

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOACUMULADORA DE MERCURIO DE
SIETE ESPECIES VEGETALES**

**NATHALY REYES GARCÉS
FERNANDO DUARTE MOLINA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2008**

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOACUMULADORA DE MERCURIO DE
SIETE ESPECIES VEGETALES**

**NATHALY REYES GARCÉS
FERNANDO DUARTE MOLINA**

**Trabajo de Grado presentado como requisito
parcial para optar el Título de Químico**

Directora: Elena E. Stashenko, Química, Ph.D.

Co-Director: Jairo René Martínez Morales, Químico, Ph.D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2008**

Dedicatoria

*A nuestras familias, lo más importante
en nuestras vidas.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la vida por poder llegar hasta este punto.

A mis papás, Emilce y Henry, por todo su esfuerzo y dedicación, todo esto es por ellos.

A mis hermanitos, Henry Mauricio y Estefanía, por ser mi apoyo y compañía incondicional.

A la Dra. Elena y el Dr. Jairo René por su gran contribución a mi formación profesional.

A Elkin por su paciencia y su inmensa colaboración en el desarrollo de la tesis.

A Lucho y César, por toda la ayuda con las plantas y el vivero.

A los compañeros de CENIVAM y del Laboratorio de Cromatografía que de alguna manera nos ayudaron en la realización del proyecto.

A mis amigos de carrera, porque estos casi 6 años no hubieran sido lo mismo sin ustedes. Tata, gracias por estos más de 10 años de amistad, me alegra mucho que hayamos llegado hasta este momento las dos, se te quiere montones. A mi querida muy buena mala influencia y amiga de carrera, Natalia, porque estudiar TANTO juntas dio muy buenos resultados, y gracias por TODOS los consejos, planes de entretenimiento y de “des-aburrimiento”. A Jhoaito y Fernando por su amistad y porque junto a Natalia fueron una gran compañía en la mayor parte de la carrera. Carlos M., Karen y Manuel, gracias por TODO, fueron muchos momentos con ustedes y espero sigan siendo muchísimos más, los quiero.

Nathaly Reyes Garcés

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y a mi hermana por su incondicional apoyo y amor puro,

A todos los profesores de los cuales aprendí todo y a quienes admiro por su labor,

A Ana María Cogán por haber orientado mi vida hacia la química,

A César y Lucho, trabajadores de CENIVAM, por toda la ayuda recibida,

A Elkin, formidable químico, por su invaluable orientación,

A mis amigos Nathaly, Natalia y Jhoao, con quienes compartí muchos momentos bonitos que siempre recordaré.

Fernando Duarte Molina

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. ESTADO DEL ARTE	4
1.1 MERCURIO Y FUENTES DE CONTAMINACIÓN	4
1.2 RIESGOS QUE PRODUCE EL MERCURIO PARA LA SALUD	7
1.3 FITORREMEDIACIÓN	8
1.3.1 Generalidades	8
1.3.2 Contaminantes que pueden tratarse con la fitorremediación	12
1.3.3 Tipos de fitorremediación	13
1.3.3.1 Fitoextracción	14
1.3.3.2 Fitoestabilización	18
1.3.4 Ventajas y desventajas de la fitorremediación	18
1.3.5 Interacción de las plantas con el mercurio	19
1.4 CIENCIOMETRÍA	20
1.5 ANÁLISIS DE MERCURIO	23
1.5.1 Espectrómetro de absorción atómica RA-915+	23
1.5.2 RP-91C, aditamento para la cuantificación de mercurio en matrices sólidas.	23
1.5.3 RP-91, aditamento para la cuantificación de mercurio en matrices líquidas.	24
2. PARTE EXPERIMENTAL	26
2.1 ADECUACIÓN DEL SUELO PARA EL EXPERIMENTO	26
2.2 OBTENCIÓN DE LOS ESPECÍMENES DE LAS PLANTAS A ESTUDIAR Y CRITERIOS DE SELECCIÓN	26
2.3 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	29

2.4	SIEMBRA DE LAS PLANTAS EN EL SUELO CONTAMINADO	29
2.5	APLICACIÓN DEL FERTILIZANTE	29
2.6	PREPARACIÓN DE MATERIAL VEGETAL	30
2.7	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO	30
2.8	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS LÍQUIDAS	31
2.9	PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN REDUCTORA	31
2.10	ANÁLISIS DE MUESTRAS SÓLIDAS	31
2.10.1	Análisis del material vegetal	32
2.10.2	Análisis de muestras de suelo	33
2.11	ANÁLISIS DE MUESTRAS LÍQUIDAS	33
2.12	ANÁLISIS DE AIRE EN EL LUGAR DEL EXPERIMENTO	35
2.13	DETERMINACIÓN DE LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	35
2.14	EVALUACIÓN DE LA FITODISPONIBILIDAD DE MERCURIO EN EL SUELO	37
3.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	38
3.1	CURVAS DE CALIBRACIÓN	38
3.2	LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	40
3.3	FITODISPONIBILIDAD	41
3.4	CONCENTRACIÓN DE MERCURIO EN BLANCOS, SUELOS, AGUAS Y PARTES DE LAS PLANTAS BAJO ESTUDIO	42
4.	CONCLUSIONES	57
5.	RECOMENDACIONES	60
	BIBLIOGRAFÍA	61
	ANEXOS	75

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Reacciones enzimáticas de: a).Mercurio iónico Hg^{2+} y b).Mercurio orgánico RHg^+ .	7
Figura 2. Esquema general del analizador RA-915 ⁺ .	24
Figura 3. Representación del acoplamiento RA-915 ⁺ /RP-91.	25
Figura 4. Curva de calibración utilizada en el análisis de muestras sólidas.	38
Figura 5. Curva de calibración utilizada en el análisis de muestras líquidas.	39
Figura 6. Comparación de las concentraciones de mercurio encontradas en los tallos de las plantas, cultivadas con fertilizante.	51
Figura 7. Comparación de las concentraciones de mercurio encontradas en las hojas de las plantas, cultivadas con fertilizante.	53
Figura 8. Factores de bioacumulación del grupo de plantas bajo estudio, que se cultivaron con fertilizante.	55
Figura 9. Factores de bioacumulación del grupo de plantas bajo estudio, que se cultivaron sin fertilizante.	56

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1.	Muestra de varias plantas que han sido estudiadas en la fitorremediación de mercurio, la modificación genética (si la hay) y el año en que se reportó el trabajo.	9
Tabla 2.	Comparación de costos entre la fitoextracción de metales pesados y otras opciones de tratamiento.	11
Tabla 3.	Comparación de costos entre fitorremediación y otras opciones de tratamiento de diversos contaminantes.	12
Tabla 4.	Tipos de fitorremediación, descripción y aplicaciones.	13
Tabla 5.	Principales resultados encontrados sobre la actividad científica en el campo de la fitorremediación de mercurio en las bases de datos <i>Scopus</i> y <i>Web of Science (ISI Web of Knowledge)</i> . Fecha de búsqueda: 21 de julio de 2008.	22
Tabla 6.	Plantas que se utilizaron en el experimento de fitorremediación y sus números de colecta.	26
Tabla 7.	Criterios de selección de las especies bajo estudio.	27
Tabla 8.	Parámetros de funcionamiento del acoplamiento RA-915 ⁺ /RP-91C, utilizados en el trabajo.	32
Tabla 9.	Parámetros de funcionamiento del acoplamiento RA-915 ⁺ /RP-91, utilizados en el trabajo.	33
Tabla 10.	Parámetros de funcionamiento del equipo RA-915+ para el análisis de muestras gaseosas, utilizadas en el trabajo.	35
Tabla 11.	Curvas de calibración empleadas para la cuantificación de mercurio en muestras sólidas.	39
Tabla 12.	Curvas de calibración empleadas para la cuantificación de mercurio en muestras líquidas.	40
Tabla 13.	Límites de detección y de cuantificación de mercurio	40

	obtenidos en diferentes tipos de análisis.	
Tabla 14.	Fitodisponibilidad determinada en suelo (10 g) contaminado con mercurio.	41
Tabla 15.	Concentraciones de Hg total en blancos, suelo, agua de lixiviado y diferentes partes de las plantas de la especie <i>Lippia alba</i> , cultivadas con y sin fertilizante.	43
Tabla 16.	Concentraciones de Hg total en blancos, suelo, agua de lixiviado y diferentes partes de las plantas de la especie <i>Echeveria</i> aff. <i>gibbiflora</i> Moc. & Sessé ex DC, cultivadas con y sin fertilizante.	44
Tabla 17.	Concentraciones de Hg total en blancos, suelo, agua de lixiviado y diferentes partes de las plantas de la especie <i>Dieffenbachia</i> cf. <i>seguine</i> (Jacq.) Shott, cultivadas con y sin fertilizante.	45
Tabla 18.	Concentraciones de Hg total en blancos, suelo, agua de lixiviado y diferentes partes de las plantas de la especie <i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f., cultivadas con y sin fertilizante.	46
Tabla 19.	Concentraciones de Hg total en blancos, suelo, agua de lixiviado y diferentes partes de las plantas de la especie <i>Lippia organoides</i> , cultivadas con y sin fertilizante.	47
Tabla 20.	Concentraciones de Hg total en blancos, suelo, agua de lixiviado y diferentes partes de las plantas de la especie <i>Hellianthus annuus</i> , cultivadas con y sin fertilizante.	48
Tabla 21.	Concentraciones de Hg total en blancos, suelo, agua de lixiviado y diferentes partes de las plantas de la especie <i>Licopersicum esculentum</i> , cultivadas con y sin fertilizante.	49
Tabla 22.	Comparación de las concentraciones de mercurio encontradas en las raíces de las plantas, cultivadas con y sin fertilizante.	50
Tabla 23.	Comparación de las concentraciones de mercurio encontradas en los tallos de las plantas, cultivadas sin	52

fertilizante.

Tabla 24. Comparación de las concentraciones de mercurio 54
encontradas en las hojas de las plantas, cultivadas sin
fertilizante.

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Imágenes correspondientes a la adecuación del suelo para el experimento.	76
ANEXO B. Foto de la especie <i>Lippia origanoides</i> .	76
ANEXO C. Foto de la especie <i>Lippia alba</i> .	77
ANEXO D. Foto de la especie <i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.	77
ANEXO E. Foto de la especie <i>Helianthus annuus</i> .	78
ANEXO F. Foto de la especie <i>Dieffenbachia</i> cf. <i>seguine</i> (Jacq.) Shott.	78
ANEXO G. Foto de la especie <i>Licopersicum esculentum</i> .	79
ANEXO H. Foto de la especie <i>Echeveria</i> aff. <i>gibbiflora</i> Moc. & Sessé ex DC.	79
ANEXO J. Foto de la siembra de las plantas en el suelo contaminado.	80
ANEXO K. Fotos del lavado del material vegetal.	80
ANEXO L. Fotos de la división del material vegetal.	81
ANEXO M. Foto del acoplamiento RA-915 ⁺ /RP-91C.	81
ANEXO N. Foto del acoplamiento RA-915 ⁺ /RP-91.	82
ANEXO P. Foto del equipo RA-915 ⁺ para el análisis de muestras gaseosas.	82
ANEXO Q. Plantas de tomate después de 2 meses de exposición al mercurio en el suelo.	83

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATSDR	<i>Agency of Toxic Substances and Disease Registry</i>
BF	<i>Bioaccumulation factor</i> (Factor de bioacumulación)
ca.	Cantidad aproximada
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.
DDT	1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano
DNT	Dinitrotolueno
EE.UU.	Estados Unidos de América
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (por ejemplo)
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
et al.	<i>Et alii</i> (y otros)
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
i.e.	<i>In exempli</i> (es decir, o sea)
mg	miligramo
mL	mililitro
ng	nanogramo
NPK	<i>Nitrogen, Phosphorus and Potassium</i> (Nitrógeno, Fósforo y Potasio)
PMT	<i>Photo multiplier Tube</i> (Tubo fotomultiplicador)
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
RDX	Ciclotrimetilenetrinitramina (hexágeno)
TNT	Trinitrotolueno
UIS	Universidad Industrial de Santander

RESUMEN:

TÍTULO: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOACUMULADORA DE MERCURIO DE SIETE ESPECIES VEGETALES.*

Autores: Nathaly Reyes Garcés**
Fernando Duarte Molina**

Palabras claves: Fitorremediación, mercurio, bioacumulación, *Dieffenbachia cf. seguine* (Jacq.)Shott., *Lippia origanoides*, *Lippia Alba* (carvona), *Helianthus annuus*, *Echeveria aff. gibbiflora* Moc. & Sessé ex DC., *Aloe vera* (L.) Burm. f. y *Lycopersicum esculentum*.

La contaminación por mercurio es un problema mundial, numerosos sitios en el mundo sufren las consecuencias de la toxicidad de este metal y requieren con urgencia técnicas de remediación. La fitorremediación, uso de plantas para remover o neutralizar los contaminantes del ambiente, es una alternativa viable económicamente, relativamente fácil de instalar y de bajo impacto negativo sobre el sitio en el que se implementa. El presente trabajo es un estudio de la capacidad de fitoextracción de siete especies de plantas para determinar su posible aplicación en la descontaminación de lugares afectados por mercurio.

Las plantas aptas para fitoextracción deben tolerar las concentraciones del contaminante en los sitios afectados, absorberlo en la raíz y translocarlo a los tejidos superiores (hojas, tallo, flores, frutos, etc.). Las especies a las cuáles se les evaluaron los criterios mencionados fueron las siguientes: *Dieffenbachia cf. seguine* (Jacq.)Shott., *Lippia origanoides*, *Lippia Alba* (carvona), *Helianthus annuus*, *Echeveria aff. gibbiflora* Moc. & Sessé ex DC., *Aloe vera* (L.) Burm. f. y *Lycopersicum esculentum*. Todas las especies utilizadas, excepto la *Lycopersicum esculentum*, toleraron la concentración de mercurio en el suelo utilizado ($11,2\text{ppm} < [\text{Hg}] < 16,7\text{ppm}$); las cuatro primeras especies mencionadas lograron un factor de bioacumulación de mercurio en raíz alto (0,29; 0,20; 0,18 y 0,16 respectivamente) cuando se les adicionó fertilizante tipo NPK. Además, teniendo en cuenta que en este estudio no se adicionaron sustancias que aumentaran la biodisponibilidad del metal para la vegetación, las plantas *Lippia origanoides* y *Helianthus annuus* lograron una translocación significativa del metal en las hojas, ambas con factores de bioacumulación de 0,03. Lo anterior permite proponer a las plantas *Lippia origanoides* y *Helianthus annuus* como candidatas para un estudio más profundo para evaluar su uso en la fitorremediación de mercurio y a la especie *Dieffenbachia cf. seguine* (Jacq.)Shott. para un estudio específico en fitoestabilización.

* Proyecto de grado.

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directores: Elena Stashenko, Jairo R. Martínez.

ABSTRACT:

TITLE: EVALUATION OF MERCURY BIOACCUMULATION CAPABILITY OF SEVEN VEGETAL SPECIES.*

Authors: Nathaly Reyes Garcés**
Fernando Duarte Molina**

Keywords: Phytoremediation, mercury, bioaccumulation, *Dieffenbachia cf. seguine* (Jacq.)Shott., *Lippia origanoides*, *Lippia alba* (carvone), *Helianthus annuus*, *Echeveria aff. gibbiflora* Moc. & Sessé ex DC., *Aloe vera* (L.) Burm. f., *Lycopersicum esculentum*.

Mercury pollution is a global environmental problem; numerous contaminated sites are urgently requiring remediation techniques because they are suffering the consequences on account of the toxicity of this metal. Phytoremediation, use of plants to remove pollutants from the environment or render them harmless, is considered a feasible low cost alternative and environment-friendly technique. The aim of this thesis was to study the phytoextraction ability of seven plant species and its possible application in mercury contaminated sites.

The suitable plants for phytoextraction must tolerate the pollutant concentration of the affected area, absorb it in the roots, and translocate it to the shoots. The studied species were: *Dieffenbachia cf. seguine* (Jacq.)Shott., *Lippia origanoides*, *Lippia Alba* (carvone), *Helianthus annuus*, *Echeveria aff. gibbiflora* Moc. & Sessé ex DC., *Aloe vera* (L.) Burm. f., and *Lycopersicum esculentum*. All of them, except for the *Lycopersicum esculentum*, were able to tolerate the mercury concentration in the utilized soil ($11,2\text{ppm} < [\text{Hg}] < 16,7\text{ppm}$). The first four species achieved high bioaccumulation factor values (0,29; 0,20; 0,18; and 0,16 respectively) when cultivated in fertilized soil. Additionally, taking in account that in this study no bioavailability promoting substances were added to the soil, the plant species *Lippia origanoides* and *Helianthus annuus* accomplished significant translocation to the leaves, both of them showed a 0,03 bioaccumulation factors. According to the obtained results, this work proposes a deeper study of *Lippia origanoides* and *Helianthus annuus* to evaluate their further application in Phytoremediation; and a specific phytostabilization study for the specie *Dieffenbachia cf. seguine* (Jacq.)Shott.

* College thesis

** Faculty of Science, School of Chemistry. Directed by Elena Stashenko, Jairo R. Martínez.

INTRODUCCIÓN

La introducción de cualquier sustancia que tenga la capacidad de provocar daños reversibles o irreversibles en el ambiente se conoce como contaminación ambiental y siempre ha estado asociada a la mayoría de las actividades humanas. La lista de contaminantes que se conocen actualmente es bastante larga y las sustancias que la conforman son diversas, sin embargo, las soluciones viables para su remediación suelen ser costosas y, algunas ambientalmente destructivas. Dentro de los contaminantes que hoy en día generan mayores problemas ambientales se encuentran los metales pesados, y el mercurio es uno de los que causa mayores problemas [1].

La presencia de mercurio en el ambiente se genera principalmente a través de fuentes antropogénicas, *e.g.* la actividad minera, la industria, el consumo de combustibles fósiles, residuos médicos, entre otros [2]. El mercurio puede ser arrojado al medio en cualquiera de sus especies químicas; este metal, una vez en el ambiente, puede cambiar su estado de oxidación dependiendo de las condiciones del lugar, pero el mercurio orgánico es particularmente el más perjudicial para los ecosistemas en general. Existen técnicas tradicionales de remediación para este metal contaminante, tales como los rellenos sanitarios, procesos de lavado y lixiviación y algunos tratamientos térmicos; no obstante, sus costos son muy elevados para aplicarse en las dimensiones que actualmente se requieren [2, 3]. Es por esto, existe la preocupación por desarrollar nuevas tecnologías que sean “amigables” con el medio y que además resulten más económicas. La biorremediación se considera mundialmente como una alternativa (ecológicamente responsable) a los métodos físicos de remediación, a menudo ambientalmente destructivos [4]. Esta opción se basa en la utilización de especies vivas, ya sean plantas o microorganismos, para transformar los contaminantes en sustancias menos

nocivas o removerlos del ambiente. Cuando se utilizan plantas para el tratamiento de matrices contaminadas, la técnica se denomina “fitorremediación”; en muchos estudios se ha mostrado su beneficio para el tratamiento de suelos contaminados con metales pesados, e.g. el mercurio.

Las plantas utilizadas en la fitorremediación de metales deben tener la capacidad de absorber el contaminante y translocarlo considerablemente a sus tejidos superiores (fitoextracción) [5,6]. También pueden estabilizar el metal reteniéndolo en sus raíces o convirtiéndolo a una forma menos tóxica (fitoestabilización) [7].

En la actualidad, la fitorremediación despierta gran interés por parte de la comunidad científica y, por ello, la investigación de nuevas especies de plantas que funcionen como agentes descontaminantes es un factor determinante en el avance de la técnica. Por tal razón, en el presente trabajo se planteó como objetivo principal la evaluación de la capacidad bioacumuladora de mercurio de siete especies de plantas, a saber: *Dieffenbachia cf. seguine* (Jacq.) Shott., *Lippia origanoides*, *Lippia alba*, *Helianthus annuus*, *Echeveria aff. gibbiflora* Moc. & Sessé ex DC., *Aloe vera* (L.) Burm. f. y *Lycopersicum esculentum*. Cada una de las especies se cultivó en suelo contaminado con mercurio durante dos meses, y una vez concluido este tiempo se determinó qué parte de la planta presentó mayor absorción del metal; así mismo, se evaluó el efecto del fertilizante NPK 15:15:15 sobre la bioacumulación de mercurio en la planta.

Los resultados del experimento mostraron que las especies *Dieffenbachia cf. seguine* (Jacq.) Shott., *Lippia origanoides*, *Lippia alba*, *Helianthus annuus* lograron factores de bioacumulación de mercurio ($[Hg]_{\text{Tejido}}/[Hg]_{\text{Total en el suelo}}$) altos en la raíz (0,29; 0,20; 0,18 y 0,16, respectivamente), cuando se les adicionó fertilizante tipo NPK. Así mismo, de acuerdo con la premisa de que las plantas aptas para fitoextracción deben tolerar las concentraciones del contaminante, absorberlo en la raíz y translocarlo considerablemente a los

tejidos superiores (hojas, tallo, flores, frutos, etc.), se encontró, que todas las especies evaluadas, excepto la *Lycopersicum esculentum*, toleraron la concentración de mercurio utilizada en el suelo ($11,2 \text{ ppm} < [\text{Hg}] < 16,7 \text{ ppm}$). Además, teniendo en cuenta que en este estudio no se adicionaron sustancias que aumentaran la biodisponibilidad del metal para la vegetación, las plantas de *Lippia organoides* y *Helianthus annuus* lograron una translocación significativa del metal en las hojas, ambas con factores de bioacumulación ($[\text{Hg}]_{\text{Tejido}}/[\text{Hg}]_{\text{Total en el suelo}}$) de 0,03. Lo anterior permite proponer a las especies *Lippia organoides* y *Helianthus annuus* como objeto de estudio en una investigación más profunda que evalúe su uso en la fitorremediación de mercurio y a la especie *Dieffenbachia cf. seguine* (Jacq.) Shott. como una posible planta capaz de fitoestabilizar el metal específicamente.

El presente trabajo consta de 92 páginas, 5 capítulos, 24 tablas, 9 figuras, 15 anexos y 98 referencias bibliográficas, y su desarrollo se llevó a cabo con el apoyo del Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander y de CENIVAM (Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Tropicales).

1. ESTADO DEL ARTE

1.1 EL MERCURIO Y FUENTES DE CONTAMINACIÓN

El mercurio es un contaminante global que está presente en suelo, agua, aire y en factores bióticos en los ecosistemas. Este metal pesado entra al medio ambiente como resultado de procesos naturales y antropogénicos. El mercurio que se libera naturalmente puede entrar a sistemas acuáticos y suelos mediante los siguientes procesos [8]:

1. Erosión de suelo mineralizado con mercurio y la formación de rocas.
2. Erupciones volcánicas y actividades geotermales.
3. Liberación del mercurio desde la subcorteza terrestre.

Por otro lado, las fuentes antropogénicas de mercurio se pueden atribuir a los siguientes factores [9]:

1. Quema de combustibles fósiles, madera, basura, lodos residuales y cremaciones.
2. Procesos de alta temperatura, *e.g.* fundiciones, producción de cemento y cal.
3. Actividades comerciales y de manufactura, *e.g.* procesamiento de metales, extracción de oro, minería, industria química e instrumental (compuestos químicos con mercurio, pinturas, baterías, termómetros, reactivos y catalizadores).
4. Otras fuentes, *e.g.* agricultura (pesticidas, fertilizantes y uso de estiércol).

Se estima que la emisión antropogénica de mercurio varía entre el 50 y el 75% de la emisión anual total a la atmósfera [8,10], y que ésta se ha triplicado durante los últimos 100 años [10]. La principal vía del transporte de mercurio al

ambiente es el intercambio a través de la superficie de suelos, océanos, ríos, lagos y vegetación con el aire. Además, otros transportes como los intercambios “suelo – vegetación” y “agua – vegetación” representan una amenaza para la salud de los seres humanos ya que el metal acumulado en las plantas puede ingresar a la dieta humana, directamente o a través del pescado, las aves y el ganado. Sin embargo, el intercambio de mercurio “suelo – vegetación” proporciona una posibilidad de remoción del metal del suelo mediante la absorción del mismo por parte de las plantas.

Las formas más comunes del mercurio son mercurio elemental (Hg^0) y dimetilmercurio. A escala global, el ciclo atmosférico está dominado por mercurio elemental (generalmente más de 95% de la carga total de Hg en aire), y una cantidad menor de otras especies tales como Hg particulado [11]. Tanto el metilmercurio como el dimetilmercurio han sido detectados en el aire [12], sin embargo, sus concentraciones están muy por debajo de las reportadas para formas de mercurio inorgánicas. Los niveles de mercurio atmosférico son generalmente mayores en áreas urbanas e industriales. En el año 2000 la Organización Mundial de la Salud reportó concentraciones de mercurio de 600 y 1500 ppm cerca de minas y refinerías [13].

En cuanto al agua, el mercurio se encuentra principalmente en la forma Hg^{2+} como un complejo salino unido a partículas disueltas, y en el caso de sedimentos, el mercurio se encuentra unido al azufre, así como también a materia orgánica y partículas inorgánicas [14]. Las concentraciones en ríos, lagos, lluvia y nieve varían notoriamente dependiendo de las condiciones ambientales. Un estudio realizado en 2004 mostró que el agua de los océanos presenta concentraciones que varían entre 0,3 y 4,4 ng/L [15].

Las concentraciones de mercurio reportadas para el suelo superficial se encuentran entre 0,003 y 4,6 $\mu\text{g/g}$ a escala global [16]. Sin embargo, los niveles de mercurio en sitios contaminados son más elevados, ejemplo de ellos

son Ganjam (India) y Almadén (España), en donde se han encontrado concentraciones de mercurio de 557 y 550 mg/kg, respectivamente [17,18].

El estado químico en el cual se encuentra el mercurio en el suelo está relacionado con propiedades tales como el carácter químico de la fase acuosa, el pH, el potencial de reducción y el contenido orgánico en la matriz del suelo, pues posee una alta afinidad por este tipo de materia [19]. Además de lo anterior, este metal se adsorbe a sustancias minerogénicas como minerales arcillosos y óxidos de hierro, aluminio y manganeso. Debido a que el mercurio se halla fuertemente unido a los constituyentes del suelo ya mencionados, normalmente sólo se encuentran trazas de él en la solución del suelo [19], que es en donde se presentan formas disueltas del metal como iones libres y sus complejos solubles los cuales son fácilmente utilizados por organismos vivos.

El mercurio elemental, así como el mercurio orgánico neutro $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, se caracteriza por una presión de vapor significativa que lo hace muy volátil, y su vaporización puede ocurrir a partir de suelos contaminados en donde se encuentren especies del metal que estén débilmente adsorbidas por la superficie de minerales y materia orgánica [20]. El mercurio presente en el suelo puede sufrir transformaciones, por ejemplo, la reducción del Hg^{2+} a Hg^0 . Esta transformación puede darse por los ácidos húmico y fúlvico, que tienen la capacidad de reducir el Hg^{2+} mediante un proceso promovido por la luz solar [21,22]. Algunas bacterias son capaces también de reducir enzimáticamente el Hg^{2+} a Hg^0 , utilizando mercurio reductasa (MerA) [2] (**Figura 1a**). Otro tipo de transformación que se presenta se debe a la actividad de la enzima liasa organomercurial (MerB) existente en algunos microorganismos; esta enzima cataliza el rompimiento del enlace carbono – mercurio de varias formas de mercurio orgánico [23] (**Figura 1b**).

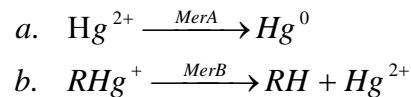


Figura 1. Reacciones enzimáticas de: a).Mercurio iónico Hg^{2+} y b).Mercurio orgánico RHg^+ .

Con respecto a la exposición ambiental, el metilmercurio presenta los efectos más críticos. Bacterias como las sulfato reductoras son capaces de metilar el Hg^{2+} y convertirlo en CH_3Hg^+ [24, 25]. En general, cerca del 1% del mercurio total en los sedimentos se convierte al metilmercurio, principalmente, por actividad bacteriana; se ha reportado que la metilación de mercurio ocurre con mayor intensidad en la capa superficial del suelo, aproximadamente en los 16 cm externos [26].

1.2 RIESGOS QUE PRODUCE EL MERCURIO PARA LA SALUD

El mercurio y sus compuestos son persistentes, bioacumulativos y tóxicos, y representan una amenaza para la salud de los seres humanos y para los ecosistemas. Las exposiciones a este metal tales como respirar aire contaminado, comer productos que lo contengan (especialmente, pescado) o entrar en contacto con material contaminado, pueden ocasionar daños neurológicos devastadores, daños renales e incluso la muerte [27]. Actividades históricas y recientes, incluyendo la minería de oro, plata y de mercurio como tal, han originado la contaminación de ecosistemas acuáticos y terrestres [9].

Los suelos contaminados con mercurio constituyen un riesgo para la salud humana y son responsables de la fitotoxicidad. Además, sus aguas de lixiviado pueden llegar a los ecosistemas acuáticos afectando a los peces y a los animales que los consumen. Por esto, los numerosos sitios contaminados que existen en el mundo demandan alternativas de remediación.

1.3 FITORREMEDIACIÓN

1.3.1 Generalidades. La idea básica de que las plantas se puedan utilizar para remediación ambiental es muy antigua y no puede adjudicarse a ninguna fuente particular. Sin embargo, una serie de descubrimientos científicos fascinantes, combinados con una investigación interdisciplinaria, han permitido el desarrollo de esta idea como una tecnología ambiental prometedora, llamada fitorremediación. La fitorremediación está definida como el uso de plantas para remover contaminantes del ambiente o para convertirlos en sustancias inofensivas. Esta técnica está siendo desarrollada como una solución potencial de remediación en miles de sitios contaminados en los Estados Unidos y en otros países [28]. Esta tecnología puede aplicarse a contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en el suelo (sustrato sólido), en agua (sustrato líquido) o en aire [29]. Las plantas pueden compararse con bombas dirigidas por la luz solar, que extraen y concentran ciertos elementos desde el ambiente [30]. Sin embargo, la habilidad de acumular metales pesados varía significativamente entre especies y entre diferentes cultivos. Una vez la cosecha de plantas está enriquecida con el contaminante, el peso y el volumen del material vegetal resultante pueden reducirse por incineración o compostaje. Las plantas que se han utilizado para fitorremediar metales pesados, al final del proceso pueden tratarse como material peligroso o, si es factible económicamente, puede recuperarse el metal de ellas [29].

Dentro de este campo de estudio también se ha investigado la modificación genética para mejorar la resistencia de las plantas hacia diferentes contaminantes. Un ejemplo de ello fue la inserción del gen de la enzima mercurio iónico reductasa de bacterias (*merA*) en *Arabidopsis thaliana*, que transformó a la planta en un espécimen resistente al mercurio [4, 31]. Estudios similares se han realizado expresando los genes *merA* y *merB* en plantas de tabaco y se obtuvieron plantas más resistentes y de mayor capacidad para acumular el metal [4].

Como alternativa a los métodos para optimizar la fitorremediación utilizando plantas transgénicas, se han reportado prácticas agronómicas que pueden llevarse a cabo para mejorar la técnica utilizando plantas sin modificación genética; éstas son las siguientes: adición de fertilizantes, de agentes quelantes y el ajuste del pH [2,28].

Muchos contaminantes han sido estudiados para evaluar si esta técnica ofrece una alternativa viable de solución y, particularmente, los metales pesados como el mercurio “objeto de estudio de este proyecto”, para el cual se han obtenido resultados positivos. Los siguientes son las plantas y algunos reportes encontrados para metales pesados: *Thlaspi caerulescens* y *Silene vulgaris* para Cd y Zn, respectivamente [32]; *Brassica oleracea*, *Raphanus sativus*, *Thlaspi caerulescens*, *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum murale* y *Arabidopsis thaliana* para Zn, Cd, Ni, Cu, Pb y Cr, respectivamente [33].

En la **Tabla 1** se muestran algunas plantas, objeto de estudio en la fitorremediación con mercurio, y el respectivo año de investigación. Los nombres comunes de las plantas mencionados en la **Tabla 1** son traducciones literales de la palabra y en algunos casos se deja el nombre común en inglés por no encontrar uno equivalente en español, sin embargo, la referencia fundamental es el nombre científico.

Tabla 1. Muestra de varias plantas que han sido estudiadas en la fitorremediación de mercurio, la modificación genética (si la hay) y el año en que se reportó el trabajo.

Nombre de la planta	Nombre botánico	Modificación genética	Ref.	Año
Guisante	<i>Pisum sativum L</i>	---	[34]	1977
Hierba buena	<i>Mentha spicata L.</i>	---	[34]	1977
Picea de Noruega	<i>Picea abies (L) H. Karst</i>	---	[35]	1988
<i>Earwort</i>	<i>Scapania undulata</i>	---	[36]	1996

Continuación, **Tabla 1**

Álamo amarillo transgénico	<i>Liriodendron tulipifera</i>	Gen mer A, codifica la enzima mercurico-reductasa	[37]	1998
Trébol de agua	<i>Marsilea drummondii</i>	---	[38]	1999
<i>Iris-leaved rush</i>	<i>Juncus xiphioides E. Mey.</i>	---	[38]	1999
<i>Mare tail</i>	<i>Hippuris vulgaris L.</i>	---	[38]	1999
<i>Monkeyflower</i>	<i>Mimulus guttatus Fisch.</i>	---	[38]	1999
<i>Parrot feather</i>	<i>Myriophyllum brasiliense Camb.</i>	---	[38]	1999
<i>Juncia</i>	<i>Cyperus pseudovegetus</i>	---	[38]	1999
<i>Smart weed</i>	<i>Polygonum hydropiperoides L.</i>	---	[38]	1999
<i>Smooth cordgrass</i>	<i>Spartina alterniflora Loisel</i>	---	[38]	1999
<i>Striped rush</i>	<i>Baumea rubiginosa</i>	---	[38]	1999
Planta sombrilla	<i>Cyperus alternifolius L.</i>	---	[38]	1999
Lechuga de agua	<i>Pistia stratiotes L.</i>	---	[38]	1999
<i>Yellow dots</i>	<i>Wedelia trilobata Hitchc.</i>	---	[38]	1999
<i>Mouse-ear cress</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Genes MerA y MerB	[28, 31]	2000
Helecho de agua	<i>Azolla caroliniana</i>	---	[39]	2003
Tabaco	<i>Nicotiana tabacum</i>	Genes Mer A y Mer B	[4]	2003
Junco de laguna	<i>Scirpus tabernaemontani</i>	---	[40]	2005
Taro, ñamera	<i>Colocasia sculenta</i>	---	[40]	2005
Acedera o vinagrera	<i>Rumex induratus</i>	---	[18]	2005
Toronjil cuyano	<i>Marrubium vulgare L</i>	---	[18]	2005

Continuación, **Tabla 1**

Álamo oriental transgénico	<i>Populus deltoides</i>	Gen Mer B	[18]	2006
Brezo	<i>Erica andevalensis</i>	---	[41]	2007
Brezo rubio	<i>Erica australis</i>	---	[41]	2007
Ceratófila	<i>Ceratophyllum demersum</i>	---	[42]	2008
<i>Florida elodea</i>	<i>Hydrilla verticillata</i>	---	[42]	2008
<i>Water spinach</i>	<i>Ipomoea aquatica</i>	---	[42]	2008
Carretón de agua	<i>Marsilia quadrifolia</i>	---	[42]	2008
<i>Meadowfoam</i>	<i>Limnanthes spp.</i>	---	[42]	2008
<i>False Daisy</i>	<i>Eclipta alba</i>	---	[42]	2008

La fitominería es una técnica derivada de la fitorremediación que ofrece la posibilidad de explotar minerales con un mínimo impacto ambiental y que, de hacerlo de otra forma, no sería ventajoso [43]. Esta técnica propone el cultivo de plantas hiperacumuladoras en suelo mineralizado o de bajo grado de mineralización, para luego recolectar el material vegetal, incinerarlo y producir “bio-mineral” comercial.

Finalmente, cabe aclarar, que la fitorremediación es una alternativa muy importante a considerar, ya que además de ser menos costosa que otras técnicas (Véase **Tablas 2 y 3**), tiene menor impacto ambiental, y permite recuperar el metal en algunos casos [33]. Sin embargo, existen restricciones en cuanto a los niveles de contaminación a tratar, ya que puede ocurrir que la planta no tolere concentraciones excesivas [44].

Tabla 2. Comparación de costos entre la fitoextracción de metales pesados y otras opciones de tratamiento [3].

Tipo de tratamiento	Costo por m ³ , US \$	Tiempo requerido, meses	Factores adicionales / costos	Medidas de seguridad
Fitoextracción	15 - 40	18 – 60	Tiempo / Requerimientos del suelo	Disposición de residuos

Continuación, **Tabla 2**

Fijación	90 - 200	6 – 9	Transporte/ excavación, monitoreo a largo plazo	Lixiviado
Relleno sanitario	100 - 400	6 – 9	Monitoreo a largo plazo	Lixiviado
Extracción del suelo y lixiviación	250 - 500	8 – 12	5000 m ³ mínimo reciclaje químico	Disposición de residuos

Tabla 3. Comparación de costos entre fitorremediación y otras opciones de tratamiento de diversos contaminantes [3].

Tipo de tratamiento	Intervalo de costos por tonelada, US \$
Fitorremediación	10 – 35
Biorremediación <i>In situ</i>	50 – 150
Extracción al vacío del suelo	20 – 220
Lavado del suelo	80 – 200
Calentamiento indirecto	120 – 300
Solidificación / Estabilización	240 – 340
Extracción con solvente	360 – 440
Incineración	200 – 1500

1.3.2 Contaminantes que pueden tratarse con la fitorremediación. Es importante distinguir entre la fitorremediación de contaminantes elementales y la de contaminantes orgánicos. Los contaminantes elementales son esencialmente inmutables, ya que por ningún proceso biológico o físico, a menos de que sea fisión o fusión nuclear, pueden transformarse. Por esta razón, su remediación presenta problemas técnicos y científicos especiales. Dentro de los principales contaminantes se encuentran elementos pesados tóxicos, tales como arsénico, cadmio, cesio, cromo, plomo, mercurio, estroncio, tecnecio y uranio. Con algunas notables excepciones, los mejores escenarios para la fitorremediación de contaminantes elementales incluyen plantas que extraen y translocan un catión tóxico o un oxianión a los tejidos superiores de la

planta, plantas que convierten el elemento a una especie química menos tóxica, o especies que secuestran el elemento contaminante en sus raíces para prevenir la lixiviación en el lugar [4].

Por su parte, el tratamiento con plantas que suele utilizarse para contaminantes orgánicos implica una transformación de la sustancia a otra más simple y menos tóxica. Para ellos, se utilizan plantas fitodegradadoras capaces de segregarse exudados radiculares que actúan sobre los contaminantes y los convierten en especies más simples y menos peligrosas. También pueden aprovecharse los microorganismos propios de la rizosfera de las plantas para transformar los contaminantes y realizar así una degradación indirecta.

En muchos casos es necesaria la sobre-expresión de los genes existentes en la planta o la expresión transgénica de genes animales o bacterianos requeridos para mejorar cualidades de la planta fitorremediadora.

1.3.3 Tipos de fitorremediación. La fitorremediación es una alternativa de remediación bastante amplia y comprende diversas técnicas que pueden aplicarse según el caso. En la **Tabla 4** se resume cada uno de los tipos de fitorremediación.

Tabla 4. Tipos de fitorremediación, descripción y aplicaciones [45].

Tipo	Proceso involucrado	Contaminación tratada
Fitoextracción	Las plantas se usan para concentrar metales en las partes cosechables (hojas y tallos).	Cadmio, cobalto, cromo, níquel, mercurio, plomo, selenio, zinc.
Rizofiltración	Las raíces de las plantas se usan para absorber, precipitar y concentrar metales pesados a partir de efluentes líquidos contaminados y para degradar compuestos orgánicos.	Cadmio, cobalto, cromo, níquel, mercurio, plomo, selenio, zinc, isótopos radioactivos, compuestos orgánicos.

Continuación, **Tabla 4**

Fitoestabilización	Las plantas tolerantes a metales se usan para reducir la movilidad de los mismos y evitar el pasaje a capas subterráneas o al aire.	Lagunas de deshecho de yacimientos mineros. Propuesto para compuestos fenólicos y compuestos clorados.
Fitoestimulación	Se usan los exudados radiculares para promover el desarrollo de microorganismos degradativos (bacterias y hongos).	Hidrocarburos derivados del petróleo y poliaromáticos, benceno, tolueno, atrazina, etc.
Fitovolatilización	Las plantas captan y modifican metales pesados o compuestos orgánicos y los liberan a la atmósfera con la transpiración.	Mercurio, selenio y solventes clorados (tetraclorometano y triclorometano).
Fitodegradación	Las plantas acuáticas y terrestres captan, almacenan y degradan compuestos orgánicos para dar subproductos menos tóxicos o no tóxicos.	Municiones (TNT, DNT, RDX, nitrobenzeno, nitrotolueno), atrazina, solventes clorados, DDT, pesticidas organofosforados, fenoles y nitrilos, etc.

Para la remediación de metales pesados utilizando plantas se emplean principalmente dos tipos de fitorremediación, *i.e.* la fitoextracción y la fitoestabilización. A continuación, se profundizará en cada una de estas dos técnicas.

1.3.3.1 Fitoextracción. El término “fitoextracción” se refiere principalmente a la remoción de metales pesados o radionucleidos del suelo gracias a sus capacidades de retener estos elementos. Las plantas pueden acumular metales pesados esenciales para su crecimiento tales como hierro, manganeso, zinc, cobre, magnesio, molibdeno y, posiblemente, níquel. Además, algunas de ellas tienen la capacidad de acumular metales pesados sin ninguna función biológica conocida, *e.g.* cadmio, cromo, plomo, cobalto, plata, selenio y mercurio [5, 6]. Para el metabolismo de metales, las plantas

requieren un balance entre la toma de iones metálicos esenciales para mantener su crecimiento y desarrollo, y la habilidad de proteger la actividad y estructura celular de los niveles excesivos de metales esenciales y no esenciales. La resistencia de las plantas a los iones metálicos pesados puede lograrse por mecanismos que incluyen principalmente la inmovilización del metal en las raíces y en las paredes celulares. La tolerancia a los metales pesados se basa en la captura de los iones metálicos en las vacuolas, enlazándolos a los ligandos apropiados tales como ácidos orgánicos, proteínas y péptidos en presencia de enzimas que pueden funcionar en medios con niveles altos de iones metálicos [46, 47].

La fitoextracción de metales pesados representa una de las oportunidades económicas más grandes para la fitorremediación debido al tamaño y al alcance de los problemas ambientales asociados con la contaminación de suelos por metales, y a la ventaja competitiva ofrecida por la tecnología de remediación con plantas [28].

La planta “ideal” para ser usada en fitoextracción debe tener las siguientes características [33]:

- Ser tolerante a altos niveles del metal;
- Acumular altos niveles del metal en sus tejidos;
- Tener una rápida tasa de crecimiento y una biomasa considerable en la que pueda acumular el metal;
- Tener un profuso sistema de raíz.

Curiosamente, la capacidad de las plantas para concentrar metales ha sido usualmente considerada un rasgo perjudicial porque algunas de ellas pueden ser fuentes, directas o indirectas, de metales tóxicos que finalmente son ingeridos por los humanos [48, 49].

La ingestión dietética de metales pesados a través del consumo de plantas cosechadas puede tener efectos en la salud a largo plazo. Naturalmente, existen plantas llamadas “hiperacumuladoras de metales”, que pueden concentrar de 10 a 500 veces más cantidad de estos elementos, en comparación con otras especies [50]. De acuerdo con Raskin *et al.* [28], el grado de acumulación de metales como níquel, zinc y, posiblemente, el cobre, a menudo alcanza 1-5% del peso seco en plantas hiperacumuladoras, siendo éste un orden de magnitud mayor del encontrado en plantas no acumuladoras sembradas en sitios contaminados. El problema de las plantas acumuladoras conocidas es que éstas no poseen gran biomasa en comparación con la de plantas no acumuladoras; por tal razón, la mayoría de la investigación ha sido enfocada a la evaluación de la capacidad acumuladora de metales en plantas de alta biomasa que se cultivan fácilmente usando prácticas agronómicas establecidas [33]. De acuerdo con algunos autores [50], los fenotipos hiperacumuladores naturales parecen ser mucho más importantes que una alta capacidad de producción cuando se usan plantas para remediar suelos contaminados con metales. La principal función del fenómeno de hiperacumulación consiste en la defensa contra herbívoros y la prevención de enfermedades en las plantas [5, 51-54].

Existen dos tipos de fitoextracción [29], a saber: la asistida por quelatos o inducida, y la fitoextracción continua.

Fitoextracción asistida por quelatos o inducida. La fitoextracción asistida por quelatos o inducida ha sido utilizada como una forma de facilitar la toma de micronutrientes para las plantas, y para mantener la solubilidad de los micronutrientes en soluciones hidropónicas [30]. Esta estrategia de fitoextracción está basada en el hecho de que la aplicación de agentes quelantes en el suelo realza significativamente la acumulación de metales en plantas. Esto se debe a que bajo muchas circunstancias en el suelo es común encontrar casos de baja biodisponibilidad de los metales, lo que impide el

proceso de remediación. Debido a este fenómeno, la acumulación de metales en los tejidos de plantas de cultivos hidropónicos es mucho mayor comparada con la acumulación en las plantas sembradas en suelo [33]. Por ejemplo, el plomo es poco soluble en el rango normal del pH del suelo, es decir, no es biodisponible para la planta [28], por lo tanto, la vegetación creciente en áreas altamente contaminadas con este metal a menudo presenta menos de 50 mg/g de plomo en sus ramas [49]. Una gran proporción de metales permanece adsorbida en los constituyentes sólidos del suelo, lo cual dificulta su extracción por parte de la planta. La formación de quelatos previene la precipitación y la adsorción de los metales en el suelo, manteniendo así la disponibilidad de éstos para que la planta pueda adsorberlos [30]. La adición de quelatos al suelo no sólo permite movilizar los metales ya presentes en forma iónica en el suelo, sino también movilizar aquellos metales que están formando otros compuestos, por ejemplo, óxidos. Afortunadamente, el descubrimiento de que la aplicación de ciertos agentes quelantes al terreno de siembra incrementa la translocación de metales pesados desde el suelo a los tejidos de la planta ha abierto una nueva alternativa en el campo de la fitoextracción de metales [55].

Fitoextracción continua. La fitoextracción continua depende de la habilidad natural de algunas plantas para acumular y resistir cantidades grandes de metales durante el ciclo completo de crecimiento. En este contexto, las plantas hiperacumuladoras son las más adecuadas para la fitoextracción de suelos contaminados con metales. Sin embargo, es importante enfatizar que incluso la mejor acumuladora, la *Thlaspi caerulescens* (*Brassicaceae*) toma bastante tiempo de cultivo continuo (13 – 14 años) para limpiar un sitio de níquel y zinc [32,33].

La mayoría de especies acumuladoras de metales conocidas hasta hoy se descubrieron en suelos con alto contenido de metales pesados. Se sugiere que la acumulación está asociada con la resistencia a la concentración del metal [5]. Estudios realizados anteriormente han demostrado que la habilidad de

acumular metales varía notablemente entre especies y entre individuos de la misma especie [30].

1.3.3.2 Fitoestabilización. Esta técnica consiste en usar la raíz de las plantas para reducir la movilidad o la biodisponibilidad de los contaminantes en el ambiente [7]. Las plantas utilizadas en la fitoestabilización deben ser eficientes acumuladoras en las raíces, deben tener bajos niveles de translocación del contaminante a los tejidos superiores y, además, deben contar con un sistema radicular amplio. El uso potencial de árboles, especialmente de sauces, para la fitoestabilización de suelos contaminados con metales pesados ha recibido gran atención en los últimos diez años [7].

1.3.4 Ventajas y desventajas de la fitorremediación. Macek *et al.* [56] revisaron las ventajas y desventajas de la fitorremediación; entre las principales ventajas figuran las siguientes:

- Costos de operación bajos;
- Impacto sobre el ambiente menor comparado con otras técnicas;
- Aplicación *in situ*, que evita hacer excavaciones y alterar más el ecosistema;
- Posibilidad de operaciones a gran escala;
- Proceso relativamente fácil de desarrollar con los recursos y equipos utilizados en agricultura;
- Alta probabilidad de aceptación por parte de la comunidad.

Como cualquier otro método de remediación ambiental, la fitorremediación posee también algunas desventajas, entre las cuales se pueden mencionar las siguientes:

- El proceso es lento comparado con los de otras alternativas para restaurar áreas contaminadas;

- Las condiciones climáticas y geológicas del sitio contaminado tales como temperatura, altitud y tipo de suelo, pueden limitar su aplicación;
- Los métodos biológicos no son capaces de eliminar el 100% de los contaminantes;
- La formación de vegetación es limitada por la toxicidad extrema de algunos sitios afectados;
- La necesidad de cuidado y seguimiento de las plantas acumuladoras después de la remediación, para evitar la reemisión del contaminante.

1.3.5 Interacción de las plantas con el mercurio. Las plantas tienen la capacidad de extraer una gran variedad de iones metálicos de los sustratos en donde crecen, incluyendo metales pesados como el mercurio. Estudios han demostrado la capacidad de algunas especies de plantas de acumular mercurio en sus tejidos al ser expuestas a suelos contaminados con el metal [17, 57-59]. También se ha encontrado que esta acumulación es mucho más alta en las raíces, en comparación con la de los tejidos superiores [34, 35, 60]. La forma cómo se encuentra el mercurio en el sustrato no es indiferente a la cantidad de metal que acumula una planta; investigaciones han evidenciado que las plantas absorben mayor cantidad de Hg cuando éste está presente en forma orgánica, que cuando se encuentra como mercurio inorgánico [35, 59, 61]. Además, se ha encontrado que la absorción del metal se lleva a cabo no sólo a través de las raíces; investigaciones han concluido que puede ocurrir ingreso de mercurio gaseoso a la planta por los estomas durante los procesos de respiración [60, 62], que puede incrementarse con el aumento de la concentración de mercurio gaseoso, la temperatura y la iluminación [63]. Otra forma de absorción de mercurio desde las hojas ocurre a partir de mercurio particulado que se deposita en la superficie de las mismas [64]. Este mercurio puede posteriormente liberarse a la atmósfera en forma gaseosa [65, 66]. Adicional a esto, hay reportes [67], que indican que a bajas concentraciones externas de

Hg, su liberación es mayor que la absorción desde el aire. Este fenómeno fue comprobado para las especies *Picea abies L.*, *Liriodendron tulipifera L.*, *Quercus alba L.* y *Hacer rubrum L.* Resultados similares para este comportamiento fueron también encontrados por varios investigadores [68]. Esta evidencia sugiere que el follaje puede controlar tanto la absorción como la volatilización del mercurio gaseoso [69].

Todos los procesos fisiológicos y bioquímicos en las plantas se afectan negativamente por el mercurio, sobre todo, cuando las plantas son expuestas a aire, agua o suelo contaminados [70]. El mercurio elemental no reacciona con la mayoría de las biomoléculas, a menos que se oxide a Hg^{2+} , transformación que puede ser catalizada por enzimas como la peroxidasa o la catalasa [71, 72]. Los cationes de mercurio poseen alta afinidad por los grupos sulfhidrilo (-SH) presentes en muchas proteínas y, por lo tanto, el metal adquiere la capacidad de alterar la mayoría de sus funciones [73]. Como se mencionó anteriormente, el mercurio orgánico se acumula más fácilmente en los tejidos de la planta y, particularmente, esta forma de mercurio es 1 ó 2 órdenes de magnitud más tóxica para células eucariotas [74]. El comportamiento biofísico del mercurio orgánico se debe a su hidrofobicidad y a su alta permeabilidad en las membranas celulares [75]. Sin embargo, el mercurio en general afecta la fotosíntesis, la absorción de nutrientes minerales, la transpiración [35, 61, 70, 76] e incluso algunas especies químicas de este metal son capaces de unirse al ARN y ADN [60, 77].

1.4 CIENCIOMETRÍA

Como lo muestra la **Tabla 5**, durante los últimos años se ha incrementado notoriamente la investigación sobre la fitorremediación en general, sin embargo, de los estudios totales sólo aproximadamente el 3% corresponde a fitorremediación de mercurio, siendo el año 2006 el de mayor actividad

científica en este tema. El área con mayor investigación en la fitorremediación de mercurio es la de ciencias ambientales; la revista con mayor número de publicaciones sobre este tema es *Water, Air and Soil Pollution* y el autor más destacado es Meagher R.B. con 12 y 10 artículos encontrados en las bases de datos de *Scopus* y *Web of Science*, respectivamente. A diferencia de los artículos sobre la fitorremediación de mercurio, las patentes en este tema corresponden al 31% de todas las patentes relacionadas con la fitorremediación en general. Lo anterior demuestra el gran interés de la comunidad científica sobre esta alternativa de remediación de mercurio y confirma, que esta técnica es una buena opción para descontaminación de suelos. Ello justifica el desarrollo de este proyecto, ya que conduce a la búsqueda de nuevas plantas capaces de bioacumular Hg; así como permite la implementación de técnicas analíticas rápidas y seguras para el monitoreo de este proceso.

Tabla 5. Principales resultados encontrados sobre la actividad científica en el campo de la fitorremediación de mercurio en las bases de datos *Scopus* y *Web of Science (ISI Web of Knowledge)*. Fecha de búsqueda: 21 de julio de 2008.

	SCOPUS		WEB OF SCIENCE (ISI Web of Knowledge)	
	Phytoremediation¹	Mercury phytoremediation²	Phytoremediation³	Mercury phytoremediation⁴
No. Total de artículos	2240	68	1951	54
3 Años con mayor cantidad de publicaciones	2007 (374) 2006 (330) 2005 (282)	2007 (9) 2006 (13) 2005 (9)	2007 (369) 2006 (300) 2005 (315)	2006 (14) 2005 (11) 2003 (7)
3 Autores con mayor número de publicaciones	Terry, N. (30) Schnoor, J.L. (30) Banks, M.K. (29)	Meagher, R.B. (12) Rugh, C.L. (8) Terry, N. (5)	Ma, L.Q. (28) Banks, M.K. (23) McGrath, S.P. (22)	Meagher, R.B. (10) Heaton, A.C.P. (7) Kim, T. (5)
3 Revistas con mayor número de publicaciones	- <i>International Journal of Phytoremediation</i> (168) - <i>Chemosphere</i> (152) - <i>Environmental Pollution</i> (117)	- <i>Environmental Pollution</i> (3) - <i>Water, Air and Soil Pollution</i> (3) - <i>Fresenius Environmental Bulletin</i> (3)	- <i>Chemosphere</i> (144) - <i>International Journal of Phytoremediation</i> (143) - <i>Environmental Pollution</i> (117)	- <i>Water, Air and Soil Pollution</i> (4) - <i>Chemosphere</i> (3) - <i>Environmental Pollution</i> (3)
3 Áreas de mayor investigación	- <i>Environmental sciences</i> (1155) - <i>Agricultural and biological sciences</i> (856) - <i>Biochemistry, genetics and molecular biology</i> (270)	- <i>Environmental sciences</i> (30) - <i>Biochemistry, genetics and molecular biology</i> (17) - <i>Agricultural and biological sciences</i> (16)	- <i>Environmental sciences</i> (1007) - <i>Plant science</i> (372) - <i>Soil science</i> (192)	- <i>Environmental sciences</i> (23) - <i>Plant science</i> (14) - <i>Biotechnology and applied microbiology</i> (9)
No. Total de patentes	453	139	-	-
Oficinas con sus respectivas patentes	- <i>US Patent Office</i> (280) - <i>World Intellectual Property Organization</i> (141) - <i>European Patent Office</i> (32)	- <i>US Patent Office</i> (90) - <i>World Intellectual Property Organization</i> (44) - <i>European Patent Office</i> (5)	-	-

¹ Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (Phytoremediation)

² Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (Mercury phytoremediation)

³ Ecuación de búsqueda: Topic= (Phytoremediation), Timespan= All years, Refined by: Document Type=(ARTICLE).

⁴ Ecuación de búsqueda: Topic= (Mercury phytoremediation), Timespan= All years, Refined by: Document Type=(ARTICLE).

1.5 ANÁLISIS DE MERCURIO

1.5.1 Espectrómetro de absorción atómica RA-915⁺. El analizador de mercurio RA-915⁺ (Lumex Ltda., St. Petersburgo, Rusia) permite la determinación directa de mercurio en diferentes tipos de muestras gracias a que convierte el mercurio enlazado a su forma atómica, y ello con preparación mínima de la muestra.

El equipo consta de una fuente de radiación (lámpara de mercurio), que emite una línea de mercurio con una longitud de onda de 254 nm, que es ubicada en un campo magnético permanente. Esta línea se divide en tres componentes polarizados (π , σ^- , σ^+). Cuando la radiación se propaga, alcanza un fotodetector que es sensible sólo a la radiación de los componentes sigma. En ausencia de vapor de mercurio las intensidades de radiación para los componentes σ son iguales y en presencia de átomos absorbentes se registra una diferencia entre las intensidades de los componentes σ , la cual es proporcional a la concentración de mercurio [78].

Para la cuantificación de mercurio en matrices sólidas y líquidas se utilizan dos aditamentos, RP-91C y RP-91. En el caso de las muestras gaseosas se usa únicamente el analizador RA-915⁺, conectado a un computador con el *software* del equipo. El mismo analizador permite bombear la muestra gaseosa y llevarla al detector; los resultados se registran simultáneamente durante la medición.

1.5.2 RP-91C, aditamento para la cuantificación de mercurio en matrices sólidas. Para la determinación de mercurio en matrices sólidas con el analizador RA-915⁺ se hace un acoplamiento de éste con el aditamento para pirólisis RP-91C (Lumex Ltda., St Petersburgo, Rusia). En la **Figura 2** se observa un esquema general del analizador.

- A. Portamuestra
- B. Primer atomizador
- C. Segundo atomizador
- D. Celda analítica externa
- E. Unión de vidrio en forma de T
- F. Tubos de conexión de silicona
- G. Filtro de absorción de Hg
- H. Rotámetro
- J. Analizador RA-915+
- I. Bomba
- K. Computador

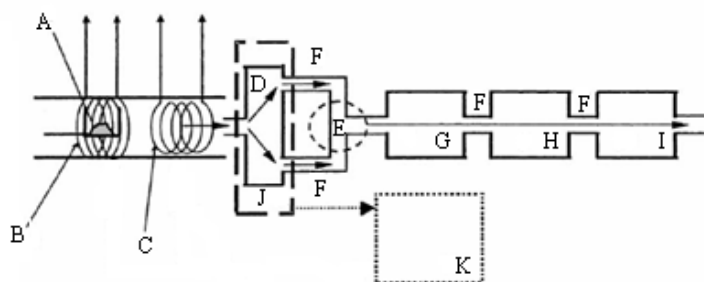


Figura 2. Esquema general del analizador RA-915⁺ [79].

Para el análisis de matrices sólidas, la muestra se ubica en un portamuestra de cuarzo que se inserta en el primer atomizador, cuya temperatura es de 750°C. En esta sección ocurre la evaporación de los compuestos de mercurio y una disociación parcial de éstos en átomos. Seguidamente, con ayuda de un flujo de aire, los compuestos de mercurio se transportan al segundo atomizador en el cual la temperatura es de ca. 800°C y en donde ocurre la disociación total de los compuestos de mercurio. Posteriormente, la mezcla aire-mercurio se dirige hacia la celda analítica externa, y el analizador RA-915⁺ detecta los átomos del metal. Los datos obtenidos se procesan y se muestran por un computador. Finalmente, la mezcla aire-mercurio pasa a través de tubos de silicona conectores, una unión de vidrio en forma de T, un filtro de absorción de mercurio y un rotámetro. La bomba se encarga de pasar el aire por los atomizadores y la celda analítica. El aditamento permite detectar mercurio en matrices complejas como suelos, rocas, sangre, cabello, aceites, entre otros.

1.5.3 RP-91, aditamento para la cuantificación de mercurio en matrices líquidas. La determinación de mercurio en muestras líquidas con el analizador RA-915⁺ se lleva a cabo por la técnica de vapor frío y se realiza con el aditamento RP-91 (Lumex Ltda., St Petersburg, Rusia), ver **Figura 3**. El principio de funcionamiento del aditamento RP-91 está basado en la reducción del mercurio iónico a mercurio en estado atómico, el cuál se transporta por un flujo de aire hasta la celda analítica del equipo RA-915⁺.

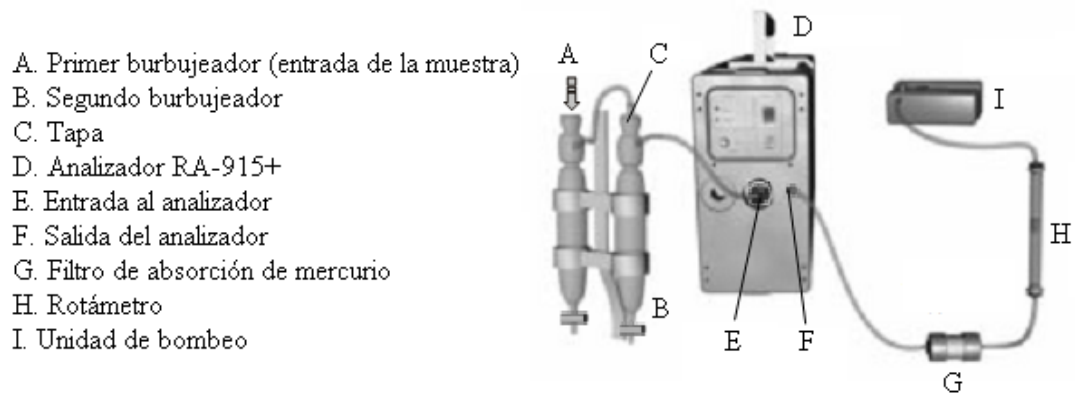


Figura 3. Representación del acoplamiento RA-915⁺/RP-91 [80].

Para el análisis de matrices líquidas en modo multipaso se adicionan en el primer burbujeador de 3 a 4 mL de solución reductora (Véase el **Numeral 2.9**) y, posteriormente, se agregan 5 mL de muestra. Durante el burbujeo de la mezcla, o bombeo de aire, ocurre la reducción del mercurio presente en la muestra. El mercurio reducido pasa a través de las conexiones de silicona y llega al analizador RA-915⁺ donde el mercurio atómico se detecta. Los datos obtenidos se procesan y se muestran por un computador. Finalmente, la mezcla aire-mercurio pasa por un filtro de absorción de mercurio. La unidad de bombeo se encarga de generar el burbujeo dentro de la mezcla y de hacer pasar aire a través de todo el sistema.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 ADECUACIÓN DEL SUELO PARA EL EXPERIMENTO

La adición de mercurio al suelo se realizó por medio de una solución de cloruro de mercurio (24 ppm) (99,5%, Carlo Erba *Reagents*, Milan, Italia). La solución se aplicó al suelo en una proporción de 3:1 (suelo:solución). La mezcla resultante se agitó posteriormente hasta obtener una apariencia homogénea. Finalmente, la mezcla se dejó secar en la sombra por aproximadamente 5 días hasta que tuvo un aspecto apropiado para sembrar en ella las plantas a estudiar (Véase el **Anexo A**).

Antes de sembrar las plantas se tomó una muestra inicial del suelo contaminado, para cuantificar el mercurio incorporado. También se reservó una muestra de suelo sin contaminar (blanco) para determinar su concentración inicial de mercurio. Las muestras se almacenaron bajo refrigeración para su posterior análisis.

2.2 OBTENCIÓN DE LOS ESPECÍMENES DE LAS PLANTAS A ESTUDIAR Y CRITERIOS DE SELECCIÓN

Las siguientes fueron las especies que se estudiaron en el experimento (Véase los **Anexos B – H**):

Tabla 6. Plantas que se utilizaron en el experimento de fitorremediación y sus números de colecta.

No COL*	Nombre científico	Nombre común
512075	<i>Lippia origanoides</i> (Quimiotipo timol, carvacrol)	Orégano del monte
512078	<i>Lippia alba</i> (Quimiotipo carvona)	Pronto alivio
526760	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.	Sábila

Continuación, **Tabla 6**

-	<i>Hellianthus annuus</i>	Girasol
523703	<i>Dieffenbachia cf. seguine</i> (Jacq.) Shott	Cucaracho
-	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Tomate río grande
523702	<i>Echeveria aff. gibbiflora</i> Moc. & Sessé ex DC.	Oreja de burro

*Número de *voucher* en el Herbario Nacional Colombiano, U. Nacional.

Los criterios de selección de las especies utilizadas en el experimento se presentan a continuación en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Criterios de selección de las especies bajo estudio.

Especie	Criterio de selección	Ref.
<i>Lippia origanoides</i>	Por disponibilidad de la especie y además por presentar una biomasa considerable.	---
<i>Lippia alba</i>	Por disponibilidad de la especie, rápido crecimiento, por requerir de pocos cuidados y además por presentar una biomasa considerable.	---
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.	Por disponibilidad de la especie, por requerir de muy pocos cuidados y además por presentar gran biomasa.	---
<i>Hellianthus annuus</i>	Porque ha sido previamente estudiada y se han encontrado resultados positivos en la hiperacumulación de As, Cd , Ni, Zn y Pb.	[81-83]
<i>Dieffenbachia cf. seguine</i> (Jacq.) Shott	Por disponibilidad de la especie, por los pocos cuidados que requiere y por la gran biomasa que posee. Adicionalmente, la especie <i>Dieffenbachia amoena</i> cv., de este mismo género, presentó resultados positivos en la fitorremediación de benceno presente en el aire.	[84]

Continuación, **Tabla 7**

<i>Lycopersicon esculentum</i>	Porque ha sido previamente estudiada como planta fitoextractora de Cr y As, con resultados positivos encontrados.	[85,86]
<i>Echeveria</i> aff. <i>gibbiflora</i> Moc. & Sessé ex DC.	Por disponibilidad de la especie, por su gran biomasa y por requerir de muy pocos cuidados.	---

Para obtener los especímenes necesarios para el desarrollo del experimento se llevó a cabo la propagación vegetal tanto por esquejes como por semillas, dependiendo de la especie. Las siguientes son las especies que se obtuvieron por medio de reproducción por esquejes: *Lippia origanoides*, *Lippia alba*, *Dieffenbachia* y *Echeveria gibbiflora*; mientras que los especímenes de *Helianthus annuus* (99% de pureza, Semillas del Pacífico, Reg. ICA No. 00581 de marzo de 2000, lote 0017-0110) y *Lycopersicon esculentum* (99% de pureza, Semillas Miguel Sáenz, Res. ICA No. 2193 de septiembre de 2000, Lote N-388) se obtuvieron por propagación con semillas. Los especímenes de *Aloe vera* fueron adquiridos en el mercado local.

La propagación por esquejes para las especies *Lippia origanoides* y *Lippia alba* se realizó cortando de la base de las ramas pedazos de aproximadamente 13 cm, que se sembraron en abono, durante ca. 3 meses en un vivero, bajo condiciones de luz y riego controladas. Para la reproducción de las especies *Dieffenbachia* y *Echeveria gibbiflora* se tomaron de la base de la planta varias ramas con brotes que se cortaron y se sembraron en materas individuales.

En el caso de la propagación vegetal de las especies *Helianthus annuus* y *Lycopersicon esculentum* se sembraron en bandejas con abono las semillas a una profundidad de 1 a 2 cm de la superficie. Las bandejas se ubicaron en el vivero de CENIVAM bajo condiciones de luz y riego controladas para el desarrollo de las plantas.

2.3 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

La caracterización taxonómica de las plantas se realizó en el Herbario Nacional Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. La clasificación botánica se llevó a cabo por los doctores José Luís Fernández y John Infante Betancurt. Para ello, se enviaron *exsiccata* de *Aloe vera*, *Dieffenbachia* y *Echeveria gibbiflora*. Las semillas de las plantas *Helianthus annuus* y *Licopersicum esculentum* se certificaron por casas distribuidoras registradas en el ICA, “Semillas del Pacífico” y “Semillas Miguel Sáenz”, respectivamente, por lo tanto, no se realizó su caracterización taxonómica. Las demás especies fueron identificadas en trabajos de investigación previos [87,88].

2.4 SIEMBRA DE LAS PLANTAS EN SUELO CONTAMINADO

Una vez transcurrieron ca. 3 meses, las plantas se transplantaron a suelo contaminado. De cada especie se sembraron cuatro plantas en el suelo contaminado con mercurio, dos con aplicación de fertilizante y dos sin fertilizante. Además, se dejaron dos blancos de control, al uno se le aplicó también fertilizante y al otro no. Las plantas sembradas en el suelo con mercurio se dispusieron sobre bandejas plásticas de tal manera que se pudiera recoger el agua de lixiviado, producto del riego y de las lluvias (Véase el **Anexo J**). El agua de lixiviación se recogió y se almacenó, para su posterior análisis. Finalmente, las plantas se dejaron en un vivero por un periodo de 2 meses.

2.5 APLICACIÓN DEL FERTILIZANTE

El fertilizante empleado durante el experimento fue del tipo NPK15:15:15 (abono fungicida y fertilizante, plantas de follaje), que se preparó según instrucciones del vendedor. En agua (1L) se disolvió el fertilizante (2,55 g). La solución de fertilizante se aplicó a las plantas cada 15 días y se adicionó

alrededor de la planta para evitar la aplicación directa en la raíz; a las plantas más grandes, *Dieffenbachia*, *Aloe vera*, *Lippia alba*, *Echeveria gibbiflora* y *Helianthus annuus*, se aplicaron 40 mL de la solución y a las plantas medianas y pequeñas, *Lycopersicon esculentum* y *Lippia origanoides*, se les aplicaron entre 10 y 20 mL del fertilizante. El fertilizante utilizado se analizó previamente para determinar la concentración de mercurio, eventualmente, presente.

2.6 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Después de que las plantas permanecieron dos meses en suelo contaminado con mercurio, se desenterraron con cuidado, para no arrancar las raíces. Las plantas se lavaron exhaustivamente con agua del tubo (Véase el **Anexo K**), en la que se cuantificó previamente el mercurio; luego, con agua destilada, posteriormente, con una solución de EDTA tetrasódico (99 %, Baker, Phillipsburg, EE. UU.) 20 mM y, finalmente, con agua destilada otra vez.

Las plantas se dividieron en hojas, tallos y raíces (Véase el **Anexo L**), y en caso de que estas últimas fueran gruesas, se procedió a remover con cuidado la capa externa con el fin de eliminar la posible presencia de mercurio adherido superficialmente que no hubiera podido retirarse con el lavado.

El material vegetal dividido en diferentes partes se pesó y luego se introdujo en una estufa *Indumegas* (Bucaramanga, Colombia) en donde se secó a 80°C hasta peso constante [39]. El material vegetal seco se molió con ayuda de un procesador de alimentos marca *Oster*, para finalmente obtener un tamaño de partícula pequeño y una muestra homogénea.

2.7 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUELO

Las muestras de suelo fueron dispuestas sobre bandejas en las que se dejaron secar por una semana a temperatura ambiente y dentro de una cabina

extractora. Una vez estuvieron secas, las muestras se maceraron y se pasaron a través de un tamiz dos veces seguidas, con el fin de homogeneizar todo el material.

2.8 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS LÍQUIDAS

Antes de su análisis, cada una de las muestras líquidas se filtró por gravedad, usando papel franja negra.

2.9 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN REDUCTORA

Para la preparación de la solución reductora (100 mL) se disolvió hidróxido de sodio (10 g) (99%, Merck, Darmstadt, Alemania) en agua destilada (ca. 50 mL). A esta solución, en caliente, se le adicionó cloruro estannoso (6 g) (98%, Carlo Erba *reagents*, Milán, Italia), previamente disuelto en agua destilada (ca. 10 mL). Una vez la mezcla estuvo homogénea, se añadió nuevamente hidróxido de sodio (10 g). Finalmente, la solución se dejó en reposo y se llevó a un volumen de 100 mL. La solución se preparó en el mismo día, cuando se realizaron los análisis.

2.10 ANÁLISIS DE MUESTRAS SÓLIDAS

Para el análisis de las muestras sólidas se acopló el aditamento RP-91C al analizador RA-915⁺, y éste, a su vez, se conectó al puerto COM del computador por un cable de interfase (Véase el **Anexo M**). Una vez encendido el acoplamiento, se corrió el *software* del analizador en el modo *Complex* y se verificó que la señal del PMT (*Photo-Multiplier Tube*) estuviera por encima de 8000; de esta manera, se garantizó que las condiciones de funcionamiento del pirolizador fueran las adecuadas [80]. Posteriormente, se realizó el ensayo descrito en el manual del analizador RA-915⁺ para comprobar el

funcionamiento correcto del equipo [80]. A continuación, el aditamento RP-91C se dejó en precalentamiento por 2 h [89] y se fijaron los parámetros de medición según lo muestra la **Tabla 8**.

Tabla 8. Parámetros de funcionamiento del acoplamiento RA-915⁺/RP-91C, utilizados en el trabajo.

Parámetro	Descripción y/o valor
Celda analítica	Externa
Posición del puente óptico	I
Flujo de aire	1 L/min
Temperatura del pirolizador	800 °C
Longitud de onda (λ)	254 nm
Tiempo de precalentamiento	2 h
Tiempo de integración	60 s

Finalmente, se procedió a medir mercurio en las muestras sólidas (material vegetal o suelos).

2.10.1 Análisis del material vegetal. Cada una de las navecillas de cuarzo desocupadas se pasó inicialmente por el pirolizador, con el fin de eliminar posible contaminación con mercurio. Una vez estuvieron frías, se procedió a pesar en ellas el material vegetal previamente preparado para el análisis. Para el pesaje se empleó una balanza Mettler Toledo AG 285, con una precisión de $\pm 0,01$ mg. Las cantidades de material vegetal empleadas para la cuantificación variaron desde los 5 mg hasta máximo 20 mg. No se utilizaron cantidades superiores a los 20 mg, con el fin de evitar exceso de vapores dentro del pirolizador que pudiesen ocasionar el decaimiento de la señal del PMT por debajo de 4000, y, por consiguiente, disminuir la confiabilidad de las mediciones.

Cada una de las navecillas con el material vegetal se introdujo en el pirolizador durante 60 s. Cada muestra se analizó por triplicado y se aceptó un coeficiente de variación de máximo el 10%.

Finalmente, se realizó la curva de calibración utilizando diferentes cantidades de material certificado ГСО 2509-83 (С4Т-3, St. Petersburgo, Rusia) de concentración de 420 ± 60 ppb.

2.10.2 Análisis de muestras de suelo. Con las navecillas de cuarzo limpias, se procedió a pesar en cada una de ellas cantidades que variaron desde 2 hasta 5 mg de cada muestra de suelo previamente homogeneizada. El tiempo de análisis fue de 60 s. La curva de calibración se llevó a cabo con diferentes cantidades de material certificado ГСО 2509-83 (С4Т-3, St. Petersburgo, Rusia) de concentración de 420 ± 60 ppb. Cada muestra se analizó por triplicado y se aceptó un coeficiente de variación de máximo el 10%.

2.11 ANÁLISIS DE MUESTRAS LÍQUIDAS

Para el análisis de muestras líquidas se acopló el aditamento RP-91 al analizador RA-915⁺ (Véase el **Anexo N**), previamente conectado al puerto COM del computador. Con el equipo encendido (aditamento y analizador), se realizó el ensayo de comprobación del correcto funcionamiento del analizador [80]; posteriormente, se corrió el *software* en modo *Liquid*. A continuación, se fijaron los parámetros de funcionamiento del equipo, que se reportan en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Parámetros de funcionamiento del acoplamiento RA-915⁺/RP-91, utilizados en el trabajo.

Parámetro	Descripción y/o valor
Celda analítica	Multipaso
Posición del puente óptico	III

Continuación, **Tabla 9**

Flujo de aire	4 L/min
Longitud de onda (λ)	254 nm
Tiempo de precalentamiento	30 min
Tiempo de integración	60 s

Después de aproximadamente 30 min de encendido, en el equipo se inició el análisis de las muestras líquidas.

Inicialmente, se depositó dentro del primer burbujeador la solución reductora (3 mL), con el fin de remover posible mercurio remanente de análisis anteriores. Una vez se observó la estabilidad de la línea base, se comenzó a realizar la curva de calibración utilizando una solución *stock* de 1 ppb de mercurio, que se llevó a diluciones que variaron desde 0,005 hasta 0,2 ppb de concentración de mercurio. Para la curva de calibración, se utilizó el patrón *Mercury Standard Solution* $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 2M (Merck, Darmstadt, Alemania) de concentración 1000 ± 2 ppm, a partir del cual se realizó una dilución de 1000:1, y esta última, a su vez, se diluyó en la misma proporción.

Luego de construir la curva de calibración, se procedió a analizar las muestras líquidas. Para la medición de mercurio en las muestras se realizaron diluciones que variaron desde 25 μL en 5 mL hasta 5 mL de sólo muestra, dependiendo de la concentración de mercurio. Cada muestra se analizó por triplicado y se aceptó un coeficiente de variación de máximo el 10%, igual, que para las muestras sólidas.

Los volúmenes empleados de solución reductora y de muestras fueron 3 y 5 mL, respectivamente.

2.12 ANÁLISIS DE AIRE EN EL LUGAR DEL EXPERIMENTO

Para el análisis de aire en el vivero de CENIVAM, donde se llevó a cabo el experimento, se transportó el analizador RA-915⁺ (Véase el **Anexo P**) hasta el lugar y se conectó a un computador portátil. Se encendieron el equipo y el computador, y se realizó el ensayo de verificación de funcionamiento del analizador [80]. Posteriormente, se corrió el *software* en modo *Air* y se fijaron los parámetros de medición de la muestra gaseosa, que se describen en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Parámetros de funcionamiento del equipo RA-915+ para el análisis de muestras gaseosas, utilizadas en el trabajo.

Parámetro	Descripción y/o valor
Celda analítica	Multipaso
Posición del puente óptico	III
Tiempo de precalentamiento	20 min
Modo	Manual
Flujo de aire	20 L/min
Longitud de onda (λ)	254 nm
Tiempo de adquisición de datos	Indefinido

La medición se inició en la entrada del vivero, posteriormente, se realizó en el sitio donde crecían las plantas que se usaron como blanco del experimento y, finalmente, se llevó a cabo el análisis en el lugar donde se sembraron y crecían las plantas en el suelo contaminado con Hg.

2.13 DETERMINACIÓN DE LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La determinación de los límites de detección y de cuantificación en muestras líquidas y sólidas se llevó a cabo midiendo la señal de un blanco de muestra varias veces.

Para las muestras sólidas se realizaron dos determinaciones, una para las muestras de suelo y otra para el material vegetal. En el caso de las muestras de suelo se utilizó como blanco suelo libre de mercurio (obtenido como residuo del pirolizador) y para la determinación de los límites de detección y de cuantificación se hicieron 25 mediciones utilizando en cada una de ellas 5 mg de blanco. Para el material vegetal se utilizaron como blanco las plantas de frijol sembradas en cultivos hidropónicos y mantenidas de esta forma por mes y medio aproximadamente. Estas plantas de frijol se secaron hasta peso constante, al igual que el material vegetal bajo estudio, y se realizaron 11 mediciones pesando en cada una 10 mg de material vegetal. Los parámetros de análisis, tanto para blancos de suelo, como para el material vegetal, fueron los mismos descritos en el **Numeral 2.10**.

En el caso de las muestras líquidas, se utilizó como blanco agua destilada y se hicieron 8 mediciones usando en cada una de ellas 5 mL. Los parámetros de medición fueron los mismos mencionados en el **Numeral 2.11**.

Finalmente para todas las determinaciones se utilizaron las siguientes expresiones:

$$LD = \bar{x} + 3 \times t(SD / \sqrt{n}) \quad \text{Ecuación 1}$$

$$LC = \bar{x} + 10 \times t(SD / \sqrt{n}) \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

LD : Límite de detección;

LC : Límite de cuantificación;

\bar{x} : Promedio de las mediciones;

SD : Desviación estándar;

n : Número de mediciones;

t : Parámetro “*t de student*” para un 95% de confianza y *n-1* grados de libertad.

2.14 EVALUACIÓN DE LA FITODISPONIBILIDAD DE MERCURIO EN EL SUELO

La evaluación de la fitodisponibilidad permite conocer qué proporción de mercurio en el suelo está disponible para ser absorbido por las plantas, sin embargo, no contempla posibles cambios que puedan ocurrir debido a la actividad del suelo o al metabolismo propio de la planta.

Este parámetro se determinó midiendo la concentración de mercurio en un extracto de suelo que se obtuvo, tal como se describe a continuación: se pesó la muestra de suelo previamente secada y homogeneizada (10 g), se adicionó solución de acetato de amonio (50 mL) (98%, Merck, Darmstadt, Alemania) 1M ajustada a pH 7, se agitó la mezcla por 40 min y se filtró. La concentración de mercurio se determinó por el método de vapor frío y se siguió el procedimiento descrito para el análisis de muestras líquidas en el analizador RA-915⁺ con el aditamento RP-91 (Véase el **Numeral 2.11**).

3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La parte experimental del proyecto constó de dos fases. En una fase inicial se realizó el montaje del experimento correspondiente a la siembra de las plantas en el suelo contaminado con mercurio, por un periodo de dos meses bajo condiciones controladas. La fase posterior consistió en la cuantificación de mercurio, tanto en el aire dentro del vivero, como en las muestras sólidas y líquidas. A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el experimento.

3.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN

Para la cuantificación de mercurio en las muestras se utilizaron 35 curvas de calibración para las matrices sólidas y 5 curvas de calibración para las matrices líquidas; para mayores seguridad y confianza, cada día de funcionamiento del equipo se obtenía una curva de calibración, que se usaba para la cuantificación del Hg. En las **Figuras 4 y 5**, se presentan ejemplos de las curvas de calibración utilizadas para la cuantificación de Hg en matrices sólidas y líquidas, respectivamente.

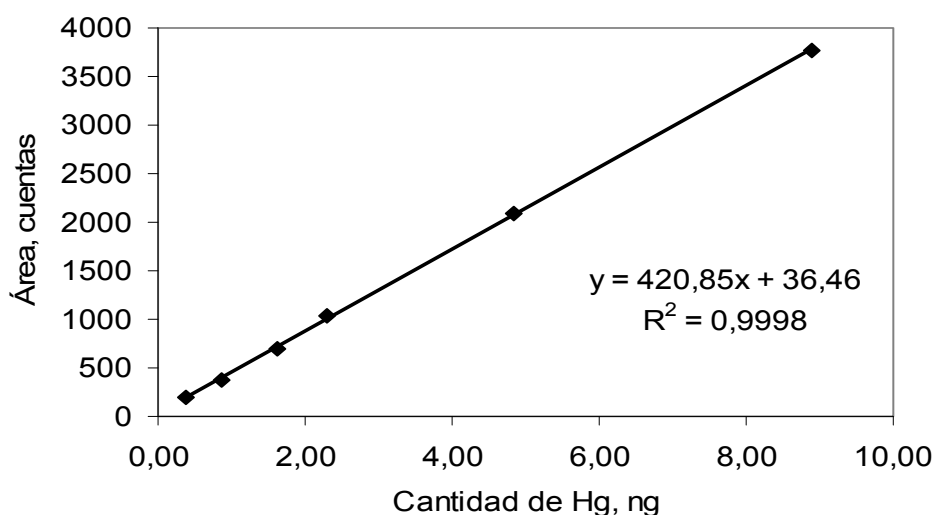


Figura 4. Curva de calibración utilizada en el análisis de muestras sólidas.

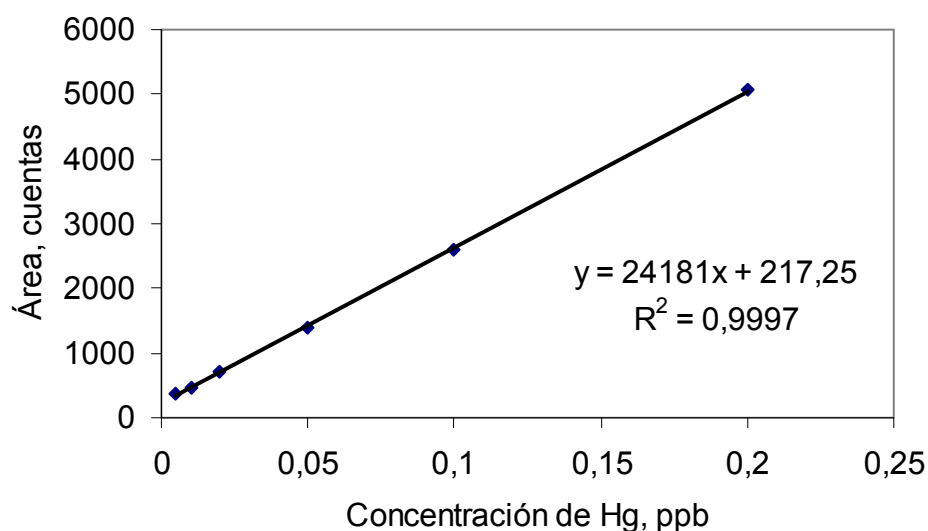


Figura 5. Curva de calibración utilizada en el análisis de muestras líquidas.

En las **Tablas 11 y 12**, se registran los parámetros de las curvas de calibración, que se usaron en la cuantificación de mercurio en matrices sólidas y líquidas, respectivamente.

Tabla 11. Curvas de calibración empleadas para la cuantificación de mercurio en muestras sólidas.

Ref.	Ecuación	R ²	Ref.	Ecuación	R ²
1s	$y = 301,78x + 196,35$	0,9996	19s	$y = 323,16x + 46,58$	0,9933
2s	$y = 282,08x + 15,25$	1	20s	$y = 359,72x + 1,78$	0,9989
3s	$y = 323,13x + 34,62$	0,9996	21s	$y = 376,25x + 17,40$	0,9996
4s	$y = 314,77x - 15,36$	0,9929	22s	$y = 618,98x - 28,03$	0,9995
5s	$y = 301,8x + 23,28$	0,9977	23s	$y = 545,6x - 1,75$	0,9975
6s	$y = 418,76x - 39,20$	0,9998	24s	$y = 470,51x + 61,62$	0,999
7s	$y = 374,2x + 71,06$	0,9908	25s	$y = 331,82x + 64,29$	0,9978
8s	$y = 305,17x + 9,22$	0,9987	26s	$y = 560,32x + 21,08$	0,9999
9s	$y = 371,96x + 66,21$	0,9989	27s	$y = 292,67x + 133,32$	0,9984
10s	$y = 428,68x - 48,44$	0,9939	28s	$y = 330,68x - 54,67$	0,9883
11s	$y = 355,97x + 22,53$	0,9969	29s	$y = 360,28x - 18,26$	0,9922
12s	$y = 339,01x + 87,58$	0,9986	30s	$y = 303,24x + 103,95$	0,9955
13s	$y = 420,85x + 36,46$	0,9998	31s	$y = 484,8x - 62,11$	0,9981
14s	$y = 452,88x - 17,99$	0,9997	32s	$y = 343,42x + 41,19$	0,9993

Continuación, **Tabla 11**

15s	$y = 452,47x + 50,50$	0,9997	33s	$y = 317,67x + 90,58$	0,9983
16s	$y = 813,22x + 73,22$	0,9997	34s	$y = 268,4x + 33,86$	0,9976
17s	$y = 641,06x + 33,16$	0,9993	35s	$y = 232,51x - 19,74$	0,9999
18s	$y = 601,8x + 179,13$	0,9962	36s	$y = 300,34x + 15,52$	0,9994

y - corresponde al área en cuentas y x - a la cantidad de mercurio en el patrón en ng.

Tabla 12. Curvas de calibración empleadas para la cuantificación de mercurio en muestras líquidas.

Ref.	Ecuación	R ²
1l	$y = 29150x + 230,43$	0,9993
2l	$y = 24106x + 175,86$	0,9982
3l	$y = 39210x + 267,43$	0,9993
4l	$y = 24181x + 217,25$	0,9997
5l	$y = 29186x + 402,04$	0,9991
6l	$y = 72169x + 539,55$	0,9997

y - corresponde al área en cuentas y x - a la concentración del patrón en ppb.

En los datos, que se muestran a continuación, se hace la referencia (Ref.) a la ecuación utilizada en la cuantificación.

3.2 LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la determinación de los límites de detección y cuantificación, según lo descrito en el **Numeral 2.13** de la Parte Experimental.

Tabla 13. Límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) de mercurio obtenidos en diferentes tipos de análisis.

Intervalo de confianza, 95%	LD	LC	Ref.
Muestras sólidas (material vegetal, ng)	0,39	0,78	20s
Muestras sólidas (suelo, ng)	0,20	0,48	3s
Muestras líquidas, ppb	0,011	0,023	2l
Muestras gaseosas, ng/m ³ *	0,87	3,1	-

Continuación, **Tabla 13**

* Determinado por F. Muñoz y J. Delgado, 2006 [89].

3.3 FITODISPONIBILIDAD

La determinación de la fitodisponibilidad (Véase el **Numeral 2.14** de la Parte Experimental) permitió conocer, de forma general, qué proporción del mercurio presente en el suelo contaminado se encontraba disponible para ser absorbido por las plantas. Los resultados de este parámetro se reportan en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Fitodisponibilidad determinada en suelo (10 g) contaminado con mercurio.

	Concentración*	CV, %	Ref.
Extracto (50 mL), ppb	8,6 ± 0,31	3,6	5l
Suelo (mercurio fitodisponible), ppb	43 ± 1,6	3,6	5l
Suelo (mercurio total), ppm	15,9 ± 0,61	3,8	35s
Porcentaje fitodisponible, %	0,27	-	-

*Promedio ± SD (n = 3); CV – Coeficiente de variación

La concentración de mercurio total en el suelo utilizado en el experimento (Véase, **Tablas 15 – 21**) puede considerarse como tóxica, ya que supera los límites críticos de 0,07-0,3 mg/kg de contenido de mercurio total en el suelo [90]. Estos límites fueron establecidos por un grupo internacional de expertos en límites críticos de metales pesados, que trabajan en el marco del Convenio sobre la Contaminación Atmosférica Transfronteriza a Larga Distancia de la Comisión Económica de las Naciones Unidas para Europa [90, 91]. Sin embargo, la fracción fitodisponible del metal es muy baja, en comparación con su concentración total.

El porcentaje de mercurio fitodisponible encontrado en el suelo fue bastante bajo, *i.e.* 0,27% (Véase la **Tabla 14**), pero si se compara con el encontrado por Moreno-Jiménez *et al.* [18] (0,03%) en la zona minera de Almadén, España, donde se produce una tercera parte de todo el mercurio obtenido en el mundo

[18], es ca. 9 veces más alto. La fitodisponibilidad del mercurio usualmente es baja debido a que éste se encuentra adsorbido o precipitado en la solución del suelo, e incluso algunos materiales arcillosos pueden funcionar como sumideros de mercurio inorgánico [92]. Aunque este aspecto no se evaluó en el experimento, se ha comprobado que muchas especies de plantas pueden aumentar la fitodisponibilidad de metales pesados al segregar ciertos exudados radiculares que modifican el pH o actúan como agentes acomplejantes que favorecen la absorción de dichos metales; también existen casos en los que hay participación de los microorganismos propios de la rizosfera [93].

3.4 CONCENTRACIÓN DE MERCURIO EN BLANCOS, SUELOS, AGUAS Y PARTES DE LAS PLANTAS BAJO ESTUDIO

Todas las especies, tanto los especímenes de control, como las plantas que se cultivaron en el suelo contaminado, permanecieron en el vivero de CENIVAM bajo las mismas condiciones. Todas ellas mostraron resistencia a la presencia de mercurio en el suelo, excepto el tomate, *Lycopersicon esculentum*, que al cabo de una semana de iniciado el experimento, mostró signos visuales de fitotoxicidad y marchitamiento (Véase el **Anexo Q**), hecho que no sucedió con los especímenes de control de dicha especie. Sin embargo, se evaluó la concentración de mercurio en los restos de la planta.

A continuación, de las **Tablas 15 - 21**, se presentan las concentraciones de mercurio determinadas en los blancos, suelos, agua de lixiviado y partes de las plantas de las diferentes especies vegetales que se estudiaron en el experimento.

Tabla 15. Concentraciones de Hg total en blancos, suelo, agua de lixiviado y diferentes partes de las plantas de la especie *Lippia alba*, cultivadas con y sin fertilizante.

<i>Lippia alba</i>												
Blancos	Con fertilizante						Sin fertilizante					
	Planta 1			Planta 2			Planta 1			Planta 2		
	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.
Suelo, ppm	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s
Agua de riego, ppb	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l
Fertilizante, ppb	< 13,0	---	36s	< 13,0	---	36s	---	---	---	---	---	---
Raíz, ppb	< 32,9	---	4s	< 32,9	---	4s	< 64,0	---	4s	< 64,0	---	4s
Hojas, ppb	< 37,1	---	4s	< 37,1	---	4s	< 35,2	---	4s	< 35,2	---	4s
Tallo, ppb	< 30,1	---	4s	< 30,1	---	4s	< 30,1	---	4s	< 30,1	---	4s
Muestras con Hg												
Suelo, ppm	16,0 ± 0,50	3,1	2s	16,0 ± 0,50	3,1	2s	13,6 ± 0,23	1,7	2s	13,6 ± 0,23	1,7	2s
Agua de lixiviado, ppb	0,03 ± 0,002	5,8	2l	0,03 ± 0,003	9,5	2l	0,09 ± 0,004	4,0	2l	0,07 ± 0,001	0,8	2l
Raíz, ppb	2400 ± 150	6,4	5s	3350 ± 85	2,5	6s	1930 ± 42	2,2	6s	1940 ± 54	2,8	6s
Hojas, ppb	110 ± 2,7	2,5	5s	130 ± 4,2	3,3	6s	200 ± 9,1	4,6	8s	180 ± 3,9	2,1	8s
Tallo ppal, ppb	200 ± 11	5,5	7s	110 ± 7,5	6,7	7s	230 ± 9,7	4,3	7s	130 ± 5,8	4,6	7s
Tallo de ramas, ppb	< 52,2	---	5s	< 75,2	---	10s	< 77,5	---	10s	< 77,4	---	8s

*Promedio ± SD (n = 3); ppal - principal

Tabla 16. Concentraciones de Hg total en blancos, suelo, agua de lixiviado y diferentes partes de las plantas de la especie *Echeveria* aff. *gibbiflora* Moc. & Sessé ex DC, cultivadas con y sin fertilizante.

<i>Echeveria</i> aff. <i>gibbiflora</i> Moc. & Sessé ex DC.												
Con fertilizante							Sin fertilizante					
Blancos	Planta 1			Planta 2			Planta 1			Planta 2		
	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.
Suelo, ppm	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s
Agua de riego, ppb	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l
Fertilizante, ppb	< 13,0	---	36s	< 13,0	---	36s	---	---	---	---	---	---
Raíz, ppb	< 38,0	---	14s	< 38,0	---	14s	< 37,3	---	17s	< 37,3	---	17s
Hojas, ppb	< 38,1	---	14s	< 38,1	---	14s	< 37,2	---	17s	< 37,2	---	17s
Tallo, ppb	< 37,8	---	17s	< 37,8	---	17s	< 36,9	---	17s	< 36,9	---	17s
Muestras con Hg												
Suelo, ppm	14,0 ± 0,65	4,7	3s	14,0 ± 0,65	4,7	3s	14,0 ± 0,65	4,7	3s	14,0 ± 0,65	4,7	3s
Agua de lixiviado, ppb	0,03 ± 0,001	4,1	5l	0,03 ± 0,001	4,1	5l	50 ± 1,7	3,2	2l	50 ± 1,7	3,2	2l
Raíz ppal, ppb	< 38,4	---	11s	< 38,3	---	11s	< 77,3	---	11s	< 55,2	---	11s
Pelos radiculares, ppb	1220 ± 39	3,2	15s	2300 ± 120	5,1	12s	150 ± 1,9	1,3	16s	240 ± 7,5	3,1	13s
Hojas, ppb	< 77,0	---	11s	< 75,9	---	10s	< 76,4	---	10s	< 37,0	---	10s
Tallo, ppb	< 35,7	---	12s	< 36,0	---	12s	< 36,7	---	12s	< 36,1	---	12s

*Promedio ± SD (n = 3); ppal - principal

Tabla 17. Concentraciones de Hg total en blancos, suelo, agua de lixiviado y diferentes partes de las plantas de la especie *Dieffenbachia cf. seguine* (Jacq.) Shott, cultivadas con y sin fertilizante.

<i>Dieffenbachia cf. seguine</i> (Jacq.) Shott												
Con fertilizante							Sin fertilizante					
Blancos	Planta 1			Planta 2			Planta 1			Planta 2		
	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.
Suelo, ppm	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s
Agua de riego, ppb	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l
Fertilizante, ppb	< 13,0	---	36s	< 13,0	---	36s	---	---	---	---	---	---
Raíz, ppb	< 37,2	---	19s	< 37,2	---	19s	< 37,6	---	21s	< 37,6	---	21s
Hojas, ppb	< 38,1	---	19s	< 38,1	---	19s	< 38,2	---	21s	< 38,2	---	21s
Tallo, ppb	< 36,7	---	19s	< 36,7	---	19s	< 35,4	---	21s	< 35,4	---	21s
Muestras con Hg												
Suelo, ppm	11,2 ± 0,45	4,0	9s	11,2 ± 0,45	4,0	9s	11,2 ± 0,45	4,0	9s	11,2 ± 0,45	4,0	9s
Agua de lixiviado, ppb	0,8 ± 0,02	2,1	3l	9,7 ± 0,04	0,5	3l	5,8 ± 0,22	3,8	4l	6,9 ± 0,04	0,5	3l
Raíz ppal, ppb	1440 ± 48	3,4	22s	1320 ± 15	1,2	18s	420 ± 2,5	0,6	18s	1050 ± 42	4,0	22s
Pelos radicales, ppb	2040 ± 61	3,0	23s	4360 ± 36	0,8	24s	1850 ± 35	1,9	24s	4500 ± 170	3,7	24s
Hojas, ppb	110 ± 4,1	3,6	13s	160 ± 2,8	1,8	13s	100 ± 5,2	5,1	13s	130 ± 2,2	1,7	13s
Tallo, ppb	< 46,7	---	16s	< 27,8	---	18s	< 23,5	---	16s	< 48,0	---	16s

*Promedio ± SD (n = 3); ppal - principal

Tabla 18. Concentraciones de Hg total en blancos, suelo, agua de lixiviado y diferentes partes de las plantas de la especie *Aloe vera* (L.) Burm. f., cultivadas con y sin fertilizante.

<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.												
	Con fertilizante						Sin fertilizante					
	Planta 1			Planta 2			Planta 1			Planta 2		
Blancos	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.
Suelo, ppm	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s
Agua de riego, ppb	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l
Fertilizante, ppb	< 13,0	---	36s	< 13,0	---	36s	---	---	---	---	---	---
Raíz, ppb	< 38,9	---	25s	< 38,9	---	25s	< 38,9	---	25s	< 38,9	---	25s
Hojas, ppb	< 60,0	---	25s	< 60,0	---	25s	< 60,0	---	25s	< 60,0	---	25s
Muestras con Hg												
Suelo, ppm	13,0 ± 0,29	2,2	9s	13,0 ± 0,29	2,2	9s	13,0 ± 0,29	2,2	9s	13,0 ± 0,29	2,2	9s
Agua de lixiviado, ppb	1,4 ± 0,06	4,1	4l	0,4 ± 0,03	7,9	4l	7,6 ± 0,54	7,1	3l	9,1 ± 0,43	4,7	3l
Raíz, ppb	420 ± 10	2,4	29s	400 ± 10	2,4	29s	410 ± 10	6,4	28s	410 ± 10	6,9	29s
Hojas, ppb	130 ± 1,0	0,8	28s	170 ± 4,4	2,6	28s	180 ± 3,9	2,2	28s	70 ± 3,6	5,6	28s

*Promedio ± SD (n = 3)

Tabla 19. Concentraciones de Hg total en blancos, suelo, agua de lixiviado y diferentes partes de las plantas de la especie *Lippia origanoides*, cultivadas con y sin fertilizante.

<i>Lippia origanoides</i>												
	Con fertilizante						Sin fertilizante					
	Planta 1			Planta 2			Planta 1			Planta 2		
Blancos	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.
Suelo, ppm	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s
Agua de riego, ppb	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l
Fertilizante, ppb	< 13,0	---	36s	< 13,0	---	36s	---	---	---	---	---	---
Raíz, ppb	< 46,3	---	26s	< 46,3	---	26s	< 49,1	---	26s	< 49,1	---	26s
Hojas, ppb	< 75,3	---	26s	< 75,3	---	26s	< 76,3	---	26s	< 76,3	---	26s
Tallo, ppb	< 46,3	---	26s	< 46,3	---	26s	< 49,1	---	26s	< 49,1	---	26s
Muestras con Hg												
Suelo, ppm	15,8 ± 0,32	2,1	27s	15,8 ± 0,32	2,1	27s	15,8 ± 0,32	2,1	27s	15,8 ± 0,32	2,1	27s
Agua de lixiviado, ppb	0,3 ± 0,03	8,6	4l	0,3 ± 0,03	8,6	4l	0,5 ± 0,02	3,4	4l	0,5 ± 0,02	3,4	4l
Raíz, ppb	1920 ± 67	3,5	30s	4300 ± 140	3,3	30s	450 ± 8,1	4,5	32s	650 ± 11	1,7	31s
Hojas, ppb	590 ± 19	3,3	30s	220 ± 4,2	2,0	30s	280 ± 2,8	1,0	31s	360 ± 8,4	2,3	31s
Tallo, ppb	220 ± 10	4,8	30s	280 ± 11	4,2	30s	280 ± 11	4,2	32s	< 114,0	---	32s

*Promedio ± SD (n = 3)

Tabla 20. Concentraciones de Hg total en blancos, suelo, agua de lixiviado y diferentes partes de las plantas de la especie *Helianthus annuus*, cultivadas con y sin fertilizante.

<i>Helianthus annuus</i>												
	Con fertilizante						Sin fertilizante					
	Planta 1			Planta 2			Planta 1			Planta 2		
Blancos	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.
Suelo, ppm	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s
Agua de riego, ppb	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l
Fertilizante, ppb	< 13,0	---	36s	< 13,0	---	36s	---	---	---	---	---	---
Semilla, ppb	< 126,6	---	36s	< 126,6	---	36s	< 126,6	---	36s	< 126,6	---	36s
Raíz, ppb	< 70,9	---	25s	< 70,9	---	25s	< 37,6	---	26s	< 37,6	---	26s
Hojas, ppb	140 ± 4,9	3,4	25s	140 ± 4,9	3,4	25s	< 75,5	---	26s	< 75,5	---	26s
Tallo, ppb	< 34,8	---	25s	< 34,8	---	25s	< 38,4	---	26s	< 38,4	---	26s
Flor, ppb	140 ± 4,9	3,4	25s	140 ± 4,9	3,4	25s	< 75,5	---	26s	< 75,5	---	26s
Muestras con Hg												
Suelo, ppm	16,7 ± 0,65	3,9	27s	16,7 ± 0,65	3,9	27s	15,8 ± 0,32	2,1	27s	15,8 ± 0,32	2,1	27s
Agua de lixiviado, ppb	0,15 ± 0,002	1,6	4l	0,15 ± 0,002	1,6	4l	0,6 ± 0,03	4,4	4l	0,6 ± 0,03	4,4	4l
Raíz, ppb	3400 ± 120	3,4	32s	2080 ± 90	4,3	33s	860 ± 49	5,7	34s	830 ± 28	5,0	34s
Hojas, ppb	450 ± 27	6,2	32s	270 ± 8,6	3,2	33s	180 ± 6,2	3,5	33s	350 ± 2,0	0,6	34s
Tallo, ppb	50 ± 2,5	5,0	32s	< 42,2	---	33s	< 48,6	---	34s	< 83,4	---	34s
Flor, ppb	< 38,9	3,4	33s	< 41,2	---	33s	< 41,7	---	33s	< 81,1	---	34s

*Promedio ± SD (n = 3)

Tabla 21. Concentraciones de Hg total en blancos, suelo, agua de lixiviado y diferentes partes de las plantas de la especie *Lycopersicon esculentum*, cultivadas con y sin fertilizante.

<i>Lycopersicon esculentum</i>						
Blancos	Con fertilizante			Sin fertilizante		
	Plantas 1 y 2			Plantas 1 y 2		
	Concentración*	CV, %	Ref.	Concentración*	CV, %	Ref.
Suelo, ppm	0,2 ± 0,01	4,9	36s	0,2 ± 0,01	4,9	36s
Agua de riego, ppb	< 0,011	---	6l	< 0,011	---	6l
Fertilizante, ppb	< 13,0	---	36s	---	---	---
Semillas, ppb	< 125,3	---	36s	< 125,3	---	36s
Raíz, ppb	< 38,1	---	14s	< 36,3	---	14s
Hojas, ppb	< 75,4	---	14s	< 71,2	---	14s
Tallo, ppb	< 36,5	---	14s	< 36,0	---	14s
Muestras con Hg						
Suelo, ppm	11,7 ± 0,30	2,6	1s	11,7 ± 0,30	2,6	1s
Agua de lixiviado, ppb	---	---	---	---	---	---
Tallo, ppb	150 ± 16	10,8	4s	< 72,7	---	5s

*Promedio ± SD (n = 3)

Como se puede observa en las **Tablas 15 - 21**, todas las especies que toleraron la concentración de mercurio aplicada en el experimento poseen una concentración mucho más elevada en las raíces y en los pelos radiculares, en caso de que los hubiera, que en las demás partes. Este comportamiento, se llama “excluidor” y se presenta en la mayoría de las plantas [70]. Lo anterior se debe a que la raíz se comporta como una barrera que evita que el mercurio llegue a las partes aéreas de la planta [94], y, por lo tanto, el metal queda retenido o enlazado a las paredes celulares de la raíz [95].

Al comparar las concentraciones encontradas en las raíces de las especies que resistieron el mercurio, tal como se observa en la **Tabla 22**, la especie *Dieffenbachia* es la que posee las concentraciones más altas en ambos casos con 4360 ± 36 ppb, para el espécimen No. 2 cultivado con fertilizante y 4500 ± 170 ppb, para el espécimen No. 2 cultivado sin fertilizante. Esta especie, al igual que el *Aloe vera* y la *Echeveria gibbiflora*, presenta una raíz principal o raíz pivotante y raíces secundarias o pelos radicales.

Los pelos radicales de la *Dieffenbachia* fueron los únicos que se pelaron, pues su grosor lo permitió. Por tal razón, puede afirmarse, que en el experimento, la *Dieffenbachia* fue la especie que más mercurio acumuló en la raíz. Además, si se comparan las concentraciones obtenidas en las raíces principales de las especies *Dieffenbachia* y *Echeveria gibbiflora* puede notarse una gran diferencia en los valores, siendo para la *Dieffenbachia* $420 \pm 2,5$ ppb la menor concentración y de 1440 ± 48 ppb la mayor concentración, mientras que en la *Echeveria gibbiflora* las concentraciones en las raíces principales están por debajo de 77,30 ppb. Esto indica, que en la *Dieffenbachia* el mercurio no sólo se quedó en los pelos radicales sino que llegó hasta la raíz principal, mientras que en el caso de la *Echeveria gibbiflora* el mercurio no avanzó a través de la raíz.

Es necesario anotar, que de las siete especies que se estudiaron, la *Dieffenbachia* presenta la mayor masa radicular; esto permite una mayor interacción entre el suelo y la planta, lo cual constituye un factor muy importante dentro de la fitorremediación.

Tabla 22. Comparación de las concentraciones de mercurio encontradas en las raíces de las plantas, cultivadas con y sin fertilizante

Especie	Concentraciones*, ppb			
	Con fertilizante		Sin fertilizante	
	Planta 1	Planta 2	Planta 1	Planta 2
<i>Lippia alba</i>	2400 ± 150	3350 ± 85	1930 ± 42	1940 ± 54

Continuación, **Tabla 22**

<i>Echeveria aff. gibbiflora</i> Moc. & Sessé ex DC	< 38,4 [†]	< 38,3 [†]	< 77,3 [†]	< 55,2 [†]
	1220 ± 39 [‡]	2300 ± 120 [‡]	150 ± 1,9 [‡]	240 ± 7,5 [‡]
<i>Dieffenbachia cf. seguine</i> (Jacq.) Shott	1440 ± 48 [†]	1320 ± 15 [†]	420 ± 2,5 [†]	1050 ± 42 [†]
	2040 ± 61 [‡]	4360 ± 36 [‡]	1850 ± 35 [‡]	4500 ± 170 [‡]
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.	420 ± 10	400 ± 10	410 ± 10	410 ± 10
<i>Lippia organoides</i>	1920 ± 67	4300 ± 140	450 ± 8,1	650 ± 11
<i>Helianthus annuus</i>	3400 ± 120	2080 ± 90	860 ± 49	830 ± 28

*Promedio ± SD (n = 3)
[†]Concentraciones en raíces principales, ppb
[‡]Concentraciones en pelos radicales, ppb

La concentración en los tallos de todas las especies en general fue muy baja comparada con la encontrada en las raíces, lo cual indica que no hubo, bajo las condiciones de estudio, una traslocación significativa del mercurio a los tejidos superiores de las plantas. No obstante, las especies *Lippia alba* (en su tallo principal) y *Lippia organoides* fueron las que presentaron una concentración de mercurio más alta en los tallos, tanto en el grupo de plantas cultivadas con fertilizante, como en las plantas para cuyo cultivo no se aplicó fertilizante (Véase, **Figura 6** y **Tabla 23**).

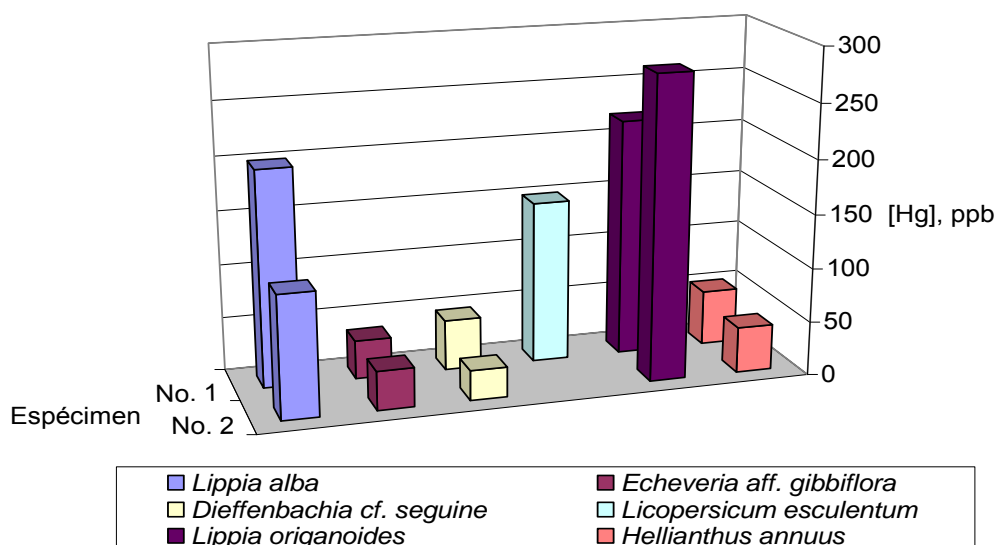


Figura 6. Comparación de las concentraciones de mercurio encontradas en los tallos de las plantas, cultivadas con fertilizante.

Tabla 23. Comparación de las concentraciones de mercurio encontradas en los tallos de las plantas, cultivadas sin fertilizante.

Especie	Concentraciones*, ppb Sin fertilizante	
	Planta 1	Planta 2
<i>Lippia alba</i>	230 ± 9,7 [†]	130 ± 5,8 [†]
	< 77,5 [‡]	< 77,4 [‡]
<i>Echeveria</i> aff. <i>gibbiflora</i> Moc. & Sessé ex DC.	< 36,7	< 36,1
<i>Dieffenbachia</i> cf. <i>seguine</i> (Jacq.) Shott.	< 23,5	< 48,0
<i>Licopersicum esculentum</i>	< 72,7	
<i>Lippia origanoides</i>	280 ± 11	< 114,0
<i>Helianthus annuus</i>	< 48,6	< 83,4

*Promedio ± SD (n = 3)
[†]Concentraciones en tallos principales, ppb
[‡]Concentraciones en tallos de las ramas, ppb

En el caso de las hojas, los niveles de mercurio determinados fueron muy bajos, en comparación con los encontrados en las raíces, pero más altos que en los tallos. La especie *Lippia origanoides* presentó concentración de Hg más alta en las hojas en ambos grupos de plantas, cultivadas con y sin fertilizante. Se encontraron concentraciones de 590 ± 19 ppb en las hojas del espécimen No. 1, y 360 ± 8,4 ppb en las hojas de la planta No. 2, cultivadas con y sin fertilizante, respectivamente.

La medición de mercurio en el aire del vivero en el que se llevó a cabo el experimento dio como resultado una concentración promedio de 120 ng/m³ y mostró un pico de 146 ng/m³ al acercar el equipo a la zona en la que se ubicaron las plantas sembradas en el suelo contaminado. Esta concentración de mercurio en el aire es relativamente baja. El nivel mínimo de riesgo fijado

por la ATSDR es de 200 ng/m³ y 300 ng/m³ es la concentración de referencia establecida por la EPA para iniciar investigaciones por exposición peligrosa a Hg, por lo tanto, la adsorción de mercurio en la hojas fue mínima. Además, teniendo en cuenta que la especie de mercurio que se volatiliza es Hg⁰, se puede confirmar, que el mercurio utilizado en el experimento, Hg²⁺, probablemente, no sufrió reacciones de reducción significativas (Hg²⁺ + 2e⁻ → Hg⁰) y, por tal razón, no se detectó una concentración alta de mercurio en el ambiente de trabajo.

El mercurio en el aire suele ser un factor difícil de controlar en este tipo de experimentos, pues la actividad bacteriana en el suelo y en el agua puede ocasionar una reducción del mercurio iónico y aumentar así su presencia en el aire [96], sin embargo, esto no fue un problema para este trabajo. De todas formas, vale la pena aclarar, que cada una de las plantas se sometió a un lavado exhaustivo antes de su análisis, para retirar mercurio superficial, eventualmente proveniente del aire.

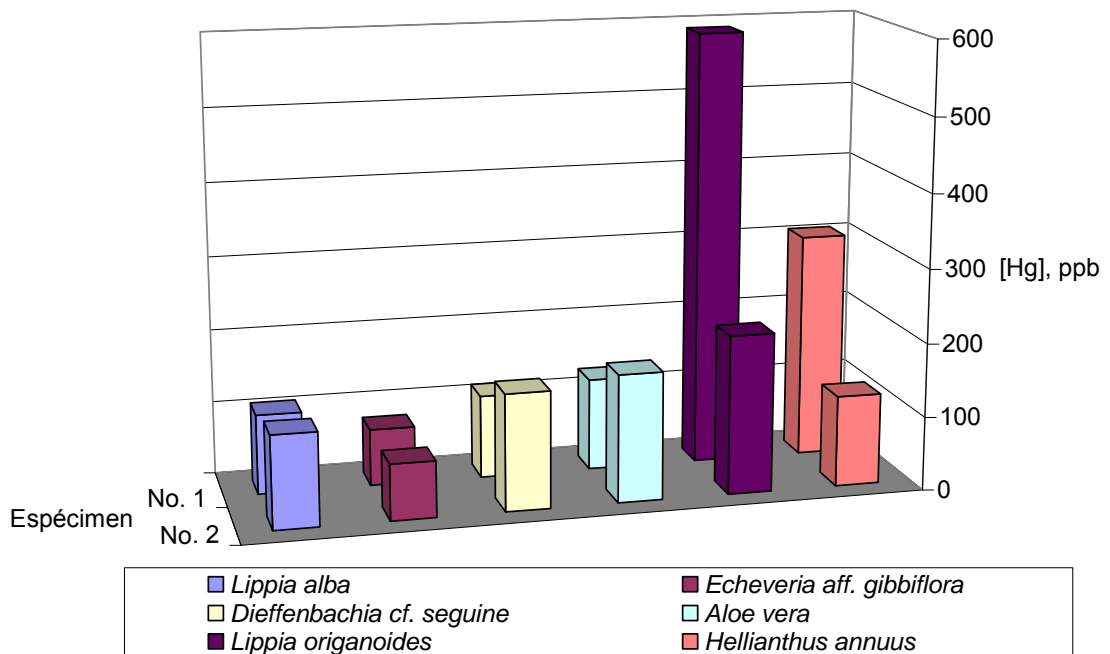


Figura 7. Comparación de las concentraciones de mercurio encontradas en las hojas de las plantas, cultivadas con fertilizante.

La concentración en los tejidos superiores (Véase, **Figura 7** y **Tabla 24**) de la planta refleja parcialmente la eficiencia de las mismas en la remediación de suelos contaminados con metales pesados. Así mismo, la razón entre la concentración del metal en los tejidos superiores y la concentración total en el suelo proporciona una idea sobre la habilidad de las plantas para absorber el metal y translocarlo a los tejidos superiores. Esta relación la propusieron Baker *et al.* [97] y Dahmani-Muller *et al.* [98]. Los autores usaron el término “Factor de Bioacumulación”, BF (*Bioaccumulation Factor*), y lo definieron como $[Hg]_{\text{Tejidos}}/[Hg]_{\text{Suelo}}$, donde $[Hg]_{\text{Tejidos}}$ es la concentración de mercurio en tejidos vegetales y $[Hg]_{\text{Suelo}}$ es la concentración de mercurio inicial en el suelo contaminado.

Tabla 24. Comparación de las concentraciones de mercurio encontradas en las hojas de las plantas, cultivadas sin fertilizante.

Especie	Concentraciones*, ppb Sin fertilizante	
	Planta 1	Planta 2
<i>Lippia alba</i>	200 ± 9,1	180 ± 3,9
<i>Echeveria</i> aff. <i>gibbiflora</i> Moc. & Sessé ex DC.	< 76,4	< 37,0
<i>Dieffenbachia</i> cf. <i>seguine</i> (Jacq.) Shott.	100 ± 5,2	130 ± 2,2
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.	180 ± 3,9	70 ± 3,6
<i>Lippia origanoides</i>	280 ± 2,8	360 ± 8,4
<i>Helianthus annuus</i>	180 ± 6,2	350 ± 2,0
*Promedio ± SD (n = 3)		

Los resultados de BF obtenidos para las plantas que se estudiaron en este trabajo, se muestran en las **Figuras 8 y 9**. Si todas las plantas se sembrasen en suelos con concentraciones iguales del metal, la *Dieffenbachia cf seguine* será la especie con la mayor capacidad de absorción de mercurio en la raíz. Sin embargo, en el estudio de la fitorremediación se buscan especies capaces no sólo de absorber el metal en la raíz, sino también de translocarlo a los

tejidos superiores, es decir, a tallos y hojas. Las especies *Hellianthus annuus* y *Lippia origanoides* mostraron los BF más altos en tejidos superiores, con valores de 0,03 en las hojas de las dos especies en el grupo de plantas cultivado con fertilizante, similares a los obtenidos por E. Moreno-Jiménez [18] para la especie *Marrubium vulgare*, i.e. 0,042, y que según su estudio puede considerarse apta para fitorremediación.

En las **Figuras 8 y 9** se observa el efecto del fertilizante sobre el Factor de Bioacumulación de mercurio. Aquellos especímenes que se cultivaron con el fertilizante mostraron BF en raíz más altos, que los que se cultivaron sin fertilizante, a excepción de las especies *Dieffenbachia cf. seguine* y *Aloe vera*, para las cuales no se observó un cambio significativo. La diferencia en los valores del BF se debe a que el fertilizante NPK aporta los macronutrientes más importantes para el crecimiento de las plantas, tales como el nitrógeno y el fósforo, que influyen positivamente sobre el desarrollo radicular, y por lo tanto, incrementan la capacidad de la planta para absorber sustancias del suelo.

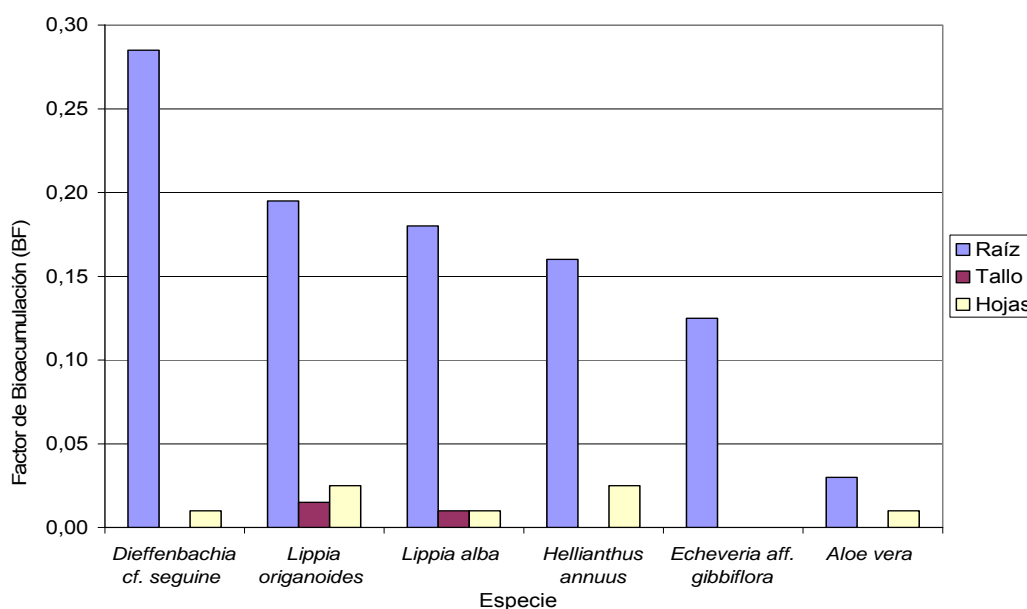


Figura 8. Factores de bioacumulación del grupo de plantas bajo estudio, que se cultivaron con fertilizante.

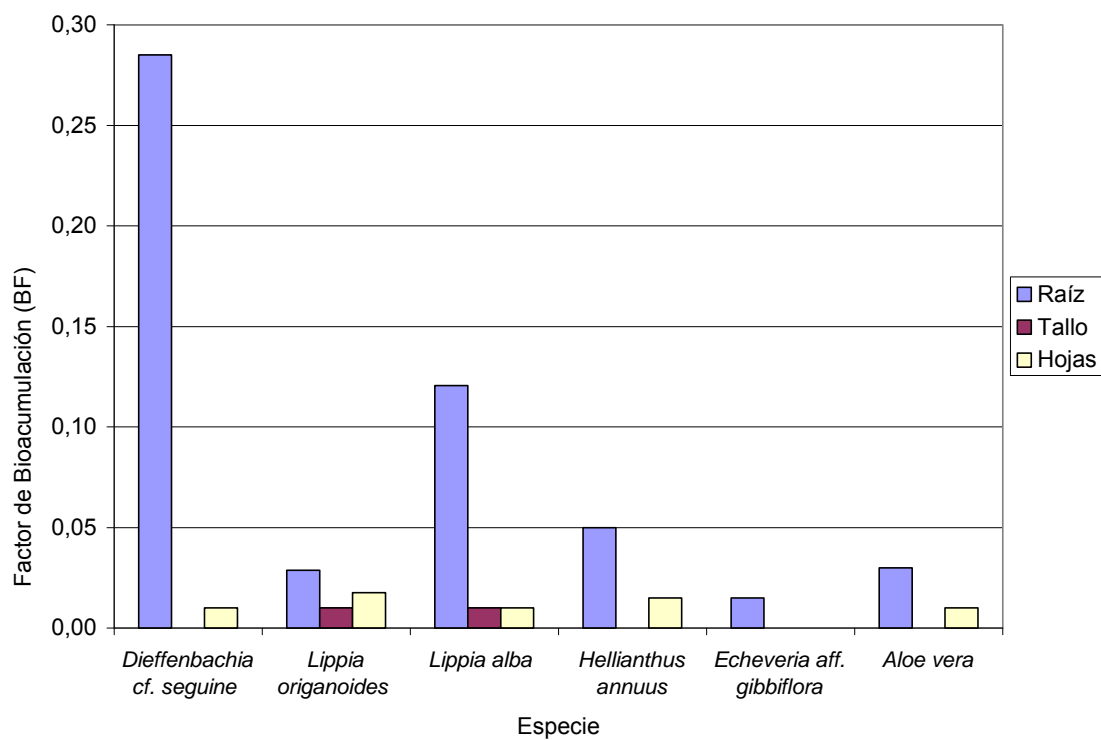


Figura 9. Factores de bioacumulación del grupo de plantas bajo estudio, que se cultivaron sin fertilizante.

4. CONCLUSIONES

- 1) Usando la técnica de cuantificación de mercurio por espectrometría de absorción atómica sin llama con corrección de la línea base por efecto Zeeman, acoplada a los aditamentos de pirólisis y vapor frío para el análisis de muestras sólidas y líquidas, respectivamente, se determinó la concentración de mercurio en blancos, suelo, agua y tejidos de las plantas bajo estudio. Se alcanzaron límites de detección y cuantificación muy bajos, *i.e.* 0,39 y 0,78 ng, para material vegetal; 0,20 y 0,48 ng, para muestras sólidas; 0,011 y 0,023 ppb, para muestras líquidas y 0,87 y 3,1 ng/m³, para muestras gaseosas. Las mediciones se llevaron a cabo con una alta precisión (coeficientes de variación inferiores al 10%).
- 2) La especie *Lycopersicon esculentum* no puede cultivarse en terrenos que presenten concentraciones superiores a 10 ppm de mercurio, ya que, además de que no funcionó como planta fitoextractora, tampoco toleró la concentración de mercurio aplicada al suelo; a diferencia de otras especies, que aunque no translocaron el mercurio del suelo a sus tejidos superiores, sí resistieron la presencia del metal.
- 3) Las especies *Aloe vera* y *Echeveria gibbiflora* resistieron las concentraciones de mercurio que se aplicaron al suelo (13 y 14 ppm, respectivamente), y fueron las que presentaron concentraciones más bajas de Hg en raíces; además, no mostraron translocación del metal hacia sus tejidos superiores. Estas dos especies, aunque no funcionaron como plantas fitorremediadoras, podrían sembrarse, eventualmente, en un terreno contaminado con mercurio con concentraciones iguales o inferiores a las utilizadas en el experimento, sin que se presenten problemas de fitotoxicidad. Así mismo, sus tejidos superiores podrían

usarse para los fines que se requieran, como en el caso del *Aloe vera* que sus hojas se utilizan ampliamente en la industria cosmética.

- 4) La especie *Dieffenbachia seguine* mostró los valores más altos de acumulación de mercurio en raíz, y presentó translocación del mercurio desde sus pelos radiculares hasta la raíz principal de la planta. No obstante, las concentraciones de mercurio en sus tejidos superiores fueron inferiores a los 160 ppb. Por su amplio sistema radicular y, por lo anteriormente mencionado, la planta *Dieffenbachia seguine* podría ser útil como fitoestabilizadora del mercurio presente en suelos contaminados, ayudando a disminuir la movilidad del metal al retenerlo en sus raíces.
- 5) El factor de bioacumulación resultó ser una herramienta muy útil ya que permitió la comparación de los resultados obtenidos con los encontrados para las especies *Rumex induratus* y *Marrubium vulgare* [18], que fueron consideradas aptas para la fitorremediación de mercurio. Según esta comparación, las especies *Lippia origanoides* y *Helianthus annuus* pueden servir como plantas fitoextractoras, ya que sus factores de bioacumulación en raíz superaron los valores encontrados en las plantas *Rumex induratus* y *Marrubium vulgare* (*Rumex induratus*, 0,07 y *Marrubium vulgare*, 0,12; *Lippia origanoides*, 0,20 y *Helianthus annuus*, 0,16) y sus factores de acumulación en hojas se acercan al encontrado para la especie *Marrubium vulgare* (*Marrubium vulgare* - 0,042; *Lippia origanoides* y *Helianthus annuus* - 0,03).
- 6) La aplicación del fertilizante *NPK* mostró resultados positivos en los valores obtenidos para los factores de bioacumulación, *BF*. La utilización de fertilizante debe considerarse como un aspecto fundamental en el momento de implementar a la fitorremediación como alternativa

descontaminante de suelos, ya que contribuye a mejorar el rendimiento de la técnica y no eleva mucho los costos.

5. RECOMENDACIONES

Debido a la baja biodisponibilidad de mercurio en el suelo se recomienda en estudios posteriores utilizar agentes acomplejantes o quelantes que aumenten la concentración del metal disponible para las plantas.

En este estudio, se descartaron las especies *Lycopersicon esculentum*, *Echeveria gibbiflora* y *Aloe vera* como plantas fitorremediadoras, pero se recomienda estudiar las especies *Dieffenbahia seguine*, *Helianthus annuus*, *Lippia alba* y *Lippia origanoides*, mejorando la fitodisponibilidad del metal (regulando el pH del suelo y/o adicionando agentes quelantes al mismo), aplicando fertilizante tipo NPK, utilizando concentraciones de mercurio en el suelo más altas y exponiéndolas al metal por un tiempo más prolongado, de tal manera, que se pueda evaluar el comportamiento de estas especies en condiciones más drásticas, para conocer así más detalladamente su posible uso como plantas fitorremediadoras.

BIBLIOGRAFÍA

1. MANCERA, N.J.; ALVAREZ, R. Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuícolas de Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, **2006**, 11, p.p. 3-23.
2. PILON-SMITH, E.; PILON, M. Breeding mercury-breathing plants for environmental clean-up. *Trends in Plant Science*, **2000**, 5, p.p. 235-236.
3. LEHR, J.H.(Ed.). Wiley's Remediation Technologies Handbook: Major Contaminant Chemicals and Chemical Groups. Hoboken, NJ, USA: *John Wiley & Sons, Incorporated*, **2004**, 869 p.
4. MEAGHER, R.B. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biotechnology*, **2000**, 3, p.p. 153-162.
5. BAKER, A.J.M.; BROOKS, R.R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery.*, **1989**, 1, p.p. 81-126.
6. RASKIN, I.; KUMAR, P.B.A.N.; DUSHENKOV, S.; SALT, D.E. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology*, **1994**, 5, p.p. 285-290.
7. PULFORD, I.D.; WATSON, C. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees – a review. *Environment International*, **2003**, 29, (4), p.p. 529–540.

8. EBINGHAUS, R.; MUNTHE, J. Distribution of atmospheric mercury species in Northern Europe: final results from the MOE project. *Atmospheric Environment*, **2003**, 37, (1), p.p. 9-20.
9. PORCELLA, D.B.; PILGRIM, W. Developing consensus: mercury science and policy in the NAFTA countries (Canada, the United States and Mexico). *The Science of the Total Environment*, **2000**, 261, (1-3), p.p. 185-193.
10. FITZGERALD, W.F. Is mercury increasing in the atmosphere – the need for an atmospheric mercury network. *Water, Air and Soil Pollution*, **1995**, 80, (1-4), p.p. 245–254.
11. STRATTON, W.J.; LINDBERG, S.E. Use of a refluxing mist chamber for measurement of gas-phase water-soluble mercury (II) species in the atmosphere. *Water, Air and Soil Pollution*, **1995**, 80, p.p. 1269–1278.
12. BLOOM, N.S.; FITZGERALD, W.F. Determination of volatile mercury species at the picogram level by low-temperature gas-chromatography with cold-vapour atomic fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, **1988**, 208, (1-2), p.p. 151–161.
13. WHO Regional office for Europe. Air quality guidelines (2^a Edición). Copenhagen, Denmark, **2000**, p.p. 1-15.
14. ULLRICH, S.M.; TANTON, T.W.; ABDRAHITOVA, S.A. Mercury in the aquatic environment: A review of factors affecting methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **2001**, 31, (3), p.p. 241–293.

15. LAURIER, F.J.G.; MASON, R.P.; GILL, G.A.; WHALIN L. Mercury distributions in the North Pacific Ocean—20 years of observations. *Marine Chemistry*, **2004**, 90, p.p. 3–19.
16. ALLOWAY, B.J. (Ed.). Heavy metals in soils (2^a edición). *Blackie Academic & Professional Press*, London, UK. p.p. 245–259.
17. LENKA, M.; PANDA, K.K.; PANDA, B.B. Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. 4. Bioconcentration of mercury in in-situ aquatic and terrestrial plants at Ganjam, India. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **1992**, 22, (2), p.p. 195–202.
18. E. MORENO-JIMÉNEZ A.; R. GAMARRA B.; R.O. CARPENA-RUIZ A.; R. MILLAN C.; J.M. PEÑALOSA A.; E. ESTEBAN A. Mercury bioaccumulation and phytotoxicity in two wild plant species of Almadén area. *Chemosphere*, **2006**, 63, p.p. 1969 – 1973.
19. SCHUSTER, E. The behavior of mercury in the soil with special emphasis on complexation and adsorption processes – a review of the literature. *Water, Air and Soil Pollution*, **1991**, 56, p.p. 653–666.
20. LIFVERGREN, T. Remediation of mercury polluted soil. Ph.D. Thesis, Örebro Studies in Environmental Science 1, Örebro University, Örebro, Sweden, **2001**.
21. ALLARD, B.; ARSENIE, I. Abiotic reduction of mercury by humic substances in aquatic system – an important process for the mercury cycle. *Water, Air and Soil Pollution*, **1991**, 56, p.p. 457–464.

22. XIAO, Z.F.; STROMBERG, D.; LINDQVIST, O. Influence of humic substances on photolysis of divalent mercury in aqueous-solution. *Water, Air and Soil Pollution*, **1995**, 80, (1-4), p.p. 789–798.
23. BEGLEY, T.P.; WALTS, A.E.; WALSH, C.T. Mechanistic studies of a protonolytic organomercurial cleaving enzyme – bacterial organomercurial lyase. *Biochemistry*, **1986**, 25, (22), p.p. 7192–7200.
24. COMPEAU, G.C.; BARTHA, R. Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied Environmental Microbiology*, **1985**, 50, (2), p.p. 498–502.
25. OLSON, B.H.; COOPER, R.C. Comparison of aerobic and anaerobic methylation of mercuric chloride by San Francisco Bay sediments. *Water Research*, **1976**, 10, p.p. 113–116.
26. MATILAINEN, T.; VERTA, M.; KORHONEN, H.; UUSI-RAUVA, A.; NIEMI, M. Behaviour of mercury in soil profiles: Impact of increased precipitation, acidity, and fertilization on mercury methylation. *Water, Air, Soil Pollution*, **2001**, 125, (1-4), p.p. 105–119.
27. TCHOUNWOU, P.B.; AYENSU, W.K.; NINASHVILI, N.; SUTTON, D. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environmental Toxicology*, **2003**, 18, (3), p.p. 149–175.
28. RASKIN, I.; SMITH, R. D.; SALT D. E. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, **1997**, 8, p.p. 221-226.
29. SALT, D.E.; SMITH, R. D.; RASKIN, I. Phytoremediation, Annual Revision. *Plant Physiology*, **1998**, 49, p.p. 643-668.

30. SALT, D. E.; BLAYLOCK, M.; KUMAR, P.B.A.N.; DUSHENKOV, V.; ENSLEY, B.D.; CHET, L.; RASKIN, L. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, **1995**, 13, p.p. 468-474.
31. RUGH, C.L.; WILDE, H.D.; STACK, N.M.; THOMPSON, D.M.; SUMMERS, A.O.; MEAGHER, R.B. Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial merA gene. *National Academy of Science, USA*, **1996**, 93, p.p. 3182-3187.
32. BROWN, S.L.; CHANEY, R.L.; ANGLE, J.S.; BAKER, A.J.M. Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and metal tolerant *Silene vulgaris* grown on sludge-amended soils. *Environmental Science Technology*, **1995**, 29, p.p. 1581-1585.
33. GARBISU, C.; ALKORTA, I. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology*, **2001**, 77, p.p. 229-236.
34. BEAUFORD, W.; BARBER, J.; BARRINGER, A.R. Uptake and distribution of Hg within higher plants. *Plant Physiology*, **1977**, 39, p.p. 261- 265.
35. GODBOLD, D. L.; HÜTTERMAN, A. Inhibition of photosynthesis and transpiration in relation to mercury-induced root damage in spruce seedlings. *Plant Physiology*, **1988**, 7, p.p. 270-275.
36. SAMECKA-CYMERMAN, R.B.; KEMPERS, A.J. Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macrophytes around Wroclaw, Poland. *Ecotoxicology Environmental Safety*, **1996**, 35, p.p. 242– 247.

37. ARTHUR, E.; RICE, P.J.; RICE, P.J.; ANDERSON, T. Phytoremediation-An Overview. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **2005**, 24, (2), 109 p.
38. QIAN, J.H.; ZAYED, A.; ZHU, M.L; YU, M.; TERRY, N. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: III. Uptake and accumulation of ten trace elements by twelve plant species. *Journal of Environmental Quality*, **1999**, 28, (5), p.p. 1448– 56.
39. BENNICELLI, A.; STEZPNIEWSKA, A.B.; BANACH, A.; SZAJNOCHA, A.; OSTROWSKI, C. The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals [Hg(II), Cr(III), Cr(VI)] from municipal waste water. *Chemosphere*, **2003**, 55, p.p. 141 – 146.
40. SKINNER, K.; WRIGHT N.; PORTER-GOFF, E. Mercury uptake and accumulation by four species of aquatic plants, *Environmental Pollution*, **2007**, 145, (1), p.p. 234 – 237.
41. FARWELL, A. J.; VESELY, S.; NERO, V.; RODRIGUEZ, H.; McCORMACK, K.; SHAH, S.; DIXON, G.; GLICK, B. R. Tolerance of transgenic canola plants (*Brassica napus*) amended with plant growth-promoting bacteria to flooding stress at a metal-contaminated field site. *Environmental Pollution*, **2007**, 147, (3), p.p. 540-545.
42. DWIVEDI, S.; SRIVASTA, S.; MISHRA, S.; DIXIT, B.; KUMAR, A.; TRIPATHI, R.D. Screening of native plants and algae growing on fly-ash affected areas near National Thermal Power Corporation, Tanda, Uttar Pradesh, India for accumulation of toxic heavy metals. *Journal of Hazardous Materials*, **2008**, 158, (2-3), p.p. 359 - 365.
43. BROOKS, R.R.; Chambers, M.F.; Nicks, L.J.; Robinson, B.H. Phytomining. *Trends in Plant Science*, **1998**, 3, p.p. 359-362.

44. KUMAR, P.B.A.N.; DUSHENKOV, V.; MOTTO, H.; RASKIN, L. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science Technology*, **1995**, 29, p.p. 1232-1238.
45. Por qué biotecnología, **2006**, [Consultada en agosto de 2006] http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec_36.asp?cuaderno=36.
46. HARBORNE, J.B. Introduction to Ecological Biochemistry. *Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publishers*, New York. **1989**, 278 p.
47. ROBINSON, N.J.; URWIN, P.E.; ROBINSON, P.J.; JACKSON, P.J. Gene expression in relation to metal toxicity and tolerance. In: Basra, A.S. (Ed.), Stress-Induced Gene Expression in Plants. *Harwood Academic Publisher*, New York, **1994**, p.p. 209-248.
48. BROWN, S.L.; CHANEY, R.L.; ANGLE, J.S.; BAKER, A.J.M. Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and Bladder Campion for zinc- and cadmium-contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*, **1994**, 23, p.p. 1151-1157.
49. CUNNINGHAM, S.D.; BERTI, W.R.; HUANG, J.W. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology*, **1995**, 13, p.p. 393-397.
50. CHANEY, R.L.; MALIK, M.; LI, Y.M.; BROWN, S.L.; BREWER, E.P.; ANGLE, J.S.; BAKER, A.J.M. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*, **1997**, 8, p.p. 279-284.
51. ERNST, W.H.O.; SCHAT, H.; VERKLEIJ, J.A.C. Evolutionary biology of metal resistance in *Silene vulgaris*. *Evolution Trends*, **1990**, 4, p.p. 45-51.

52. BOYD, R.S.; SHAW, J.J.; MARTENS, S.N. Nickel hyperaccumulation defends *Streptanthus polygaloides* (*Brassicaceae*) against pathogens. *American Journal of Botany*, **1994**, 81, p.p. 294-300.
53. BOYD, R.S.; MARTENS, S.N. The raison d'être for metal hyperaccumulation by plants. In: The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils, Proceedings of the *First International Conference on Serpentine Ecology*, Intercept Ltd., Andover, Hampshire, **1995**, p.p. 279-289.
54. BOYD, R.S.; MARTENS, S.N. Nickel hyperaccumulated by *Thlaspi montanum* var. *montanum* is acutely toxic to an insect herbivore. *Oikos*, **1994**, 70, p.p. 21-25.
55. BLAYLOCK, M.J.; SALT, D.E.; DUSHENKOV, S.; ZAKHAROVA, O.; GUSSMAN, C. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil applied chelating agents. *Environmental Science Technology*, **1997**, 31, p.p. 860-865.
56. MACEK, T.; MACKOVA, M.; KA, J. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances*, **2000**, 18, (1), p.p. 23–34.
57. COQUERY, M.; WELBOURN, P.M. Mercury uptake from contaminated water and sediment by the rooted and submerged aquatic macrophyte *Eriocaulon septangulare*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **1994**, 26, (3), p.p. 335–341.
58. KALAC, P.; SVOBODA, L. A. review of trace element concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry*, **2000**, 69, (3), p.p. 273–281.

59. RIBEYRE, F.; BOUDOU, A. Experimental study of inorganic and methylmercury bioaccumulation by four species of freshwater rooted macrophytes from water and sediment contamination sources. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **1994**, 28, p.p. 270–286.
60. CAVALLINI, A.; Natali, L.; Durante, M.; Maserti, B. Mercury uptake, distribution and DNA affinity in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) plants. *Science of the Total Environment*, **1999**, 243/244, p.p. 119–127.
61. GODBOLD, D.L. Mercury induced root damage in spruce seedlings. *Water, Air and Soil Pollution*, **1991**, 56, p.p. 823–831.
62. BROWNE, C.L.; FANG, S.C. Uptake of mercury vapor by wheat. *Plant Physiology*, **1978**, 61, p.p. 430–433.
63. DU, Sh.H.; FANG, Sh.C. Uptake of elemental mercury vapor by C3 and C4 species. *Environmental and Experimental Botany*, **1982**, 22, (4), p.p. 437–443.
64. FERNÁNDEZ, J.A.; ABOAL, J.R.; CARBALLEIRA, A. Use of native and transplanted mosses as complementary techniques for biomonitoring mercury around an industrial facility. *Science of the Total Environment*, **2000**, 256, (2-3), p.p. 151–161.
65. SIEGEL, S.M.; PUERNER, N.J.; SPEITEL, T.W. Release of volatile mercury from vascular plants. *Physiology Plantarum*, **1974**, 32, p.p. 174–176.
66. KOZUCHOWSKI, J.; JOHNSON, D.L. Gaseous emissions of mercury from an aquatic vascular plant. *Nature*, **1978**, 274, p.p. 468–469.

67. HANSON, P.J.; LINDBERG, S.E.; TABBERER, T.A.; OWENS, J.G.; KIM, K.H. Foliar exchange of mercury vapor: evidence for a compensation point. *Water, Air and Soil Pollution*, **1995**, 80, p.p. 373–382.
68. ERICKSEN, J.A.; GUSTIN, M.S. Foliar exchange of mercury as a function of soil and air mercury concentrations. *Science of the Total Environment*, **2004**, 324, (1-3), p.p. 271–279.
69. WANG, Y. **2004**. Phytoremediation of mercury by terrestrial plants. Doctoras Thesis, Department of Botany, Stockolm University, Sweden, p.13.
70. PATRA, M.; SHARMA, A. Mercury toxicity in plants. *The Botanical Review*, **2000**, 66, (3), p.p. 379–421.
71. DU, SH.H.; FANG, SH.C. Catalase activity of C3 and C4 species and its relationship to mercury vapor uptake. *Environmental and Experimental Botany*, **1983**, 23, p.p. 347–353.
72. OGATA, M.; AIKOH, H. Mechanism of metallic mercury oxidation *in vitro* by catalase and peroxidase. *Biochemical Pharmacology*, **1984**, 33, p.p. 490–493.
73. CLARCKSON, T.W. The pharmacology of mercury compounds. *Annual Review of Pharmacology*, **1972**, 12, p.p. 375-406.
74. BIZILY, S.P.; RUGH, C.L.; MEAGHER, R.B. Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. *Nature Biotechnology*, **2000**, 18, p.p. 213–217.

75. BRAECKMAN, B.; CORNELIS, R.; RZEZNIK, U.; RAES, H. Uptake of HgCl₂ and MeHgCl in an insect cell line (*Aedes albopictus* C6/36). *Environmental Research*, **1998**, 79, (1), p.p. 33–40.
76. GODBOLD, D.L. Mercury in forest ecosystems: Risk and research needs. In: Watras, C. J., and Huckabee, J. W., (Eds) *Mercury pollution – Integration and Synthesis*, **1994**, Lewis Publishers, Boca Raton, p.p. 295–303.
77. KAWADE, Y. The interaction of mercuric chloride with ribonucleic acids and polyribonucleotides. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **1963**, 10, p.p. 204–208.
78. SHOLOPOV, S. Zeeman absorption spectrometer RA-915+ for direct determination of mercury in air and complex matrix samples. *Fuel Processing Technology*, **2004**, 85, p.p. 473-485.
79. BIN, C.; XIAORU, W.; LEE, F.S. Pyrolysis coupled with atomic absorption spectrometry for the determination of mercury in Chinese medicinal material. *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 447, p.p. 161-169.
80. LUMEX. User's manual RA-915+, St Peterburg, Rusia, **2001**, 25 p.
81. JANUARY, M. C.; CUTRIGHT, T. J.; VAN KEULEN, H.; WEI, R. Hydroponic phytoremediation of Cd, Cr, Ni, As, and Fe: Can *Helianthus annuus* hyperaccumulate multiple heavy metals?. *Chemosphere*, **2008**, 70, (3), p.p. 531-537.
82. MARCHIOL, L.; FELLET, G.; PEROSA, D.; ZERBI, G. Removal of trace elements by *Sorghum bicolor* and *Helianthus annuus* in a site polluted by industrial wastes: A field experience. *Plant Physiology and Biochemistry*, **2007**, 45, (5), p.p. 379-387.

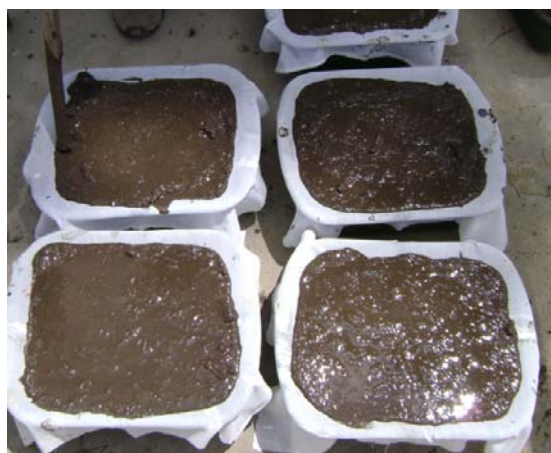
83. NIU, Z.; SUN, L.; SUN, T.; LI, Y.; WANG, H. Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa, and mustard in hydroponic culture. *Journal of Environmental Science*, **2007**, 19, (8), p.p. 961-967.
84. LIU, Y.; MU, Y.; ZHU, Y. G.; DING, H.; ARENS, N. Z. Which ornamental plant species effectively remove benzene from indoor air?. *Atmospheric Environment*, **2007**, 41, (3), p.p. 650-654.
85. MANGABEIRA, P. A.; GAVRILOV, K. L.; FURTADO DE ALMEIDA, A. A.; OLIVEIRA, A. H.; SEVERO, M. I.; SANTANA, T.; DA COSTA, D.; LABEJOF, L.; ESCAIG, F.; LEVI-SETTI, R.; SCHRAMM, M.; GRENIER, F.; GALLE, P. Chromium localization in plant tissues of *Lycopersicum esculentum* Mill using ICP-MS and ion microscopy (SIMS). *Applied Surface Science*, **2006**, 252, (10), p.p. 3488-3501.
86. CARBONELL, A.; BURLÓ, F.; BURGOS, A.; LÓPEZ, E.; MATAIX, J. The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. *Scientia Horticulturae*, **1997**, 71, (3-4), p.p. 167-176.
87. GÓMEZ, G.A. Análisis de la composición química y de la actividad biológica de los aceites esenciales de dos quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br., en funciones de las condiciones de extracción y secado de la planta: Trabajo de Grado (Química). Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2007**, p.p. 87-88.
88. RUÍZ, C.A. Estudio de los metabolitos secundarios volátiles del aceite esencial de la especie *Lippia Origanoides* H. B. K. en tres estados fenológicos: Trabajo de Grado (Química). Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2008**, p.p. 70-72.

89. MUÑOZ, F.A.; DELGADO, J.E. Determinación del mercurio en suelos de Bucaramanga, utilizando un pirolizador acoplado a un detector de mercurio basado en espectroscopía de absorción atómica diferencial de Zeeman. Bucaramanga: Trabajo de Grado (Química). Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, **2006**. 208 p.
90. PIRRONE, N.; MUNTHE, J.; BARREGÅRD, L.; EHRLICH, H.C.; PETERSEN, G.; FERNANDEZ, R.; HANSEN, J.C.; GRANDJEAN, P.; HORVAT, M.; STEINNES, E.; AHRENS, R.; PACYNA, J.M.; BOROWIAK, A.; BOFFETTA, P.; WICHMANN-FIEBIG, M. EU Ambient Air Pollution by Mercury (Hg) - Position Paper. Office for Official Publications of the European Communities, **2001**. Submitted by Italy.
91. CURLIC, J.; SEFCIK, P.; VIECHOVA, Z. Proceedings from meeting of the *ad hoc* international expert group on effect-based critical limits for heavy metals. Soil Science and Conservation Research Institute, Bratislava, **2000**.
92. MILLÁN, R.; GAMARRA, R.; SCHMID, T.; SIERRA, M.J.; QUEJIDO, A.J.; SÁNCHEZ, D.M.; CARDONA, A.I.; FERNÁNDEZ, M.; VERA, R. Mercury content in vegetation and soils of the Almadén mining area (Spain). *Science of the Total Environment*, **2006**, 368, p.p. 79–87.
93. YANG, X.; FENG, Y.; HE, Z.; STOFELLA, P. Molecular mechanism of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **2005**, 18, p.p. 339-353.
94. POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Can metals defend plants against biotic stress?. *Trends in Plant Science*, **2006**, 11, (6), p.p. 288-295.

95. WANG, Y.; GREGER, M. Clonal differences in mercury tolerance, accumulation, and distribution in willow. *Journal of Environmental Quality*, **2004**, 33, p.p. 1779–1785.
96. WAGNER–DOBLER, I.; VON CANSTEIN, H.; LI, Y., TIMMIS, K.N.; DECKWER, W.D. Removal of mercury from chemical wastewater by microorganisms in technical scale. *Environmental Science and Technology*, **2000**, 34, p.p. 4628–4634.
97. BAKER, A.J.M.; MCGRATH, S.P.; SIDOLI, C.M.D.; REEVES, R.D. The possibility of *in-situ* heavy-metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resources, Conservation and Recycling*, **1994**, 11, p.p. 41–49.
98. DAHMANI-MULLER, H.; VAN OORT, BALABANE, M. Metal extraction by *Arabidopsis halleri* grown on an unpolluted soil amended with various metal-bearing solids: a pot experiment. *Environmental Pollution*, **2001**, 114, p.p. 77–84.

ANEXOS

ANEXO A. Imágenes correspondientes a la adecuación del suelo para el experimento.



ANEXO B. Foto de la especie *Lippia origanoides*.



ANEXO C. Foto de la especie *Lippia alba*.



ANEXO D. Foto de la especie *Aloe vera* (L.) Burm. f.



ANEXO E. Foto de la especie *Helianthus annuus*.



ANEXO F. Foto de la especie *Dieffenbachia* cf. *seguine* (Jacq.) Shott.



ANEXO G. Foto de la especie *Lycopersicon esculentum*.



ANEXO H. Foto de la especie *Echeveria* aff. *gibbiflora* Moc. & Sessé ex DC.



ANEXO J. Foto de la siembra de las plantas en el suelo contaminado.



ANEXO K. Fotos del lavado del material vegetal.



ANEXO L. Fotos de la división del material vegetal.



ANEXO M. Foto del acoplamiento RA-915⁺/RP-91C.



ANEXO N. Foto del acoplamiento RA-915⁺/RP-91.



ANEXO P. Foto del equipo RA-915⁺ para el análisis de muestras gaseosas.



ANEXO Q. Plantas de tomate después de 2 meses de exposición al mercurio en el suelo.

