187 \mu\text{g Cu g}^{-1}$ en hojas. Aunque la concentración total era muy baja (siempre $< 40 \mu\text{g g}^{-1}$), en las plantas desarrolladas en SM1 (SM1/Ca y SM1/NPK) la concentración de Pb en hoja

era mayor que en raíz (Tabla 3) y el FB de Pb era el doble del obtenido en las plantas desarrolladas en SM2 (Tabla 4).

La cantidad total de metal extraído del suelo por la planta (*rendimiento metálico de la planta*), calculada a partir del producto biomasa (g) x concentración metálica ($\mu\text{g g}^{-1}$), descendía en el orden SM1/NPK > SM2/Ca > SM1/Ca, con la excepción de Mn y Ni, para los que las plantas desarrolladas en SM1/Ca tenían un mayor rendimiento que en SM2/Ca (Tabla 5). El rendimiento metálico (μg) era hasta 60 veces (Co), 13 veces (Cr), 9 veces (Cu), 15 veces (Mn), 7 veces (Ni), 4 veces (Pb) y 5 veces (Zn) mayor para las plantas desarrolladas en el suelo SM1/NPK que para las de los suelos SM1/Ca y SM2/Ca.

Biodisponibilidades y fraccionamiento metálico en suelo después del crecimiento de *A. serpyllifolium*

En las Tablas 6, 7 and 8 se presentan las concentraciones de metales extraídos con EDTA, M3 y NH_4Cl en el suelo (suelo no rizosférico, NR) antes (t_0) y después (t_{24}) del crecimiento de *A. serpyllifolium*. En la tabla 7 también se muestra la concentración de metales extraídos con M3 en el suelo de la rizosfera (R) después de la cosecha de las plantas. La concentración de los metales biodisponibles (particularmente los extraídos con EDTA y NH_4Cl) era, generalmente, más baja después del crecimiento de *A. serpyllifolium*, y esto era más marcado en los suelos SM1. Por ejemplo, el valor medio de Mn extraído por EDTA, M3 y NH_4Cl descendía entre el 3 y el 98 % en SM1/Ca y entre el 13 y el 96 % en SM1/NPK, encontrándose los menores descensos con el extractante M3. Por el contra-

TABLA 6. Concentración media ($\mu\text{g g}^{-1}$) de metales extraídos con EDTA en el suelo antes (t_0) y después (t_{24}) del crecimiento de *A. serpyllifolium*. También se da el valor medio relativo (%) de descenso/aumento (-/+) de las concentraciones metálicas. Cuando el descenso/aumento (-/+) es significativo se indica con un asterisco (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

	SM2/Ca			SM 1/Ca			SM1/NPK		
	Concentración a t_0	Concentración a t_{24}	+/- (%)	Concentración a t_0	Concentración a t_{24}	+/- (%)	Concentración a t_0	Concentración a t_{24}	+/- (%)
Co	0,8 \pm 0,0	0,7 \pm 0,1	- 3	0,7 \pm 0,1	0,6 \pm 0,0	- 18	0,8 \pm 0,1	0,6 \pm 0,0	- 29*
Cr	0,6 \pm 0,0	0,7 \pm 0,0	+ 17	0,7 \pm 0,1	0,7 \pm 0,0	0	0,6 \pm 0,1	0,7 \pm 0,0	+ 17
Cu	6,5 \pm 0,5	5,8 \pm 0,2	- 11	1,8 \pm 0,5	0,6 \pm 0,0	- 67*	1,8 \pm 0,6	0,7 \pm 0,0	- 61*
Mn	2,8 \pm 0,2	3,3 \pm 0,1	+ 18	20,9 \pm 6,8	1,2 \pm 0,1	- 94*	17,0 \pm 7,1	2,0 \pm 0,2	- 88*
Ni [‡]	< 1,0	< 1,0	n.d.	1,9 \pm 0,2	< 1,0	- \leq 47	1,8 \pm 0,0	< 1,0	- \leq 44
Pb	161,3 \pm 10,5	110,8 \pm 4,7	- 31**	3,6 \pm 0,1	2,9 \pm 0,0	- 19***	3,0 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	- 17***
Zn	1,9 \pm 0,4	2,2 \pm 0,5	+ 16	1,4 \pm 0,4	0,6 \pm 0,1	- 57*	1,3 \pm 0,5	0,9 \pm 0,2	- 31

‡, límite de detección para el Ni, 1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$; n.d., no hay dato disponible.

rio, el Mn biodisponible era mayor después del crecimiento vegetal en el suelo SM2/Ca, aunque las diferencias no eran siempre estadísticamente significativas. En el caso del Zn se observaba un patrón similar; después del crecimiento de las plantas el Zn_{EDTA} descendía SM1/Ca y SM1/NPK, y tendía a aumentar en SM2/Ca (Tabla 6). Mientras, la concentración de Zn_{M3} aumentaba en los tres suelos y era hasta 2,5 veces mayor después del crecimiento de las plantas (Tabla 7). Las concentraciones de Co, Cr, Cu, Ni y Pb biodisponible eran significativamente menores ($P < 0,05$) en los tres sustratos después del crecimiento de las plantas (Tablas 6 a 8). Las reducciones de Co, Cr y Cu eran mayores en suelo SM1 (18-88 % de Co, 45-67 % de Cr y 61-69 % de Cu) que en el suelo SM2 (3 % de Co, 29 % de Cr y 11-15 % de Cu), mientras que ocurría lo contrario para el Pb (Tabla 6). La concentración de Ni_{EDTA} en el suelo SM1 oscilaba entre 1,8 y 1,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ antes del crecimiento de las plantas, y descendía a valores < 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ (mínimo detectable) después del crecimiento de *A. serpyllifolium*, lo que representa una reducción de al menos un 44-47 %. En los tres sustratos se encontraron severas reducciones de Ni_{NH_4Cl} (94-98 %), mientras que no se observaron cambios para Ni_{M3} .

Por otra parte, en el suelo rizosférico se apreció un incremento significativo de Ni, Pb y Zn extraídos con M3, tanto en SM1 como en SM2 (sólo Ni y Pb)(Tabla 7). La concentración de Zn_{M3} y Ni_{M3} era mayor en la rizosfera de SM1/NPK que en la de SM1/Ca (aproximadamente 80 y 30 %, respectivamente). En los extractos M3 del suelo no rizosférico de SM1/Ca y SM1/NPK no se detectaba Pb, mientras que se obtuvieron valores de hasta 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ en el suelo de la rizosfera. Además, se encontró un aumento de hasta 40 $\mu\text{g Pb g}^{-1}$ en la rizosfera de las plantas desarrolladas en SM2/Ca.

Los cambios observados en el fraccionamiento metálico tras el crecimiento de *A. serpyllifolium* se muestran en la Tabla 9. En SM1/Ca y SM1/NPK, había una reducción de la fracción extraíble en ácido de Cr ($P < 0,001$), Cu (no significativamente), Mn ($P < 0,001$), Ni ($P < 0,001$, sólo en SM1/Ca) y Zn ($P < 0,001$). En SM2/Ca se reducía el Pb extraíble en ácido ($P < 0,05$), pero la concentración de Co, Mn, Ni y Zn de esta fracción aumentaba tras el crecimiento de las plantas (aunque este incremento no era significativo para el Ni). En este suelo también se observaba un incremento en la fracción reducible de Co, Cu, Mn, Ni y Zn después del crecimiento

TABLA 7. Concentración media ($\mu\text{g g}^{-1}$) de los metales extraídos con el reactivo Mehlich 3 (M3) en el suelo no rizoférico (NR) antes (t_0) y después (t_{24}) del crecimiento de *A. serpyllifolium* y concentración de los metales extraídos con M3 en la rizosfera (R, a t_{24}). También se da el valor medio relativo (%) de aumento/descenso (-/+) de la concentración metálica del suelo NR a t_{24} comparado con t_0 y del suelo R comparado con el suelo NR a t_{24} . Cuando el descenso/aumento (-/+) es significativo se indica con un asterisco (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb‡	Zn
Concentración a t_0	3,3 \pm 0,0	5,4 \pm 0,1	4,2 \pm 0,2	0,2 \pm 0,0	63,3 \pm 6,7	4,0 \pm 0,0
Concentración a t_{24}	0,7 \pm 0,0	6,1 \pm 0,3	5,9 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0	54,8 \pm 2,3	5,1 \pm 0,6
SM2/Ca +/- (t_{24} comparado con t_0 , %)	- 79***	+ 13	+ 41***	0	- 13	+ 28
Concentración en rizosfera (a t_{24})	0,9 \pm 0,1	6,0 \pm 0,2	5,8 \pm 0,0	0,3 \pm 0,0	92,5 \pm 4,9	4,9 \pm 0,4
+/- (R comparado con NR a t_{24} , %)	+ 29*	- 2	- 2	+ 50***	+ 69*	- 4
Concentración a t_0	3,2 \pm 0,1	0,5 \pm 0,0	3,5 \pm 0,2	0,2 \pm 0,0	< 1,0	0,7 \pm 0,0
Concentración a t_{24}	0,6 \pm 0,0	0,9 \pm 0,2	3,4 \pm 0,2	0,2 \pm 0,0	< 1,0	1,4 \pm 0,1
SM1/Ca +/- (t_{24} comparado con t_0 , %)	- 81***	+ 80**	- 3	0	n.d.	+ 100***
Concentración en rizosfera (a t_{24})	0,6 \pm 0,0	n.d.	2,8 \pm 0,5	0,4 \pm 0,1	2,4 \pm 0,2	2,4 \pm 0,3
+/- (R comparado con NR a t_{24} , %)	0	n.d.	- 18*	+ 100	+ \geq 140	+ 71**
Concentración a t_0	4,0 \pm 0,1	0,6 \pm 0,0	3,8 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0	< 1,0	0,8 \pm 0,0
Concentración a t_{24}	0,9 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	3,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0	< 1,0	1,9 \pm 0,3
SM1/NPK +/- (t_{24} comparado con t_0 , %)	- 78***	0	- 13	0	n.d.	+ 138*
Concentración en rizosfera (a t_{24})	0,9 \pm 0,1	n.d.	2,5 \pm 0,0	0,6 \pm 0,2	3,2 \pm 0,2	14,5 \pm 5,4
+/- (R comparado con NR a t_{24} , %)	0	n.d.	- 24*	+ 200	+ \geq 220	+ 663*

‡, límite de detección de Pb, 1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$; n.d., no hay dato.

TABLA 8. Concentración media de metales extraídos con NH_4Cl ($\mu\text{g g}^{-1}$) en el suelo antes (t_0) y después (t_{24}) del crecimiento de *A. serpyllifolium*. También se da el valor medio relativo (%) de descenso/aumento (-/+) de las concentraciones metálicas. Cuando el descenso/aumento (-/+) es significativo se indica con un asterisco (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

	SM2/Ca			SM1/Ca			SM1/NPK		
	Concentración a t_0	Concentración a t_{24}	+/- (%)	Concentración a t_0	Concentración a t_{24}	+/- (%)	Concentración a t_0	Concentración a t_{24}	+/- (%)
Co	0,03 \pm 0,00	0,04 \pm 0,01	+ 33	0,08 \pm 0,02	0,01 \pm 0,00	- 88*	0,05 \pm 0,02	0,02 \pm 0,01	- 60
Cr	0,34 \pm 0,20	0,24 \pm 0,11	- 29	0,31 \pm 0,08	0,17 \pm 0,04	- 45*	0,36 \pm 0,10	0,12 \pm 0,03	- 67*
Cu	0,62 \pm 0,00	0,53 \pm 0,20	- 15**	0,65 \pm 0,30	0,20 \pm 0,01	- 69	0,53 \pm 0,21	0,18 \pm 0,05	- 66
Mn‡	0,30 \pm 0,09	0,81 \pm 0,22	+ 170*	1,79 \pm 0,06	< 0,03	- \leq 98	1,15 \pm 0,09	0,05 \pm 0,05	- 96***
Ni‡	1,10 \pm 0,00	< 0,03	- \leq 97	0,80 \pm 0,10	0,04 \pm 0,00	- 98***	0,48 \pm 0,20	< 0,03	- 94*
Pb	0,14 \pm 0,03	0,11 \pm 0,04	- 21	0,02 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00	- 50	0,14 \pm 0,02	0,11 \pm 0,04	- 21

‡, límite de detección, 0,03 $\mu\text{g g}^{-1}$; n.d., no hay dato

TABLA 9. Valor medio relativo (%) del descenso/aumento (-/+ de la concentración de metales ($\mu\text{g g}^{-1}$) en extracciones secuenciales de los sustratos SM2/Ca, SM1/Ca y SM1/NPK después de 24 semanas de crecimiento de *A. serpyllifolium*. El descenso/aumento (-/+) fue calculado por diferencia entre la cantidad de metales en las distintas fracciones del suelo antes de la plantación y después de la cosecha ($t_0 - t_{24}$). Cuando el descenso/aumento (-/+) es significativo se indica con un asterisco (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Fracción	Media relativa de descenso (-)/ aumento (+)						
	Co	Cr	Cu	Mn	Ni	Pb	Zn
MS2/Ca							
Extraíble en ácido	+ 63***	- 17	- 3	+ 37***	+ 18	- 18*	+ 41***
Reducible	+ 39*	- 36*	+ 31***	+ 68*	+ 23*	- 6	+ 40**
Oxidable	- 42	- 70***	- 57***	n.c.	- 19	- 28*	- 23**
Residual	- 9	n.c.	n.c.	- 18**	- 21**	- 4*	- 9
MS1/Ca							
Extraíble en ácido	- 85*	- 79***	- 69	- 100***	- 91***	n.c.	- 81***
Reducible	- 78**	- 42**	- 87***	- 57***	- 97***	- 85***	- 100***
Oxidable	n.c.	+ 37***	- 78***	- 39***	- 96***	- 100***	- 95***
Residual	- 6	- 12	- 22*	- 13	- 1	n.c.	- 16*
MS1/NPK							
Extraíble en ácido	n.c.	- 74**	- 66	- 96***	- 75	n.c.	- 88***
Reducible	- 86***	- 16*	- 91***	- 67***	- 97***	- 83**	- 100***
Oxidable	n.c.	- 35**	- 18	- 39**	- 96***	n.c.	- 93***
Residual	n.c.	- 28***	- 10**	n.c.	- 2**	- 23*	- 28***

n.c., no hay cambio.

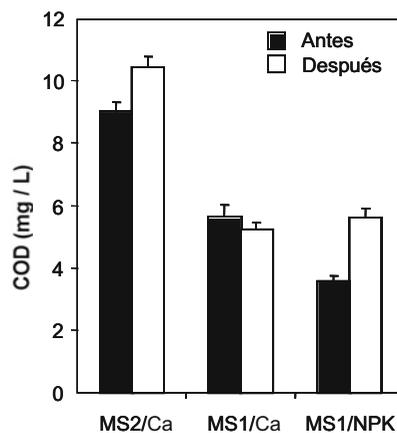
de *A. serpyllifolium* ($P < 0.05$), mientras que el Pb reducible tendía a descender. En SM1/Ca y SM1/NPK se encontró una reducción significativa ($P < 0.01$) de la fracción reducible de todos los metales y en los tres sustratos eran frecuentes también las reducciones en las fracciones oxidable y residual ($P < 0.05$). Las mayores reducciones en la fracción residual fueron encontradas para el Cu (SM1/Ca y SM1/NPK), Cr (SM1/NPK), Mn (SM1/Ca y SM2/Ca), Ni (SM2/Ca), Pb (SM1/NPK) y Zn (SM1/Ca, SM1/NPK y SM2/Ca).

Cambios en el pH del suelo y carbono orgánico disuelto después del crecimiento de *A. serpyllifolium*

Después del crecimiento de *A. serpyllifolium* se encontró un aumento significativo ($P < 0.05$) del pH del suelo en SM1/Ca (el valor medio de $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ aumentaba de 6.0 a 6.9) y SM2/Ca (de 6.3 a 6.6), pero no había diferencias significativas en SM1/NPK (el valor medio de pH era 6.3).

El carbono orgánico disuelto (COD) era bajo en los dos suelos de mina, con concentraciones entre 4 y 12 mg L^{-1} , pero había un incremento significativo en SM2/Ca y SM1/NPK después del crecimiento de *A. serpyllifolium* (Figura 2).

FIGURA 2. Carbono orgánico disuelto (COD en mg L^{-1}) en los suelos de mina antes y después del crecimiento de *Alyssum serpyllifolium*.



DISCUSIÓN

Los contenidos totales de Ni, Pb y Zn del suelo MS1 son próximos a los máximos recomendados en la legislación española para suelos agrícolas que pueden ser enmendados con lodos de depuradora ($30 \mu\text{g Ni g}^{-1}$, $50 \mu\text{g Pb g}^{-1}$ y $150 \mu\text{g Zn g}^{-1}$ para suelos con $\text{pH} < 7$, R.D. 1310, 1990) y están por debajo de los límites establecidos por la UE para suelos agrícolas ($70 \mu\text{g Ni g}^{-1}$, $300 \mu\text{g Pb g}^{-1}$ y $300 \mu\text{g Zn g}^{-1}$, EU, 1986). Las concentraciones de Cu, Pb, y Zn en el suelo MS2 eran 2, 5 y 1,3 veces los máximos de la UE, y 5, 29 y 2,5 veces los máximos de la legislación española (los límites español y europeos para Cu son $140 \mu\text{g g}^{-1}$ y $50 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente). La concentración de Cr en MS1 y MS2 era de 2.8 y 2.6 veces, respectivamente, el límite español ($>100 \mu\text{g Cr g}^{-1}$). El patrón de los contaminantes metálicos en los dos suelos influía significativamente sobre el crecimiento de *A. serpyllifolium*. La reducción de la biomasa observada en el suelo MS2, comparada con la del suelo MS1, se debió probablemente al efecto fitotóxico del Cu (Ebbs y Kochian, 1997). En la disolución del suelo MS2 se encontraron concentraciones de hasta $1200 \mu\text{M}$, comparadas con $5 \mu\text{M}$ en MS1, y en esta fase el Cu podría estar en forma fácilmente disponible para la absorción vegetal. De forma similar, Lombi *et al.* (2001) y Dahmani-Muller *et al.* (2001) concluyeron que el Cu era fitotóxico para *T. caerulea* y *Arabidopsis halleri*, respectivamente.

En el ensayo aquí presentado, *Alyssum serpyllifolium* no toleraba, absorbía y translocaba todos los metales de la misma forma. El contenido de Ni en las hojas de *A. serpyllifolium* oscilaba entre 33 y $188 \mu\text{g g}^{-1}$, valores sensiblemente menores que el valor de $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ utilizado por Baker *et al.* (2000) para definir la hiperacumulación de Ni. Sin embargo, el contenido de Ni en los suelos de mina de este estudio eran bajos ($34\text{-}47 \mu\text{g g}^{-1}$), notablemente menores que

los encontrados en los suelos naturales de donde procede *A. serpyllifolium* (hasta $3000 \mu\text{g g}^{-1}$; Diez *et al.*, 2002). Adicionalmente, el Ni se encontraba principalmente en la fracción residual y las concentraciones de Ni extraído por EDTA, M3 y NH_4Cl generalmente eran $< 1 \mu\text{g g}^{-1}$ (EDTA) o $< 0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ (M3 y NH_4Cl). *Alyssum serpyllifolium* puede tener una mayor exigencia de Ni que las plantas normales, como se ha demostrado para otras hiperacumuladoras de Ni, como *Alyssum bertolonii*, *Alyssum lesbiacum* y *Thlaspi goesingense* (Küpper *et al.*, 2001). El aumento de COD y de Ni_{M3} en la rizosfera, así como la reducción en todas las fracciones BCR de Ni, sugieren que *A. serpyllifolium* moviliza Ni del suelo para aumentar su absorción. Estas tendencias no tienen por qué manifestarse en suelos con mayores concentraciones de Ni biodisponible. Como rasgo característico de las hiperacumuladoras, *A. serpyllifolium* mostraba acumulación de Ni en su biomasa aérea ($\text{Ni}_{\text{HOJA}}/\text{Ni}_{\text{RAIZ}}$ hasta 13). Este rasgo estaba particularmente marcado en el suelo MS2 en el que $\text{Ni}_{\text{HOJA}}/\text{Ni}_{\text{RAIZ}}$ y la concentración de Ni en hojas tendía a ser mayor. Además del Ni, *A. serpyllifolium* también translocaba Mn y Zn a su biomasa aérea. La relación $\text{Mn}_{\text{HOJA}}/\text{Mn}_{\text{RAIZ}}$ era mayor en plantas desarrolladas en MS1/Ca que en MS2/Ca, y los valores del factor de bioconcentración (FB) y rendimiento de Mn aumentaban con el aumento del contenido de Mn en el suelo (MS1 > MS2). En el caso del Zn, la relación $\text{Zn}_{\text{HOJA}}/\text{Zn}_{\text{RAIZ}}$ era mayor en el suelo MS2, moderadamente contaminado. Los factores de bioacumulación para el Zn también aumentaban con el aumento de la concentración de Zn en el suelo (MS2 > MS1). Los valores de FB del Zn obtenidos para *A. serpyllifolium* (hasta 132) son mucho mayores que los encontrados para *A. halleri* desarrollado en sustratos contaminados con Zn (los valores de FB oscilaban entre 2 y 20, Dahmani-Muller *et al.*, 2001), pero son hasta tres órdenes de magnitud menores que los

encontrados para *T. caerulescens* (Knight *et al.*, 1997). Los rendimientos de Zn (μg) fueron mayores en MS2/Ca que en MS1/Ca. Sin embargo, estos rendimientos aumentaron significativamente en los sustratos MS1 después de su fertilización (MS1/NPK).

Se ha demostrado que algunas especies de *Alyssum* hiperacumuladoras de Ni también eran tolerantes a Co y lo acumulaban en sus partes aéreas (Homer *et al.*, 1991). Sin embargo, en este estudio las concentraciones de Co en hoja fueron generalmente inferiores a $< 20 \mu\text{g g}^{-1}$. Sólo en MS2/Ca, donde se encontraron las mayores concentraciones de Co en hoja, había un transporte eficiente de Co a las partes aéreas de las plantas ($\text{CO}_{\text{HOJA}}/\text{CO}_{\text{RAIZ}} > 1$). En este suelo, se producía un aumento de la concentración de Co- NH_4Cl y de las fracciones de Co extraíble en ácido y reducible después del crecimiento de *A. serpyllifolium*. En estudios hidropónicos, la elongación de raíz y hojas de *A. serpyllifolium* se reducía significativamente en disoluciones con $> 30 \mu\text{M}$ Co, y por encima de $300 \mu\text{M}$ Co las plantas morían (datos no mostrados), lo que sugiere que esta especie de *Alyssum* no muestra una elevada tolerancia al Co.

Tanto Cu como Cr (CrIII) y Pb se consideran elementos inmóviles en el suelo. El Cu es retenido por componentes orgánicos y minerales del suelo (Kabata-Pendias y Pendias, 1992). De acuerdo con esto, en los dos suelos de mina de este estudio una fracción del Cu total se encontraba asociada con óxidos de Fe y Mn (fracción reducible, 6-14 %), y materia orgánica (fracción oxidable, 14-26 %). El Cr es rápida y específicamente retenido por los minerales de la arcilla y los óxidos de Fe y Mn (Adriano, 2001), lo que justifica el predominio de este metal en las fracciones residual (92-94 %) y reducible (4-7 %). El Pb, considerado generalmente el menos móvil de los metales pesados, se asocia principalmente a minerales de la arcilla, óxidos y materia orgánica (Adriano, 2001; Kabata-Pendias y Pendias, 1992; McGrath *et*

al., 2002). En el suelo MS1 de este estudio, el 99 % del Pb total estaba en la fracción residual, mientras que en el suelo MS2 el 75 % estaba en la fracción residual y el 18 % asociado a óxidos de Fe y Mn. Adicionalmente, el pH elevado, como el que presentan los suelos encalados de este estudio, puede favorecer la precipitación de Pb como hidróxido, fosfato o carbonato, además de promover la formación de complejos orgánicos de Pb relativamente estables (Berti *et al.*, 1998). La adición de fósforo (MS1/NPK) podría inducir la formación de fosfato de Pb, estable y muy insoluble incluso a bajo pH. Entonces, estos metales se encuentran en las fracciones no lábiles, sin embargo, las concentraciones de Pb biodisponible (extraído con M3) eran significativamente mayores (hasta tres veces) en la rizosfera que en el suelo no rizosférico en los tres sustratos, y un ligero aumento de Cr-M3 también se encontró en la rizosfera de MS2/Ca. Las raíces de las plantas y sus exudados podrían modificar la forma de Cr y Pb y, consecuentemente, su biodisponibilidad. Para determinar como *A. serpyllifolium* aumenta la concentración de estos metales en la interfase suelo-planta, es necesaria una investigación sobre la rizosfera y la exudación vegetal en esta especie.

Tanto en MS1 como en MS2, *A. serpyllifolium* restringía el transporte de Cr, Cu y Pb a sus partes aéreas ($\text{metal}_{\text{HOJA}}/\text{metal}_{\text{RAIZ}} < 1$), lo que refleja una estrategia de tolerancia basada en la exclusión de estos metales (Baker, 1981). Homer *et al.* (1991) también mostraron que la hiperacumuladora de Ni *Alyssum troodii* no era capaz de absorber Cu a niveles comparables del Ni y Co. A pesar de la restricción observada en el transporte de Pb desde las raíces a las hojas, se encontraron concentraciones en hojas de hasta $200 \mu\text{g Pb g}^{-1}$. Esta concentración foliar es más de cuatro veces mayor que la encontrada usualmente en plantas desarrollada en suelos contaminados con Pb (Cunningham *et al.*, 1995). Estamos realizando estudios adicio-

nales para determinar si el uso de quelantes sintéticos como el EDTA, que han incrementado la movilidad de Pb en el suelo (Huang *et al.*, 1997; Elless y Blaylock, 2000), pueden aumentar el transporte de Pb a las hojas de *A. serpyllifolium*.

La optimización de las condiciones del suelo para incrementar el rendimiento metálico requiere un conocimiento previo de la influencia del pH del suelo y la disponibilidad de nutrientes sobre el crecimiento vegetal y la absorción metálica por la planta. En cultivos de interés económico, la acidificación del suelo provocaba un aumento de la concentración de Zn y Cd en la planta (Brown *et al.*, 1994). *Alyssum serpyllifolium* no creció en los sustratos que no fueran previamente encalados. Los suelos control, MS1/Con y MS2/Con, tenía un pH_{H₂O} de 3.7 y 4.3, respectivamente, lo que muestra que *A. serpyllifolium* no es capaz de crecer en condiciones tan ácidas. El encalado se hizo para conseguir un pH del suelo similar al de los suelos serpentínicos donde crece esta planta (pH_{H₂O} 6,0-6,5). Las especies de *Alyssum* acumuladoras de Ni parecen estar particularmente adaptadas a las bajas relaciones Ca: Mg típicas de suelos ultramáficos y, aún así, son capaces de alcanzar altas concentraciones de Ca foliar (Reeves *et al.*, 1997). Algunos estudios hidropónicos han mostrado que los niveles de Ca adecuados para el crecimiento de *Silene italica*, una especie serpentínica no acumuladora, provocaban un efecto depresivo del crecimiento y absorción de Ni en *A. bertolonii* (Gabbrielli *et al.*, 1990). El pH relativamente elevado de nuestros sustratos pudo haber reducido la absorción de los metales por la planta. Por tanto, es importante conseguir el pH del suelo que maximice la disponibilidad y absorción de los metales, y al mismo que permita el crecimiento de la planta. En este sentido, estamos realizando ensayos de invernadero para determinar el pH del suelo que optimice el crecimiento y la absorción de los metales. Robinson *et al.*

(1997) mostraron que la fertilización hacía aumentar el crecimiento de *A. bertolonii* por un factor cercano a 3 (de 4,5 t ha⁻¹ a 12 t ha⁻¹) sin reducir, prácticamente, la concentración foliar de Ni (7600 µg g⁻¹). En el caso de los sustratos MS1 de este estudio, la fertilización provocó un aumento de la biomasa de *A. serpyllifolium* por un factor de 10. Las concentraciones foliares de los metales tendían a ser más bajas en las plantas de estos suelos que en las de los suelos encalados (MS1/Ca vs. MS1/NPK), aunque sólo las concentraciones de Zn eran significativamente más bajas a $P < 0,05$. Sin embargo, la eficiencia de la fitoextracción es el resultado del producto (biomasa x contenido de metal = rendimiento metálico), es decir, las plantas que acumulan menor cantidad de metal pero que tienen una mayor biomasa pueden aportar un mayor rendimiento metálico global que otras plantas con alta capacidad de acumulación de metal pero con baja biomasa. El rendimiento metálico era significativamente mayor en las plantas desarrolladas sobre los sustratos MS1 fertilizados que en los encalados. Por ejemplo, el rendimiento de Ni aumentaba desde 6,9 en MS1/Ca a 41,1 en MS1/NPK. Sin embargo, el crecimiento radicular era significativamente reducido en los sustratos fertilizados y, por tanto, el transporte a las partes aéreas también era menos efectivo. A la vista de estos resultados se constata la necesidad de realizar nuevos estudios que permitan optimizar plenamente la fertilización, producción de biomasa, proliferación radicular y absorción y translocación de los metales en *A. serpyllifolium*, y estudios *in situ* para cuantificar estos parámetros en condiciones de campo. Además, son necesarios estudios que determinen los efectos independientes de los nutrientes minerales, ya que los distintos nutrientes pueden afectar de forma diferente a la producción de biomasa y absorción de metales, y esto también dependerá de las características del suelo. Estas plantas están adaptadas a suelos con deficiencia de nutrien-

tes, siendo el nitrógeno el limitante más frecuente de las hiperacumuladoras no leguminosas que crecen en suelos contaminados (Robinson *et al.*, 1997; Bennett *et al.*, 1998). Adicionalmente, se hace necesario un nuevo estudio que nos permita explicar por qué las plantas murieron en el sustrato SM2/NPK.

Como se ha dicho anteriormente, las plantas hiperacumuladoras tienen una elevada capacidad de absorción de los metales, pero la concentración de metales en los tejidos no sólo depende de las características de las plantas sino también de la biodisponibilidad metálica en el suelo (McGrath *et al.*, 1997). La biodisponibilidad de metales en suelos contaminados depende de factores físicos, químicos y biológicos. Los factores físicos (estructura, permeabilidad) y químicos (Eh, pH, especiación, concentración) encuadran el medio en el que la biota puede modificar la disponibilidad metálica por liberación de O₂, protones, ácidos orgánicos o fenólicos simples, o por asociaciones micorrícicas. Knight *et al.* (1997) observaron sólo un pequeño descenso de la concentración de Zn en la disolución del suelo después del crecimiento de *T. caerulescens* y sugirieron que esta especie era capaz de movilizar Zn insoluble en el suelo, o que esta extracción era compensada por la liberación de Zn del suelo a la disolución. En contraste, Hutchinson *et al.* (2000) mostraron que *T. caerulescens* no era capaz de movilizar Cd no lábil en suelos de mina contaminados con Pb/Zn, ni en suelos agrícolas contaminados con lodos de depuradora. Dahmani-Muller *et al.* (2002) mostraron que el Zn extraído con CaCl₂ en suelos muy contaminados con lodos residuales era mayor después del crecimiento de *A. halleri*, pero no encontraban diferencias significativas en suelos moderadamente contaminados. Además, después del crecimiento encontraron incrementos generales de Cu-CaCl₂ en suelos muy y moderadamente contaminados. En nuestro estudio encontramos incrementos de Mn y Zn extraídos con EDTA, M3 y

NH₄Cl (sólo Mn) en los suelos MS2 (moderadamente contaminados) después del crecimiento de *A. serpyllifolium*. A excepción del Zn, no se encontraron incrementos similares en los suelos MS1 (poco contaminados). Los aumentos de extractabilidad de Mn y Zn podrían ser explicados por un aumento de la alteración de las fases minerales metálicas. La liberación de protones, ácidos orgánicos o compuestos fenólicos en los exudados radiculares de *A. serpyllifolium* podrían favorecer esta alteración. En la rizosfera, donde el efecto de los exudados es más pronunciado, la concentración de Zn_{M3} en MS1 era incrementada incluso más. Adicionalmente, el carbono orgánico disuelto era significativamente mayor en los sustratos MS2/Ca y MS1/NPK después del crecimiento de las plantas. El ligero incremento del pH de suelo después del crecimiento de las plantas podría sugerir, sin embargo, que la acidificación no era el mecanismo para movilizar el Zn del suelo. Esto está de acuerdo con los trabajos de Bernal *et al.* (1994) quienes mostraron que la acidificación de la rizosfera no era el mecanismo utilizado por *Alyssum murale* para aumentar su absorción de metales. Por el contrario, las concentraciones de Co, Cu, Ni y Pb extraíbles tendían a descender después del crecimiento de las plantas. Las reducciones observadas pueden ser explicadas por la absorción de la planta, excepto en el caso del Pb en MS2/Ca. En este caso, el descenso de Pb extractable, no debido a la absorción de la planta, pudo haber sido inmovilizado en el suelo o sorbido por los orgánicos liberados en los exudados radiculares.

En la mayoría de las fracciones metálicas se encontraron reducciones desde el inicio del experimento. Sin embargo, esta reducción no sólo ocurría en las fracciones más disponibles a las plantas (como las extraíbles en ácido o reducibles) sino también en las fracciones oxidable y residual, consideradas no lábiles y menos biodisponibles. Además, en MS2/Ca las fracciones reducible y soluble en ácido de

Co, Cu, Mn, Ni y Zn aumentaban, frecuentemente, después del crecimiento vegetal. Esto podría reflejar simplemente la capacidad tampón de estos suelos en los que el equilibrio es mantenido a través de un suministro dinámico de los metales de las formas ligadas menos disponibles a las fracciones más disponibles. Alternativamente, el descenso de las cuatro fracciones metálicas después del crecimiento de *A. serpyllifolium* podría reflejar su capacidad de acceder a fracciones metálicas consideradas no biodisponibles para mantener la absorción metálica.

CONCLUSIONES

La capacidad de *A. serpyllifolium* para aumentar la disponibilidad metálica a través del acceso a las fracciones metálicas menos disponibles podría ser una valiosa característica para su uso como fitoextractor. Sin embargo, es fundamental que los metales movilizados sean absorbidos por las plantas y no perdidos a través de los lixiviados. Mn, Ni y Zn parecen ser absorbidos por *A. serpyllifolium*, y transportados a su parte aérea, mientras que el Cu podría ser lixiviado. Además, la fitotoxicidad del Cu limita el uso de esta especie como fitoextractora en suelos con altas concentraciones de este metal. Se necesitan estudios adicionales para determinar la absorción metálica y/o movilización, y posible lixiviado, en suelos con concentraciones metálicas en aumento (y en suelos donde los principales contaminantes sean Mn, Ni y Zn). Nuestros resultados muestran que el rendimiento de la extracción metálica puede aumentar por el aumento de la biomasa a través de la enmienda del suelo (fertilización), sin embargo la optimización completa del crecimiento (biomasa y proliferación radicular) y la extracción metálica dependerá de cada suelo en cuestión y requerirá un estudio adicional. La escasa productividad de esta planta, incluso en los sustratos de mina fertilizados con NPK, continúa siendo

el principal factor limitante para su uso en fitoextracción.

AGRADECIMIENTOS

A Ana M^a Carvalho, profesora titular de la Escuela Politécnica de Bragança, que amablemente nos mostró el área serpentinitica de Tras-os-Montes, a Lidia Peréz Laxe por su apoyo en la analítica y a Anibal Gil de ENDESA y Jesús Sainz de EGMASA por facilitarnos los suelos de mina utilizados en este ensayo. Este trabajo fue financiado por la Xunta de Galicia (proyectos PGIDT99MA20003 y PGIDT01AGR20001PR) y por la Comunidad Europea (HPMF-CT-2000-00811).

REFERENCIAS

- Adamo, P., Dudka, S., Wilson, M.J., Mchardy, W.J. (2002). Distribution of trace elements in soils from the Sudbury smelting area (Ontario, Canada). *Water Air Soil Pollut.* 137, 95-116.
- Adriano, D.C. (2001). *Trace Elements in Terrestrial Environments. Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals*. Springer-Verlag, New York.
- Baker, A.J.M. 1981. Accumulator and excluders – Strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3, 643-654.
- Baker, A.J.M., Whiting, (2002). In search of the holy grail – a further step in understanding metal hyperaccumulation? *New Phytol.* 155, 1-7.
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D., Smith, J.A.C. (2000): Metal Hyperaccumulator Plants: A Review of Ecology and Physiology of a Biological Resource for Phytoremediation of Metal-Polluted Soils. En: N. Terry *et al.* (Eds.), *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 129-158.

- Bennett, F.A., Tyler, E.K., Brooks, R.R., Gregg, P.E.H., Stewart, R.B. (1998). Fertilisation of hyperaccumulators to enhance their potential for phytoremediation and phytomining. En: RR Brooks (Ed.), *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 249-259.
- Bernal, M.P., McGrath, S.P., Miller, A.J., Baker, A.J.M. (1994). Comparison of the chemical changes in the rhizosphere of the nickel hyperaccumulator *Alyssum murale* with the non-accumulator *Raphanus sativus*. *Plant Soil* 164, 251-259.
- Berti, W.R., Cunningham, S.D., Cooper, E.M. (1998). Case studies in the field – In place inactivation and phytoremediation of Pb contaminated sites. In: J. Vangronsveld, S.D. Cunningham (Eds.), *Metal Contaminated Soils: in situ Inactivation and Phytoremediation*. Springer, New York, pp. 235-248.
- Brooks, R.R., Radford, C.C. (1978). Nickel accumulation by European species of the genus *Alyssum*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 200, 217-224.
- Brown, S.L., Chaney, R.L., Angle, J.S., Baker, A.J.M. (1994). Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and Bladder Campion for zinc- and cadmium-contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 23, 1151-1157.
- Chiarucci, A., Foggi, B., Selvi, F. (1995). Garigue plant communities of ultramafic outcrops of Tuscany, Italy. *Webbia* 49, 179-192.
- Chung, J-B., Zazoski, R.J. (1994). Ammonium-potassium and ammonium-calcium exchange equilibria in bulk and rhizosphere soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58, 1368-1375.
- Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W. (1995). Remediation of contaminated soils and sludges by green plants. En: Hinchee, R.E., Means, J.L., Burris, D.R. (Eds.), *Bioremediation of Inorganics*. Batelle Press, Columbus-Richland, pp. 33-54.
- Dahmani-Muller, H., van Oort, F., Denaix, L. (2002). Is metal extraction by *Arabidopsis halleri* related to exchangeable metal rates in soils amended with different metal-bearing solids? *Environ. Pollut.* 117, 487-498.
- Diez, J., Kidd, P., Monterroso, C. (2002). Potential species for phytoextraction applications: a plant screening of the Tras-os-Montes serpentine area. En: Faz, A., Ortiz, R., Mermut, A.R. (Eds.), *Sustainable Use and Management of Soils in Arid and Semi-arid Regions*. Quaderna Editorial, Spain, pp. 461-462.
- Ebbs, S.D., Kochian, L.V. 1997. Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species: implications for phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 26, 776-781.
- Elless, M.P., Blaylock, M.J. 2000. Amendment optimisation to enhance lead extractability from contaminated soils for phytoremediation. *Int. J. Phyto.* 2, 75-89.
- EU (Commission of the European Communities). (1986). Council directive of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. *Official J. Europ. Commun.* L181 (86/278/EEC), 6-12.
- Gabbrielli, R., Pandolfini, T., Vergnano, O., Palandri, M.R. (1990). Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies. *Plant Soil.* 122, 271-277.
- Homer, F.A., Morrison, R.S., Brooks, R.R., Clemens, J., Reeves, R.D. (1991). Comparative studies of nickel, cobalt, and copper uptake by some nickel hyperaccumulators of the genus *Alyssum*. *Plant Soil* 138, 195-205.
- Huang, J.W., Chen, J., Berti, W.B., Cunningham, S.D. 1997. Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead

- phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.* 31, 800-805.
- Hutchinson, J.J., Young, S.D., McGrath, S.P., West, H.M., Black, C.R., Baker, A.J.M. (2000). Determining uptake of *non-labile* soil cadmium by *Thlaspi caerulescens* using isotopic dilution techniques. *New Phytol.* 146, 453-460.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (1992). *Trace Elements in Soils and Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Knight, B.P., Zhao, F.J., McGrath, S.P., Shen, Z.G. (1997). Zinc and cadmium uptake by the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* in contaminated soils and its effect on the concentration and chemical speciation of metals in soil solution. *Plant Soil* 197, 71-78.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.J., Wieshammer, G., McGrath, S.P. (2001). Cellular compartmentation of nickel in hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. *J. Exp. Bot.* 52, 2291-2300.
- Lasat, M.M. (1996). Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.* 31, 109-120.
- Lombi, E., Zhao, F.J., Dunham, S.J., McGrath, S.P. (2001). Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *J. Environ. Qual.* 30, 1919-1926.
- Mehlich, A. (1984). Mehlich-3 test extractant: a modification of Mehlich-2 extractant. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 15, 1409-1416.
- Menezes de Sequeira, E. (1969). Toxicity and movement of heavy metals in serpentine soils (north-eastern Portugal). *Agron. Lusit.* 30, 115-154.
- Menezes de Sequeira, E., Pinto da Silva, A.R. (1992). Ecology of Serpentinized Areas of North-east Portugal. En: Roberts B.A. and Proctor J. (Eds.), *The Ecology of Areas with Serpentinized Rocks*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 169-197.
- Morel, J.L. (1997). Bioavailability of trace elements to terrestrial plants. En: J Tarradellas, G Bitton and D. Rossel. (Eds.), *Soil Ecotoxicology*. CRC Press Inc., Boca Raton, pp 141-176.
- McGrath, S.P., Shen, Z.G., Zhao, F.J. (1997). Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi ochroleucum* grown in contaminated soils. *Plant Soil* 188, 153-159.
- McGrath, S.P., Zhao, F.J., Lombi, E. (2002). Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Adv. Agron.* 75, 1-56.
- Olsen, S.R., Sommers, L.E. (1982). Phosphorus. En: Page, D.L. (Ed.), *Methods of Soil Analysis. Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, USA, pp. 403-430.
- Peech, M., Alexander, L.T., Dean, L.A., Deed, J.F. (1947). *Methods of Soil Analysis for Soil Fertility Investigations*. USDA. Cir. 757, U.S. Gov. Print. Office, Washington DC, pp. 25.
- Rauret, G., Lopez-Sanchez, J.F., Sahuquillo, A., Rubio, R., Davidson, C., Ure, A., Quevauviller, Ph. (1999). Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. *J. Environ. Monit.* 1, 57-61.
- R.D. 1310 1999. Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los Lodos de Depuración en el Sector Agrario. BOE, nº 262, 32339-32340.
- Reeves, R.D., Baker, A.J.M., Kelepertsis, A. (1997). The distribution and biogeochemistry of some serpentine plants of Greece. En: Jaffré, T., Reeves, R.D., Becquer, T. (Eds.), *The Ecology of Ultramafic and Metalliferous Areas*.

- ORSTOM, Centre de Nouméa, Nouvelle-Calédonie, pp. 205-207.
- Robinson, B.H., Chiarucci, A., Brooks, R.R., Petit, D., Kirkman, J.H., Gregg, P.E.H., De Dominicis, V. (1997). The nickel hyperaccumulator *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. *J. Geochem. Explor.* 59, 75-86.
- Shuman, L.M. 1979. Zinc, manganese and copper in soil fractions. *Soil Sci.* 127, 10-17.
- Soil Survey Staff. (1999). *Soil Taxonomy, A Basic System of Soil Classification for Making and Interpreting Soil Surveys*. USDA. Agriculture Handbook No. 436. U.S. Gov. Print. Office, Washington, DC.