

ACUMULACION DE ALTAS CONCENTRACIONES DE COBRE EN PLANTAS DE
Tithonia diversifolia
EN DIFERENTES TIPOS DE SUELOS

CAROLINA PALACIOS
JOHNY W. SANCHEZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2006

ACUMULACION DE ALTAS CONCENTRACIONES DE COBRE EN PLANTAS DE
Tithonia diversifolia
EN DIFERENTES TIPOS DE SUELOS

CAROLINA PALACIOS
JOHNY SANCHEZ

Trabajo de Grado para optar al Título de Química

Director
Dr. JAIME CAMARGO HERNÁNDEZ
Químico

Codirector
Dr. NELSON RODRIGUEZ
Biólogo

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2006

DEDICATORIA

A Dios al ser que le debo todo en la vida.

A mis nonos, José y Maria quienes fueron la base sobre la cual edifiqué mis triunfos.

A mi madre Marina Palacios quien con su ayuda, entrega y amor hizo realidad este sueño y a quien siempre dedicaré todos mis triunfos.

A mi hermano Jhon Freddy por su apoyo incondicional y sabios consejos.

A mi tío Cristian por su ayuda permanente desde mi niñez hasta el día de hoy.

A mi sobrino Alejandro, mis primos Brigith y Cristian por estar allí cuando necesitaba una sonrisa para seguir adelante.

A Rafael Antonio Mantilla....., mi novio quien estuvo siempre a mi lado durante esta etapa de mi vida.

CAROLINA PALACIOS

DEDICATORIA

- A DIOS y a la VIRGEN MARÍA por ser mis guías durante todo el transcurso de mi vida y por permitirme alcanzar este logro tan anhelado.
- A mis Padres ALFONSO y TERESA, por todo su amor y entrega desinteresada para poder lograr esta meta.
- A mis Hermanos JAIRO y EDWIN por su colaboración incondicional.
- A MARTHA por su constante apoyo emocional durante mi carrera.

JOHNY WOLFART

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

Nuestros agradecimientos en primer lugar a Dios y a nuestros padres quienes con su comprensión y apoyo hicieron posible culminar nuestra formación universitaria.

A los profesores Jaime Camargo Hernández y Nelson Rodríguez por su dedicación, esfuerzo e invaluable aportes mediante su dirección en este proyecto.

Al Laboratorio Químico de Suelos y su personal especialmente al Dr. Hernán Castellanos y al señor Libardo por brindarnos la posibilidad de crecer en nuestra formación académica y práctica.

A los profesores Enrique Ávila y Yolanda Vargas por su valiosa colaboración en la calificación del proyecto de grado.

Finalmente a todos los amigos quienes con su comprensión y apoyo nos motivaron en la culminación de nuestros estudios.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. FUNDAMENTO TEÓRICO	17
1.1 ANTECEDENTES	17
1.2 SUELO	17
1.2.1 Naturaleza del suelo	17
1.2.2 Dinámica de los metales pesados en el suelo	18
1.2.3 Efectos de los contaminantes sobre el suelo	20
1.2.4 El cobre en el suelo	20
1.3 METODOS DE DESCONTAMINACION DE SUELOS	21
1.3.1 Extracción.	21
1.3.2 Tratamiento químico.	21
1.3.3 Tratamiento electroquímico.	21
1.3.4 Tratamiento térmico	21
1.3.5 Tratamiento microbiológico.	22
1.4 TIPOS DE BIORREMEDIACIÓN	22
1.4.1 Biorremediación microbiana	22
1.4.2 Biorremediación animal.	22
1.4.3 Fitorremediación.	23
1.4.4 Ventajas de la fitorremediación	25
1.4.4.1 Requisitos para iniciar el proceso de fitorremediación (52)	26
1.5 FUNCIONES DEL COBRE EN LAS PLANTAS	26
1.5.1 Síntomas de deficiencia de cobre en las plantas	27
1.5.2 Toxicidad del cobre	28

	Pág.
1.5.2.1 Efectos característicos.	28
1.6 LAS PLANTAS COMO ESTRUCTURAS DE REMEDIACION DE SUELOS CONTAMINADOS	29
1.6.1 Transporte de los contaminantes dentro de la planta.	30
1.6.2 Metabolismo dentro de la planta	31
1.7 <i>Tithonia diversifolia</i>	32
1.7.1 Descripción botánica y clasificación.	33
1.7.2 Propagación por estacas.	34
2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	35
2.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS UTILIZADOS	35
2.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	36
2.2.1 Procedimiento para determinar el porcentaje de humedad en el tejido vegetal de la <i>Tithonia diversifolia</i>	36
2.2.1.1 Procedimiento para determinar el porcentaje de cenizas en tejido vegetal de <i>Tithonia diversifolia</i> .	37
2.2.1.2 Procedimiento para la digestión con ácido de las cenizas.	37
2.2.1.3 Regresión Lineal Simple (R.L.S.).	38
3. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	39
3.1 ANALISIS ESTADÍSTICO DE CONCENTRACION DE COBRE Y BIOMASA	39
CONCLUSIONES	46
RECOMENDACIONES	47
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS	54

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Caracterización de los suelos franco-arenoso y franco-arcillo-Arenoso	36
Tabla 2. Regresión Lineal Simple (R.L.S.) de instrumento de medición.	38
Tabla 3. Acumulación de cobre en hojas y raíz a los 45 y 90 días en los suelos franco-arenoso y franco-arcillo-arenoso.	39
Tabla 4. Análisis de varianza ANOVA de ppm de Cobre en hojas y raíz	42
Tabla 5. Análisis factorial ANOVA 2x3x3 para biomasa en base seca en hojas y raíz	43
Tabla 6. Coeficientes de Spearman para ppm de Cobre	44
Tabla 7. Coeficiente de Spearman para biomasa en base seca en hojas y raíz	44

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Contaminación por metales pesados	19
Figura 2. Técnicas de fitorremediación	23
Figura 3. Carencia de cobre en hojas de melocotonero	27
Figura 4. <i>Tithonia diversifolia</i>	32
Figura 5. Arbusto	33
Figura 6. Acumulación de cobre en hojas en el suelo franco-arenoso	40
Figura 7. Acumulación de cobre en la raíz en el suelo franco-arenoso.	40
Figura 8. Acumulación de cobre en hojas en el suelo franco-arcillo-arenoso	41
Figura 9. Acumulación de cobre en raíz en el suelo franco-arcillo-arenoso	41
Figura 10. Plantas en el suelo franco-arcillo-arenoso, a los 45 días de sembradas, a una concentración de 4.5 ppm de cobre	59
Figura 11. Plantas en el suelo franco-arcillo-arenoso, 45 días de sembradas a una concentración de 6.0 ppm de cobre	59
Figura 12. Planta en el suelo franco-arenoso 45 días de sembradas a una concentración de 6.0 ppm de cobre	60
Figura 13. Plantas en el suelo franco-arenoso a los 45 días de sembradas con una concentración de 4.5 ppm de cobre	60
Figura 14. Plantas en el suelo franco-arcillo-arenoso a los 90 día de sembradas con una concentración de 4.5 ppm de cobre	61
Figura 15. Plantas en el suelo franco-arcillo-arenoso a los 90 día de sembradas con una concentración de 6.0 ppm de cobre	61
Figura 16. Planta en el suelo franco-arenoso 90 días de sembradas a una concentración de 4.5 ppm de cobre	62
Figura 17. Planta en el suelo franco-arenoso 90 días de sembradas a una concentración de 6.0 ppm de cobre	62
Figura 18. Tipo de raíz que se presentaron en las planta sembradas en el suelo franco-arenoso	63
Figura 19. Tipo de raíz que se presentaron en las plantas sembradas en el suelo franco-arcillo-arenoso	63

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Porcentajes de humedad en muestras de raíz y hojas en la planta <i>Tithonia diversifolia</i> a los 45 días de sembradas las estacas	54
Anexo B. Porcentajes de humedad en muestras de raíz y hojas de la planta <i>Tithonia diversifolia</i> para 90 días de sembradas las estacas	55
Anexo C. Tabla de porcentajes de ceniza en muestras de raíz y hojas en la Planta	56
Anexo D. Porcentajes de cenizas en muestras de raíz y hojas de la planta <i>Tithonia diversifolia</i> en un tiempo de 90 días de sembradas las estacas	57
Anexo E. Regresión lineal simple para la absorción de cobre en hojas y raíz de la planta <i>Tithonia diversifolia</i>	58
Anexo F. Imágenes de las plantas en los suelos franco-arcillo-arenoso y franco-arenoso a los 45 y 90 días de sembradas	59

RESUMEN

Título:

ACUMULACION DE ALTAS CONCENTRACIONES DE COBRE EN PLANTAS DE *Tithonia diversifolia* EN DIFERENTES TIPOS DE SUELOS

Palacios Carolina, Sánchez Jhony Wolfart, Camargo Jaime** y Rodríguez Nelson**.

Palabras claves, capacidad de acumulación, fitorremediación, textura, concentración, biomasa, fitoextracción.

Descripción

La *Tithonia diversifolia* constituye una de las opciones tecnológicas más atractivas para el sector agrícola dada su gran capacidad para tolerar altas concentraciones de cobre comparada con otras especies, excelente producción de biomasa, rápido crecimiento y baja demanda de insumos para su cultivo. El Departamento de Santander tiene el potencial suficiente para explotar esta técnica de fitorremediación ya que cuenta con grandes extensiones de tierra cultivadas con esta planta.

En este proyecto se realizó un estudio de la capacidad de acumulación de cobre por la planta en suelos de diferente textura (franco-arcillo-arenoso y franco-arenoso) inoculándolos con soluciones de cobre a tres diferentes concentraciones previamente establecidas (2.3 ppm, 4.5 ppm y 6.0 ppm) realizando dos muestreos a los 45 y 90 días de sembradas las plantas, esto se llevó a cabo en un ensayo tipo invernadero, donde se establecieron los parámetros que influyen en dichos procesos. Inicialmente se determinaron las características fisicoquímicas de los suelos.

Se logró determinar que la mayor acumulación de cobre por la planta se efectuó en el suelo franco-arcillo-arenoso de pH 4.9, debido a que a pH se presenta la mayor movilidad del catión Cu^{+2} y por lo tanto está más disponible para la planta. En el proceso de acumulación de cobre existe una correlación entre la concentración de cobre inoculado en el suelo, la cantidad de cobre acumulado por la planta y el tiempo de muestreo, es decir a mayor concentración mayor acumulación y a su vez esta acumulación aumenta con el tiempo, el coeficiente de correlación para la biomasa es significativo sólo para los datos de las raíces en el suelo franco-arenoso indicando que las plantas en este suelo acumulan más biomasa con respecto al tiempo. Se demostró que la acumulación de cobre en la *Tithonia diversifolia* se llevó a través de la técnica de fitoextracción que consiste en la absorción del cobre mediante las raíces de la planta y su posterior acumulación en hojas, por esta razón, la *Tithonia diversifolia* puede considerarse como especie potencial para fitorremediación ya que puede absorber cinco veces más cobre que cual otra planta.

*Proyecto de grado**

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Director: Jaime Camargo, Químico

**Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Codirector: Nelson Rodríguez, Biólogo

SUMMARY

TITLE *:

ACCUMULATION OF COPPER HIGH CONCENTRATIONS IN *Tithonia diversifolia* PLANTS AN DIFFERENT KINDS OF SOILS

Palacios Carolina, Sánchez Jhony Wolfart, Camargo Hernández Jaime** y Rodríguez Nelson **.

Key words, capacity of accumulation, phytoremediation, texture, concentration, biomass, phytoextraction

Description

The *Tithonia diversifolia* is one of the more attractives technological options for the agricultural sector due to its large capacity to tolerate highs concentrations of copper compared with other species, excellent production of biomass, fast growing and few demand of necessary products for its cultivation. Santander state has an enough potential to exploit this phytoremediation technique, because there are big areas cultivated with this plant.

In this proyect we made an study about capacity of this plant to accumulate copper in soils with different texture (franco-arcillo-arenoso and franco-arenoso). These soils are inoculated with three different concentrations of copper solutions previously established (2.3 ppm, 4.5 ppm y 6.0 ppm). We made two samples: 45 and 90 days after to sow the plants, it was make in an experiment kind greenhouse, and we established parameters that influencing in those process. Initially were determined the characteristics of the soils.

It was determined that the high accumulation of copper for the plant was made in the franco-arcillo-arenoso soil of pH 4.9, because this kind of pH has the best mobility of cation Cu^{+2} , and it is more available for the plant. In this process of accumulation of copper exists one correlation between the concentration of the copper inoculated in the soil, the amount of copper accumulated for the plant and the time the sample, more concentration more accumulation and this accumulation has been increased with time, the biomass correlation coefficient is significant only for the dates of the roots in the soil franco-arenoso and this one indicates that the plants in this soil accumulate more biomass in relation with the time. It was demonstrated that the accumulation of copper in the *Tithonia diversifolia* was made through phytoextraction technique that consists in the absorption of copper through for the roots of the plant and later the accumulation in leafs, for this reason the *Tithonia diversifolia* can be considered as a potential species for phytoremediation it can absorb five times more copper that any other plant.

*Project of degree

** Science Faculty, School of Chemistry, Director: Jaime Camargo, Chemical

** Science Faculty, School of Bilogy, Codirector: Nelson Rodríguez, Biologist

INTRODUCCIÓN

Probablemente, la función más importante del cobre (Cu) en la planta es su presencia como parte integrante de varias enzimas. Es conocido también que este nutrimento es necesario para el desarrollo normal del proceso de la fotosíntesis. Por ello, el cobre permite que la materia orgánica se combine fácilmente con este nutrimento eliminándolo de la solución del suelo y evitando los problemas de toxicidad.

Esta incidencia del Cobre, ha propiciado que se profundice en los efectos que el acelerado desarrollo industrial y el aumento demográfico, inciden en el desequilibrio ambiental, ya que cada año se añaden al suelo millones de toneladas de sustancias químicas provenientes de la atmósfera, a la cual llegan como emisiones gaseosas y posteriormente caen en forma de polvo y también de lluvia ácida.

Los metales pesados, tales como el cobre son un componente natural de la corteza terrestre; este elemento es un micronutriente necesario para los seres vivos y debe ser absorbido por las raíces de las plantas, por ende forma parte de la dieta de los animales, sin embargo, se genera una alta descompensación cuando por la naturaleza misma, o por la acción del hombre se acumula en los suelos, el agua o en los seres vivos en concentraciones altas, convirtiéndose en tóxico peligroso.

Los métodos tradicionalmente utilizados para la descontaminación del suelo, son el empleo de técnicas de tratamiento químico, electroquímico, térmico y microbiológico, las cuales, resultan costosas, agresivas y además alteran las propiedades fisicoquímicas del suelo, destruyendo los microorganismos que allí habitan e imposibilitando el desarrollo de cualquier forma de vida.

Para ello, se ha desarrollado y estudiado la absorción de acumulación de Cobre a través de la utilización de explantes de la *Tithonia diversifolia* en crecimiento.

Técnica que ha demostrado una absorción de altas cantidades de Cobre, pues se trata de una planta tolerante a este metal. (32)

Por lo anterior, se planteo la viabilidad del proyecto, partiendo de los bajos costos generados por la investigación, puesto que la planta *Tithonia diversifolia* al ser de origen silvestre, facilitó su contacto, permitiendo explorar un directo mejoramiento del suelo, desde la concepción primaria del proyecto.

Día a día se hacen más evidentes los problemas de contaminación en el medio ambiente como resultado de la actividad industrial. Uno de los medios de mayor riesgo, es sin duda el suelo, que a causa del uso excesivo de agroquímicos y la liberación descontrolada de metales pesados, ha sufrido una alteración negativa a su principio natural, considerándose para un futuro no muy lejano un recurso natural no renovable.

El suelo es un medio receptivo por excelencia, existiendo en él, interacción química con la litosfera, hidrosfera, atmósfera y sobre todo, recibiendo el impacto de los seres vivos que directa o indirectamente pueden romper el equilibrio químico establecido en su seno, produciendo efectos altamente dañinos para el planeta.

El problema de la contaminación ambiental es una de las principales preocupaciones del hombre contemporáneo, en particular, los metales pesados que constituyen una fuente progresiva a este mal, ya que la mayor parte de sus compuestos son bioacumulables.

En la actualidad se han implementado tecnologías de saneamiento que incluyen tratamientos fisicoquímicos, sin embargo, estas técnicas solo se dan para soluciones puntuales o para trasladar el problema, sin beneficiar al ecosistema.

Por todo esto, y debido a la inquietud que como futuros químicos se tiene frente a estos temas, es necesario explorar y explotar todo un saber que a lo largo de la carrera permite manifestar una profunda preocupación con lo que atañe al medio ambiente, no obstante desde una propuesta clara y demostrable como lo es el objetivo de este proyecto, que busca evaluar el comportamiento de la planta en la absorción y acumulación de cobre en dos suelos de diferente textura.

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1 ANTECEDENTES

Recientemente, se ha dirigido la investigación a la implementación de técnicas fisiológicas y moleculares en fitorremediación junto con nuevos hallazgos biológicos y de ingeniería con miras a optimizar y mejorar las técnicas en descontaminación de suelos. Varias pruebas de campo confirmaron la viabilidad de usar plantas para limpiar el ambiente. (35)

1.2 SUELO

El suelo es un agregado de minerales no consolidados y de partículas orgánicas producidas por la acción combinada del viento, el agua y los procesos de desintegración orgánica. Los suelos cambian constantemente de un lugar a otro, su composición química y estructura física, están determinadas por el tipo de material geológico del que se origina, por su cubierta vegetal, la cantidad de tiempo que ha actuado la meteorización, su topografía y por los cambios artificiales resultantes de las actividades humanas. (34)

1.2.1 Naturaleza del suelo: Los compuestos primarios del suelo son:

- Compuestos inorgánicos, no disueltos, producidos por la meteorización y la descomposición de las rocas superficiales.
- Los nutrientes solubles utilizados por las plantas.
- Distintos tipos de materia orgánica, viva o muerta ,
- Gases y agua requeridos por las plantas y organismos subterráneos.(34)

La naturaleza física del suelo está determinada por la proporción de partículas de varios tamaños. Las partículas inorgánicas tienen tamaños que varían entre el de los trozos distinguibles de piedras y grava hasta los de menos de 1/40.000 cm. Las grandes partículas del suelo como la arena y la grava, son en su mayor parte químicamente inactivas; pero las pequeñas partículas inorgánicas componentes principales de las arcillas finas, sirven de depósitos encontrando las raíces de las plantas sus nutrientes. El tamaño y la naturaleza de estas partículas inorgánicas diminutas determinan en gran medida la capacidad de un suelo para almacenar agua, vital para todos los procesos de

crecimiento de las plantas.(34)

La parte orgánica del suelo está formada por restos de vegetales y animales, junto a cantidades variables de materia orgánica amorfa llamada humus. La fracción orgánica representa entre el 2 y el 5% del suelo superficial en las regiones húmedas, pero puede ser menos del 0.5% en suelos ácidos o más del 95% en suelos turba. (34)

El componente líquido de los suelos, denominado por los científicos solución del suelo, es en su gran mayoría agua con varias sustancias minerales en disolución, cantidades grandes de oxígeno y dióxido de carbono disueltos. La solución del suelo es muy compleja y tiene importancia primordial al ser el medio por el que los nutrientes son absorbidos por las raíces de las plantas. Cuando la solución del suelo carece de los elementos requeridos para el crecimiento de las plantas, el suelo es estéril. (34)

Los principales gases contenidos en el suelo son el Oxígeno, Nitrógeno y Dióxido de Carbono. El primero de estos gases es importante para el metabolismo de las plantas porque su presencia es necesaria para el crecimiento de varias bacterias y de otros organismos responsables de la descomposición de la materia orgánica. La presencia de oxígeno también es vital para el crecimiento de las plantas ya que su absorción por las raíces es necesaria para sus procesos metabólicos.(31)

La textura de un suelo afecta en gran medida a su productividad, los suelos con un porcentaje elevado de arena suelen ser incapaces de almacenar agua suficiente como para permitir el buen crecimiento de las plantas y pierden gran cantidad de minerales nutrientes hacia el subsuelo. Los suelos que contienen una proporción mayor de partículas pequeñas, por ejemplo las arcillas y los limos, son depósitos excelentes de agua y encierran minerales que pueden ser utilizados con facilidad. Sin embargo, los suelos muy arcillosos tienden a contener un exceso de agua y tienen una textura viscosa que los hace resistentes al cultivo y que impide con frecuencia una aireación suficiente para el crecimiento normal de las plantas.(31)

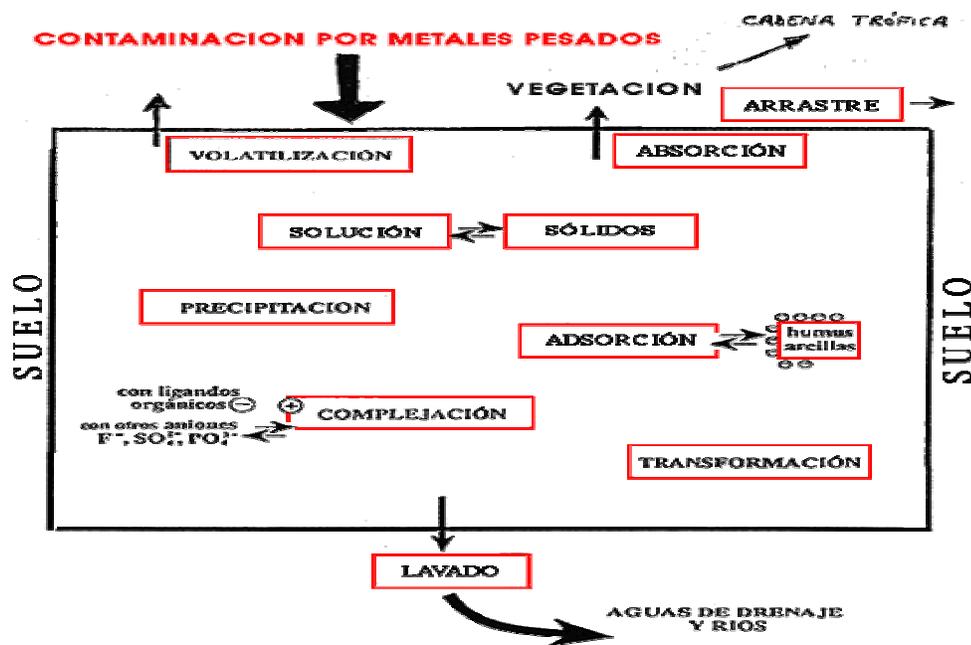
1.2.2 Dinámica de los metales pesados en el suelo. En un balance realizado a finales de la década de los años 80, se estimó que la cantidad anual de vertidos de metales en suelos ascendía a unos 5 mil billones de Kg. El 74% de esta cantidad corresponde a las cenizas procedentes de la combustión de carburantes, principalmente carbón. Una vez

vertidos en el suelo, la concentración de los cationes metálicos en la disolución del suelo disminuye con el tiempo, puesto que pasan a ser absorbidos en las posiciones de absorción. (28)

Los metales pesados incorporados al suelo pueden seguir cuatro diferentes vías:

- Pueden quedar retenidos en el suelo, sea disueltos en la solución del suelo o bien fijados por procesos de absorción, complejación y precipitación.
- Pueden ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas.
- Pueden pasar a la atmósfera por volatilización.
- Pueden movilizarse a las aguas superficiales o subterráneas, como se esquematiza en el siguiente cuadro. (28)

Figura 1. Contaminación por metales pesados (28)



Fuente: KELLER, Catherine, COSIO Claudia. Hyperaccumulation of Cadmium and Zinc in *Thalapsi Caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the Leaf Cellular Level 1

1.2.3 Efectos de los contaminantes sobre el suelo. Los efectos desfavorables de los

contaminantes del suelo son:

- Destrucción del poder de autodegradación por procesos de regeneración biológica normales. Los ciclos biogeoquímicos y la función de biofiltro se ven afectados al superarse la capacidad de aceptación del suelo.
- Disminución tanto cualitativa como cuantitativa del crecimiento normal de los microorganismos del suelo, o bien alteración de su diversidad, lo cual aumenta la fragilidad del sistema.
- Disminución del rendimiento de los cultivos con posibles cambios en la composición de los productos, con riesgos en la salud de los consumidores al entrar determinados elementos en la cadena trófica.
- Contaminación de las aguas superficiales y freáticas por procesos de transferencia.
- Disminución de las funciones de soporte de actividades de ocio. Los espacios contaminados presentan problemas de salubridad para los usuarios. (12)

1.2.4 El cobre en el suelo. Los minerales primarios, principal fuente de suministro de Cu a los suelos, son los sulfuros. Dentro de éstos los más comunes son el sulfuro cuproso (SCu_2), el sulfuro férrico-cuproso (S_2FeCu) y el sulfuro cúprico SCu . En la fase sólida del suelo se halla en forma cúprica Cu(II) , formando parte de las estructuras cristalinas de minerales primarios y secundarios, en menor proporción también se encuentra en la materia orgánica, fijado como catión intercambiable al complejo coloidal arcilloso. En la disolución del suelo se encuentra fundamentalmente como Cu^{+2} y formando complejos estables con las sustancias húmicas del suelo. El 99% del Cu en disolución puede estar en forma orgánica, en suelos poco aireados el Cu^+ es la especie dominante en la disolución del suelo. (27)

1.3 METODOS DE DESCONTAMINACION DE SUELOS

Básicamente se utilizan cinco métodos para la recuperación de los suelos contaminados:

- Extracción
- Tratamiento químico
- Tratamiento electroquímico
- Tratamiento Térmico
- Tratamiento microbiológico

1.3.1 Extracción. Se usa para suelos contaminados por aceites, cianuro, metales pesados, solventes clorados y fenoles. Se usan solventes orgánicos y/o soluciones ácidas o básicas para extraer los contaminantes. Se forma una mezcla del solvente con el suelo para extraer los contaminantes, se lava el suelo y se separan los contaminantes. (29)

1.3.2 Tratamiento químico. Se trata de depurar el suelo mediante la degradación de los contaminantes por reacciones químicas. Frecuentemente se trata de reacciones de oxidación de los compuestos orgánicos. Como agente oxidante se emplea el oxígeno y el agua oxigenada. Es un método útil para: aldehídos, ácidos orgánicos, fenoles, cianuros y plaguicidas organoclorados. Este tratamiento se utiliza preferentemente in situ, inyectando el agente depurador en zonas profundas mediante barreras huecas, o a veces, simplemente mediante un laboreo apropiado del terreno.(29)

1.3.3 Tratamiento electroquímico. El desplazamiento de los contaminantes se logra mediante la creación de campos eléctricos. Es un procedimiento a realizar in situ. Consiste en introducir, a suficiente profundidad, unos electrodos en el suelo. Los contaminantes fluyen desde un electrodo a otro siguiendo las líneas del campo eléctrico. Para favorecer el movimiento se puede añadir una fase acuosa.(46)

1.3.4 Tratamiento térmico. La desorción térmica es una técnica innovadora para tratar la tierra contaminada con desechos peligrosos calentándola a una temperatura de 90 °C a 540 °C a fin de que los contaminantes con un punto de ebullición bajo se vaporicen y, por consiguiente se separen de la tierra. Los contaminantes vaporizados se recogen y se

tratan, generalmente con un sistema de tratamiento de emisiones. (46)

1.3.5 Tratamiento microbiológico. Se usa para suelos contaminados con aceites pesados, querosene y tricloroetanos. Se requiere de sitios especiales para controlar las condiciones de aireación, temperatura, humedad, pH y nutrientes para favorecer los procesos de los microorganismos que eliminan los contaminantes. Bacterias como la *Pseudomona oeruginosa* se usan para retirar los metales contaminantes como el cobre, el plomo y el mercurio. La bacteria *Thyobacillus ferro-oxidans* transforma al sulfuro de hierro en ácido sulfúrico y en sulfato de hierro, que luego pueden ser eliminados por lixiviación. (46)

1.4 TIPOS DE BIORREMEDIACIÓN

Dentro de las nuevas tecnologías biológicas, se destacan técnicas de recuperación "in situ" o biorremediación que consiste en el uso de microorganismos y/o plantas para descontaminar un ambiente degradado o contaminado. Las diferentes estrategias tratan de estimular la actividad de los microorganismos del suelo, inocular el suelo con microorganismos específicos, aplicar enzimas, y utilizar plantas para extraer, retener o transformar los contaminantes. Existen tres tipos de biorremediación. (48) (34)

1.4.1 Biorremediación microbiana. Existe la posibilidad del uso de bacterias con la propiedad de acumular o metabolizar metales pesados, aunque las bacterias son las más empleadas en este proceso, también se han empleado otros microorganismos como hongos, algas, cianobacterias los cuales degradan los compuestos tóxicos en el suelo. (48)

1.4.2 Biorremediación animal. Hay animales que actúan como agentes descontaminantes, debido a que pueden desarrollarse en medios con fuerte toxicidad y poseen en su interior microorganismos capaces de retener los metales pesados. (48)

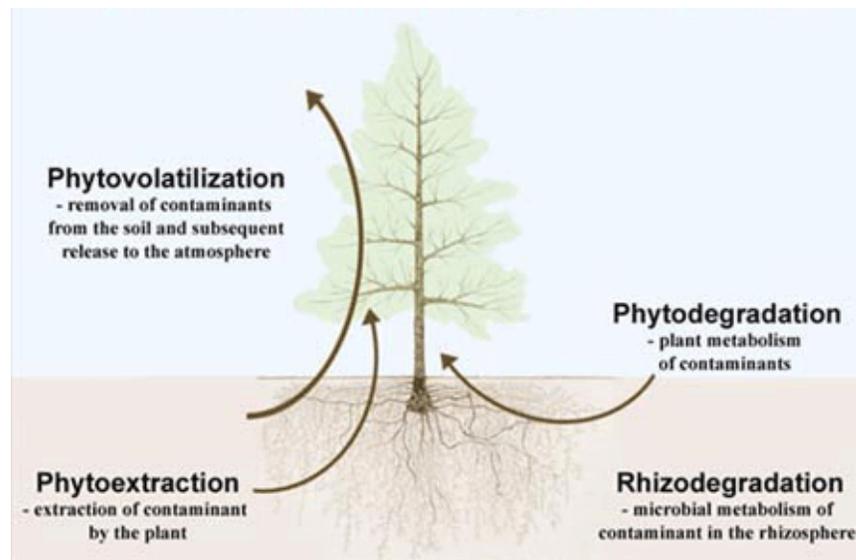
1.4.3 Fitorremediación. Se define fitorremediación, al uso de plantas verdes dirigidas a remover los agentes contaminantes del ambiente o los hacen inofensivos (Salta, 1998).

La fitorremediación se puede aplicar a los agentes contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en los sustratos sólidos (suelo), sustratos líquidos (agua) y el aire. (37)

La fitorremediación se puede resumir con una definición clara: El uso de plantas para el retiro in situ de agentes contaminantes del ambiente. (42)

Esta técnica comprueba ser un método exitoso para controlar o reducir los niveles de contaminantes en el ambiente (Cunningham, 1995). Actualmente se está probando diferentes especies vegetales para remover metales pesados de suelos contaminados. Estos experimentos se llevan a cabo a nivel de invernadero, lo que permite obtener datos para su extrapolación a campo, para ello, se analizan en los suelos los metales pesados en su forma total o disponible, así, como su especiación. Por otro lado se estudian los mismos metales en cada uno de los tejidos de las especies vegetales en observancia (Zurres, 2004).(37)

Figura 2. La fitorremediación se lleva a cabo a través de cuatro técnicas: (50)



Fuente: KOVALICK, W. Workshop in phytoremediation of organic contaminants December 1996. <http://www.rtdf.org/public/phytol>

- **Fitoextracción:** Consiste en la absorción de metales contaminantes mediante las raíces de las plantas y su acumulación en tallos y hojas. Existen variedades de

plantas muy adecuadas para este uso que absorben gran cantidad de metales, en comparación con otras especies. El éxito de la fitoextracción como tecnología ambiental de la limpieza, depende de varios factores incluyendo el grado de la contaminación del suelo, la disponibilidad del metal para las raíces (biodisponibilidad), y la capacidad de la planta de interceptar, de absorber, y de acumular los metales en sus tejidos (Ernst, 1996). En última instancia, el potencial para la fitoextracción depende de la interacción entre el suelo, el metal, y la planta. (20)(44)

- **Rizofiltración:** Es similar a la fitoextracción, pero en lugar de cultivar las plantas en el suelo, se cultivan en invernaderos por procesos hidropónicos. Las plantas se cultivan en tanques con agua contaminada y los tóxicos quedan fijados en sus raíces. A medida que las raíces se saturan del tóxico se van cortando y eliminando. Este método se probó satisfactoriamente para eliminar iones radioactivos en las lagunas contaminadas en el accidente de la planta nuclear de Chernobyl. En esta situación utilizaron plantas de girasol. (45)
- **Fitovolatilización:** Consiste en el empleo de plantas con capacidad para detoxificar un suelo por volatilización de sus contaminantes. Las plantas captan y modifican metales pesados o compuestos orgánicos y los liberan a la atmósfera con la transpiración. (47)
- **Fitodegradación:** utiliza plantas y microorganismos asociados para degradar los contaminantes orgánicos. Las plantas acuáticas y terrestres captan, almacenan y degradan compuestos orgánicos para dar subproductos menos tóxicos o no tóxicos. (46)

El desarrollo de alguna técnica requiere de las siguientes etapas: (2) (52)

1. Evaluar el grado de contaminación del suelo e identificar los metales responsables de la misma y su forma química en el suelo.
2. Determinar la necesidad de aplicar correctores de pH, materia orgánica, óxidos de hierro, etc.

3. Elegir las especies vegetales tolerantes a metales, en función de la estrategia a plantear.
4. Realizar un seguimiento de la eficacia de los tratamientos empleados y de la fitotoxicidad del suelo.
5. Determinar el comportamiento de la vegetación.
6. Estimar la duración del plan de recuperación en función de los apartados anteriores.

1.4.4 Ventajas de la fitorremediación (52)

Las más sobresalientes son:

- La efectividad del costo es uno de las más grandes y claras ventajas de la fitorremediación. Las técnicas agronómicas son considerablemente más económicas. Los costos de cultivo son a menudo menores de 1 a 2 órdenes de magnitud que el tratamiento in situ.
- Es una tecnología "in situ" que incluye menor perturbación del lugar, emisiones aéreas mínimas.
- Emplea la energía solar disponible y los procesos biológicos, químicos y físicos emanados de las plantas para lograr la remediación, entre ellos, la absorción, la transformación, la acumulación, la extracción, la reserva y la degradación rizoférica microbiana.
- Su capacidad extractiva se mantiene debido al crecimiento vegetal, además es capaz de ser modificaba para aumentar su capacidad y selectividad extractivas.
- Las plantas tienen la habilidad de resistir más concentraciones de contaminantes orgánicos que la mayoría de los microorganismos.

1.4.4.1 Requisitos para iniciar el proceso de fitorremediación (52)

- Las variedades deben adaptarse al clima de la región. Sin embargo, la selección final de especies y variedades está basada en la absorción y degradación de los contaminantes orgánicos.
- Para la fitorremediación, el espaciamiento de la planta (proporción del sembrado) será ajustado a la máxima densidad de la raíz, de lo contrario no se logrará alcanzar el más alto rendimiento.
- Como resultado de la contaminación el suelo puede poseer elementos, sustancias químicas y propiedades físicas desfavorables, las cuales necesitan ser superadas antes de plantar.
- Deben supervisarse los nutrientes y aplicarse tanto como se necesiten, generalmente, se requerirá agregar a las plantas mucho más nitrógeno y fósforo de los necesarios.
- Las plantas seleccionadas necesitan ser manipuladas para asegurar su máximo crecimiento. Los niveles de humedad deben ser óptimos y se pueden establecer a la necesidad de ciertas rutinas de corte.
- Se deben determinar las ventajas de las monocotiledóneas y dicotiledóneas antes de iniciar el proceso fitocorrectivo. (25)

1.5 FUNCIONES DEL COBRE EN LAS PLANTAS

El cobre se absorbe por las plantas principalmente de forma activa como Cu^{2+} y en algún caso como complejo. Presenta antagonismo con el Zn^{2+} a nivel de absorción, se asocia con varias enzimas, ya sea como activador o formando parte de las mismas, interviene en multitud de procesos de oxidación/reducción. Por ejemplo actúa en el sistema enzimático

ascórbico oxidasa, responsable de la oxidación del ácido ascórbico (Vitamina C) a dehidroascórbico. Es así como esta vitamina ejerce su efecto protector sobre la oxidación, en el metabolismo nitrogenado y glucídico e Influye favorablemente en la fijación del nitrógeno atmosférico de las leguminosas.

Es un micronutriente esencial en el balance de bioelementos que en la planta regulan la transpiración. (27)

1.5.1 Síntomas de deficiencia de cobre en las plantas. Las deficiencias de cobre se manifiestan en el marchitamiento de las hojas jóvenes, enrollamientos de las mismas y una inclinación de peciolo y tallos. Las hojas se tuercen, se hacen quebradizas y caen, clorosis y otros síntomas secundarios (la clorosis no siempre aparece), disminución de la lignificación, vasos no lignificados del xilema son comprimidos por tejidos vecinos, por lo que no se pueden utilizar en el transporte de agua y solutos. (27)

Figura 3. Carencia de cobre en hojas de melocotonero (27)



Fuente: LONERAGAN, J.F. Copper in soils and plants. Toronto. Abril, 1985.

1.5.2 Toxicidad del cobre. La mayor parte del cobre vertido por el hombre va a parar al suelo. Al igual que en el agua, la vía principal de deposición en la atmosférica (23% del total), seguido de vertidos urbanos, uso de barros industriales como fertilizantes para

mejorar las características minerales de los suelos, o uso de fertilizantes, como derivados de fosfato impuros. (27)

Una característica del cobre es su fácil transferencia del suelo a los vegetales, siendo uno de los metales que mejor absorben las plantas, sobre todo cereales como el arroz, el trigo y, en menor cantidad el maíz. Se ha relacionado la concentración de Cobre en los vegetales con la concentración del metal en el suelo, además se ha constatado que estos niveles han ido aumentando a lo largo de los últimos años, incluso en zonas naturales no industrializadas ni urbanizadas. La acumulación se produce de forma continua, no existiendo ningún tipo de umbral, como ocurre con otros metales, por ejemplo, el plomo, y esto ocurre a concentraciones tan bajas de sólo 0.3 ppm en el suelo. (27)

Una disminución del pH del suelo facilita la transferencia del cobre al vegetal, por ello es importante, en zonas industrializadas, el fenómeno de la lluvia ácida, ya que ésta hace disminuir el pH del suelo, aumentando la absorción por parte de las plantas y, por tanto, la acumulación. Se ha visto que el aumento puede llegar a ser de 2 a 20 veces superior que en zonas con suelos no contaminados o pH más elevados. (27)

1.5.2.1 Efectos característicos.

- **Seres Humanos / Mamíferos:** Además del tracto gastrointestinal y el pulmón, el riñón es el órgano más afectado por exposición crónica al cobre, su rápida solvólisis en ácidos débiles constituye un prerequisite fundamental para su fácil asimilación en el organismo: en el tracto gastrointestinal se reabsorbe un 5% del cobre, que se deposita en el hígado y en los riñones. Las altas concentraciones de cobre en el arroz, son las responsables de la enfermedad "Itaitai" que destruye los eritrocitos y produce proteinuria, rinitis, enfisema y bronquitis crónica. El cobre y sus compuestos son carcinógenos. Un sistema típico de intoxicación crónica es la excreción de β -microglobulina en la orina debido a la disfunción renal. También puede producir deformaciones óseas. (9)
- **Plantas:** El cobre disminuye la tasa de fotosíntesis y transpiración y aumenta la frecuencia respiratoria. Aún pequeñas concentraciones de cobre en el suelo conducen a cuadros de lesiones muy extendidas, como por ejemplo al acortamiento del eje

caulinar y un rayado de color amarillo intenso en las hojas más viejas. La absorción se produce no sólo por raíz sino también por los brotes y las hojas. Además de disminuir el rendimiento, la mayor amenaza reside en la contaminación de (acumulación) las plantas de cultivo, dado que es así como el cobre ingresa a la cadena alimentaria como toxina de acumulación. (9)

- **Suelo:** La capacidad de retención del cobre depende del contenido de bases intercambiables. Debido a que se adsorbe a partículas orgánicas del suelo, casi no se produce lixiviación. El horizonte de acumulación para el cobre es la rizosfera (raíces). Con un pH de 6.51 la disponibilidad es mínima; al disminuir el pH del suelo, aumenta la asimilación de cobre por parte de las plantas.(9)
- **Cadena alimentaría:** El ser humano incorpora a su organismo aproximadamente un tercio del cobre al que está expuesto con los alimentos de origen animal que consume y dos tercios con los de origen vegetal. Fumar aumenta considerablemente esta contaminación. (9)

1.6 LAS PLANTAS COMO ESTRUCTURAS DE REMEDIACION DE SUELOS CONTAMINADOS (37)

Las raíces de las plantas captan rápidamente contaminantes de cada fase del suelo:

- Fase gaseosa. La captación de los contaminantes volátiles encontrados en la fase gaseosa del suelo, por medio de las raíces de las plantas, es un mecanismo importante para algunos compuestos, incluso para aquellos con presión de vapor relativamente baja.
- Fase líquida. Los contaminantes encontrados en la fase líquida del suelo, son captados por las raíces de las plantas por difusión y flujo de masa. Sin embargo, los compuestos muy solubles con afinidad pequeña para los sólidos del suelo también están sujetos a lixiviar fuera de la raíz y pueden ponerse físicamente indisponibles para la captación de la raíz.
- Fase sólida. Las raíces y raicillas están, en muchos casos, en íntimo contacto con las superficies coloidales del suelo. En efecto, esa relación es tan estrecha que se cree que los contaminantes absorbidos pasan de los sólidos del suelo a la planta sin la

influencia coloidal Sin embargo, comparando el área de un suelo con el área de una raíz, es difícil imaginar esto como una estrategia de remediación viable.

1.6.1 Transporte de los contaminantes dentro de la planta. La solución contaminante disuelta en la fase líquida del suelo con valores muy bajos es transportada a células porosas del espacio libre de la raíz por medio del flujo de masa. Este movimiento de la solución contaminante en el suelo es resultado del déficit de agua en la raíz inducido por la transpiración. Si la planta realiza una absorción de la solución del suelo mayor que el flujo de ésta hacia la raíz, se desarrolla un gradiente de concentración, obteniéndose un movimiento por difusión.

La solución contaminante disuelta que entra a la raíz debe atravesar primero la epidermis y una capa cortical parenquimatosa que presenta numerosos espacios intercelulares. Seguidamente pasa a la endodermis, donde se limita la velocidad para el movimiento de la solución por la presencia de una barrera xerosa llamada banda de Caspary. Una vez se dividen los compuestos dentro de las membranas lipofílicas de la banda de Caspary estos necesitan ser desorbidos en una solución acuosa para poder entrar en los vasos de xilema. Se estima una cantidad insignificante de flujo total disponible solo cerca de la punta de la raíz donde la banda de Caspary aún no se ha desarrollada bien, a menos que la raíz sufra variaciones o perturbaciones.

Conceptualmente, el camino entero de la raíz puede simplificarse como: a. prebenda de Caspary, b. la deserción fuera de esta membrana. El primer paso favorece más a los compuestos lipofílicos, el segundo paso para la deserción favorece más a los compuestos hidrófilos.

Una vez la sustancia entra en el tejido vascular, puede ser transportada con rapidez desde las raíces hasta las hojas a través de la corriente de transpiración por el xilema o más lentamente desde las hojas hacia abajo por el floema. El transporte a través del floema es complejo y no se comprende por completo, pero parecen existir pocas dudas de que las sustancias tóxicas que entran en el floema pueden ejercer un efecto adverso severo en la planta. La absorción de sustancias a partir del sistema vascular varía a lo

largo de la planta, y depende de la naturaleza de los tejidos, de su estado hormonal y de las condiciones ambientales.

En el campo de la fitorremediación, no se ha prestado aún mucha atención a los aspectos mecanistas de la captación de la raíz y de la traslocación del xilema; la mayoría de los estudios usan el análisis compuesto radioetiquetados. Tales estudios siempre son complicados debido al metabolismo de las plantas y a la limitación de dichos compuestos.

Aún se desconocen receptores específicos en las raíces para la toma de estos contaminantes, el tipo de transformaciones y el lugar de la planta donde se realiza, sin embargo se sabe que los sistemas fotosintéticos, especialmente el Fotosistema II, no se alteran y las modificaciones ocurren en las células meristemáticas de las raíces. (37)

1.6.2 Metabolismo dentro de la planta. Las enzimas de las plantas pueden metabolizar una amplia variedad de contaminantes xenobióticos. Estas se encuentran y son activas en el interior de la raíz, tallos, y hojas o también pueden encontrarse en el suelo y en sedimentos.

El metabolismo de los contaminantes en el interior de la planta es similar a los tipos de metabolismo xenobiótico que ocurren en el hígado del mamífero mediante transformaciones mediadas por hidrólisis, conjugación, y oxigenación. Esta comparación se ha denominado "Hígado verde".

Los materiales relativamente lipofílicos sufren un ataque enigmático que produce compuestos más solubles en agua. En los sistemas de mamíferos la disponibilidad final termina a menudo en rutas excretoras con las cuales la planta no cuenta. En principio, tanto en la planta como en los sistemas metabólicos del hígado se pueden dividir en las mismas tres fases. Transformación, unión y disposición final. (37)

1.7 *Tithonia diversifolia*

Tithonia diversifolia es una planta herbácea de la familia Asteracea, originaria de Centro

América (Nash, 1976). Tiene un amplio rango de adaptación, tolera condiciones de acidez y baja fertilidad en el suelo. Es una especie con buena capacidad de producción de biomasa, rápido crecimiento y baja demanda de insumos para su cultivo. Presenta características nutricionales importantes para su consideración como especie con potencial en alimentación animal (Ríos, 1997). (32)

Figura 4. *Tithonia diversifolia* (32)



Fuente: OLIVARE, Elizabeth. Nutrientes y metales en *Tithonia Diversifolia* (Hemsl). Gray (Asteraceae). Centro de Ecología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela

La familia Asteracea posee unas quince mil especies distribuidas por todo el mundo (Gómez y Rivera, 1987). Esta planta tiene un hábito arbustivo que puede alcanzar hasta 4m de altura. Con numerosos tallos saliendo todos de la base, se han contado hasta 18 tallos por planta. Es un especie perenne y sus nombres comunes son botón de oro o botón dorado y están relacionados con el color amarillo de sus flores. (32)

Las Asteraceas toleran niveles altos de algunos metales en comparación con otros grupos taxonómicos, un ejemplo de ello, la *sonchus oleraceus* con alta asimilación de plomo proponiéndose como una especie fitorremediadora de ambientes contaminados con este metal. (Xiong, 1997) (32)

En un estudio realizado en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), se encontró que el contenido de cobre en la *Tithonia diversifolia* fue de $46 \mu\text{g g}^{-1}$, lo normal es de 4 a $20 \mu\text{g g}^{-1}$ (Marschner, 1995). (32)

1.7.1 Descripción botánica y clasificación. *Tithonia diversifolia* es una planta herbácea de 1.5 a 4.0 m de altura, con ramas fuertes, hojas alternas, pecioladas de 7 a 20 cm de largo y 4 a 20 cm de ancho. Presenta 3 a 5 lóbulos profundos cuneados hasta subtruncados en la base, decurrentes en su mayoría en la base del pecíolo, bordes aserrados, pedúnculos de 4 a 20 cm de largo, lígulas amarillas a naranja de 3 a 6 cm de longitud y corolas amarillas de 8 mm de longitud (Nash, 1976). Este arbusto es utilizado en diferentes partes del mundo como forraje, abono, en medicina, como cerca viva y planta ornamental. También es apreciado como planta melífera, para la atracción de insectos en cultivos asociados, control de termitas en mezcla con otras plantas, para la recuperación de áreas invadidas por cierto tipo de pasto y en la elaboración de artesanías. (33)

Figura 5. Arbusto.



Fuente: RIOS, K. Clara Inés. Guía para el cultivo y aprovechamiento del Botón de Oro. (Hems) Gray, 1999

Las hojas son lobuladas, sus bordes aserrados. Se ubican en forma alterna a lo largo del tallo y miden entre 7 y 20 cm. de largo por 4 a 20 cm. de ancho. Las flores se encuentran dispuestas en grupos, es decir en inflorescencias llamadas capítulos o cabezuelas

semejantes a las inflorescencias de las margaritas, de color amarillo. Cada inflorescencia está compuesta en su centro por un conjunto de flores tubulosas muy pequeñas. Tienen un olor característico, parecido al de la miel. Su aparición se da entre los 3 y 4 meses después de plantadas las estacas. Los frutos son de tipo aquenio y se disponen en el centro del capítulo o cabezuelas. Cada flor produce una sola semilla. El botón de oro crece bien en diferentes climas y sobre varias clases de suelo, tolerando condiciones de acidez y baja fertilidad. (33)

1.7.2 Propagación por estacas. Esta es la forma más común de propagar el botón de oro. Se utilizan estacas de aproximadamente 30 centímetros de largo, tomadas de la parte más leñosa y la parte media del tallo. Las estacas se cortan en forma diagonal para facilitar la siembra y evitar la acumulación de agua en la parte superior.

La siembra se puede realizar directamente en el campo, procurando colocar la estaca en el mismo sentido en que se encontraba en la planta; es decir, la parte que estaba hacia arriba debe quedar en la misma posición. Se entierra aproximadamente la tercera parte de la estaca. (33)

2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

En este estudio, 120 plantas de *Tithonia diversifolia* serán propagadas vegetativamente por estacas de aproximadamente 15 cm de longitud, en dos suelos de diferente textura, a estos suelos inicialmente se les realizará un previo análisis para establecer el contenido de micro y macronutrientes presentes. Luego se depositarán en bolsas negras de 4 kg cada una, las estacas se sumergirán en una solución de ácido indulbutílico para acelerar el enraizamiento.

Después del anterior procedimiento, se inocularán los suelos con soluciones de cobre de 2.3 ppm, 4.5 ppm y 6.0 ppm, se agitará y seguidamente se colocarán las estacas. Al cabo de 45 días se realizará el primer muestreo y a los 90 días el segundo para determinar por espectrofotometría de absorción atómica las concentraciones de cobre acumulados por la planta en hojas, raíz y tallo.

2.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS UTILIZADOS

Las muestras antes de ser analizadas deben someterse a un proceso de :

Secado: Se usa una estufa de aire circulante a temperatura de 45 °C donde permanece 24 horas dependiendo de la humedad inicial y de la clase de suelo.

Molida y Tamizado: Los terrones y agregados deben reducirse de tamaño en un mortero de porcelana y se pasa por un tamiz No. 10 (35)

Para la realización del trabajo se utilizaron dos tipos de suelos cuyas características físicas y químicas, se encuentran registradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización de los suelos franco-arenoso y franco-arcillo-arenoso

Suelo franco-arenoso				Meq/100 g suelo									
pH	% C	Cu(ppm)	P(ppm)	Ca	Mg	Na	K	Al	% Arena	% Limo	% Arcilla	Textura	
6.3	1.5	2.3	7	7	2.46	0.05	0.15	0.0	66	20	14	Fco-Arenoso	
Suelo franco-arcillo-arenoso													
pH	% C	Cu(ppm)	P(ppm)	Ca	Mg	Na	K	Al	% Arena	% Limo	% Arcilla	Textura	
4.9	3.34	0.05	2	1.78	0.46	0.36	0.11	2.5	58	20	22	Fco-Arci-Arenoso	

C: Carbono Cu: Cobre P: Fósforo Ca: Calcio Mg: Magnesio Na: Sodio K: Potasio Al : Aluminio

Fuente: Análisis de Laboratorio de Suelos – UIS.

2.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.2.1 Procedimiento para determinar el porcentaje de humedad en el tejido vegetal de la *Tithonia diversifolia*. La humedad se determinó de acuerdo al siguiente método analítico : (35)

Equipo

- Estufa, caja petri, balanza analítica

La determinación de la humedad se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Pesar inicialmente la caja petri (sin tapa) y luego colocar cuidadosamente las hojas, tallos y raíz por separado y volver a pesar

- Llevar al la estufa por un tiempo de 72 h a una temperatura de 105 °C
- Una vez pasado este tiempo se dejan las cajas en un desecador para que se enfríen y así poder pesar. Finalmente se determina el porcentaje de humedad.

Estos datos se muestran en el anexo B y anexo C

2.2.1.1 Procedimiento para determinar el porcentaje de cenizas en tejido vegetal de *Tithonia diversifolia*. Las cenizas se determinaron de acuerdo al siguiente método analítico: (35)

- Pesar la muestra ya preparada y seca, en un crisol de porcelana debidamente tarado
- Se incinera la muestra de hojas, tallos y raíz durante 2h a 500 °C
- Pasado este intervalo de tiempo se deja bajar la temperatura y se colocan los crisoles en un desecador y cuando lleguen a temperatura ambiente se pesan.

Los datos del porcentaje de cenizas se muestran en el anexo D y anexo E

2.2.1.2 Procedimiento para la digestión con ácido de las cenizas. La digestión de las cenizas se realizó de acuerdo al siguiente método analítico: (35)

- Adicionar lentamente 20 ml de ácido clorhídrico 1N a los crisoles que contienen las cenizas
- Colocar los crisoles sobre un plancha de calentamiento hasta llevar casi a sequedad, se debe evitar salpicaduras que puedan deteriorar el análisis.

- Filtrar la muestra en caliente y aforar a 100 ml, agitar para homogenizar la solución y trasvasar a los frascos de muestras debidamente rotulados.
- El cobre se determina directamente por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) en la solución anterior.

2.2.1.3 Regresión Lineal Simple (R.L.S.). Se realizó una curva de calibración para obtener el ajuste por mínimos cuadrados con valores y (absorbancia) Vs valores x (concentración) los datos con los cuales se trabaja (R.L.S) se encuentran registrados en el anexo E.

Con este método se obtienen los valores de pendiente (m), intercepto (b) y el coeficiente de correlación (r), los cuales se pueden observar en la tabla 2.

Tabla 2. Regresión Lineal Simple (R.L.S.) del instrumento de medición.

Curva	Datos R.L.S.		
	r	m	b
Absorbancia Vs Concentración	0.9878	0,008	0,0411

Fuente: Autores del Proyecto.

3. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

3.1 ANALISIS ESTADÍSTICO DE CONCENTRACION DE COBRE Y BIOMASA

Los datos obtenidos fueron analizados mediante pruebas de Normalidad, Análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación de medias (Test de Tuckey al 5% de probabilidad). Estos datos se registran en la tabla 3.

Tabla 3. Acumulación de cobre en hojas y raíz a los 45 y 90 días en los suelos franco-arenoso y franco-arcillo-arenoso.

Tiempo	Suelos											
	Franco-arenoso						Franco-arcillo-arenoso					
	[2.3]		[4.5]		[6.0]		[2.3]		[4.5]		[6.0]	
	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R	H	R
X 45 días	0.30	0.25	0.73	0.40	1.39	0.85	0.85	0.46	2.02	0.69	2.67	1.19
E.S.d. 45 días	0.02	0.02	0.18	0.04	0.29	0.03	0.31	0.07	0.4	0.12	0.84	0.30
X 90 días	0.35	0.81	1.87	0.75	2.11	0.83	0.84	0.57	2.86	1.44	4.28	1.66
E.S.d 90 días	0.19	0.08	0.22	0.09	0.55	0.16	0.20	0.18	0.24	0.23	0.25	0.38

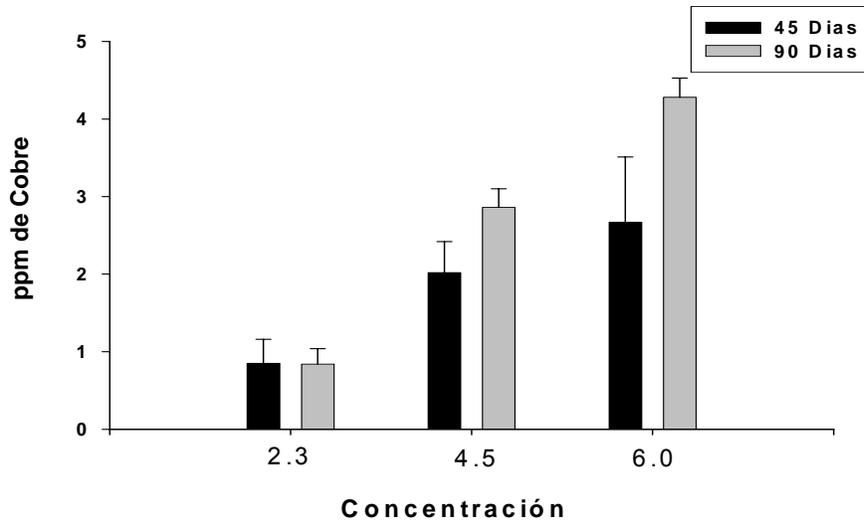
E. Sd. : Error estándar [2.3], [4.5],[6.0] : Concentraciones de cobre en ppm
X: Media
H : Hojas
R: Raíz

Fuente: Autores del Proyecto.

Esta tabla nos permite observar las concentraciones de cobre que acumula la planta en las hojas y la raíz a los 45 y 90 días, en los dos tipos de suelos.

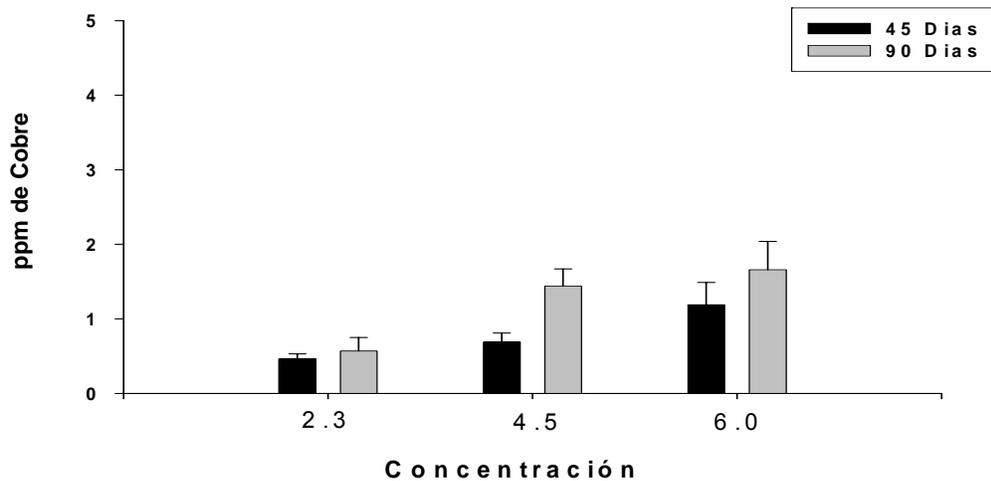
Estos resultados se pueden observar con mayor claridad en las figuras 6-9.

Figura 6. Acumulación de cobre en hojas en el suelo franco-arcillo-arenoso



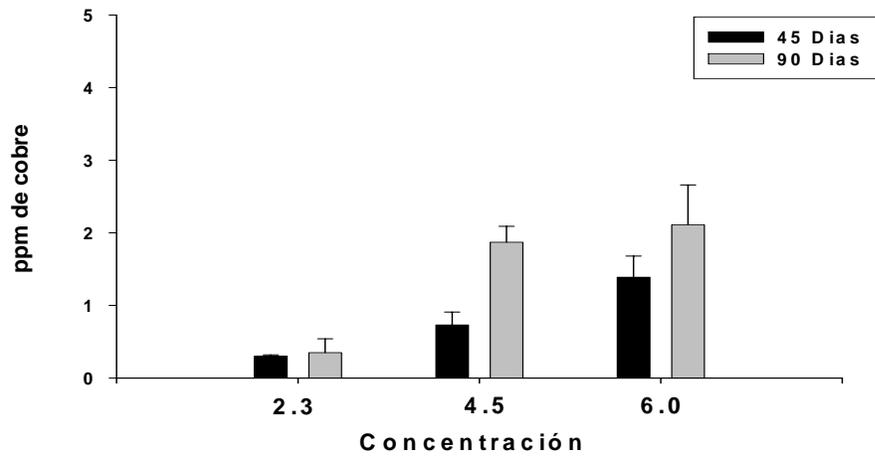
Fuente: Autores del Proyecto.

Figura 7. Acumulación de cobre en la raíz en el suelo Franco-arcillo-arenoso



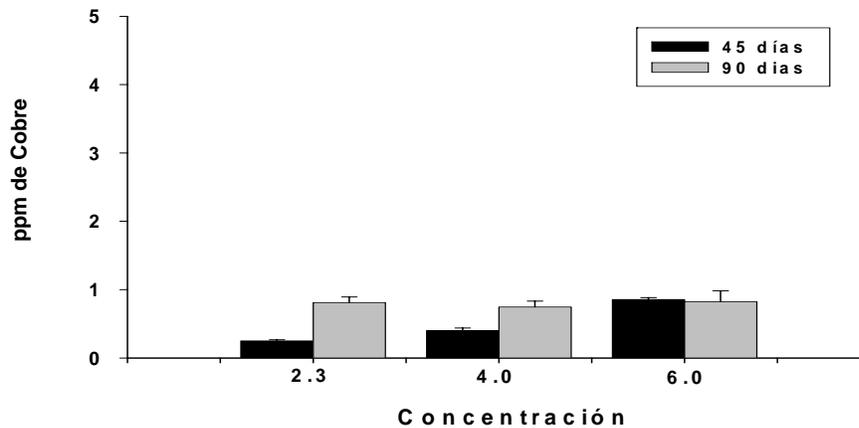
Fuente: Autores del Proyecto.

Figura 8. Acumulación de cobre en hojas en el suelo franco-arenoso



Fuente: Autores del Proyecto.

Figura 9. Acumulación de cobre en raíz en el suelo franco-arenoso



Fuente: Autores del Proyecto.

Para establecer las diferencias de acumulación de cobre dentro de los parámetros y tratamientos utilizados como lo son los tipos de suelos, concentraciones de cobre y el tiempo; se aplicó una análisis factorial de 2x3x2 (2 tiempos, 3 concentraciones y 2 suelos) ANOVA. Estos datos se registran en las tablas 4 y 5.

Para el anterior análisis se revisó distribución normal, homogeneidad de varianzas para las variables biomasa en base seca y concentración de cobre (ppm).

Tabla 4. Análisis de varianza ANOVA de ppm de Cobre en hojas y raíz

Factores	Hojas		Raíz	
	F	P	F	P
Concentración	31.27	0.00*	11.67	0.00*
Suelo	28.35	0.00*	12.73	0.00*
Tiempo	11.64	0.00*	11.69	0.00*
conc. x suelo	2.68	0.08	3.28	0.05
conc.x tiempo	2.81	0.07	0.84	0.44
suelo x tiempo	0.18	0.67	0.54	0.47
conc.x suelo x tiempo	0.72	0.49	2.16	0.13

p<0.05 : probabilidad significativa
P: probabilidad
F: Constante de Fitcher

Fuente: Autores del Proyecto.

Respecto a la acumulación de cobre en los diferentes órganos como son las hojas y las raíces, existen diferencias significativas en la acumulación en las tres concentraciones , para hojas ANOVA ($F_{0.05, (1), 2, 48} = 31.27, p = 0.00^*$) y raíces ANOVA ($F_{0.05, (1), 2, 48} = 11.67, p = 0.00^*$). La variable tiempo afecta de manera significativa la acumulación de cobre tanto en hojas como raíces ANOVA ($F_{0.05 (1), 1, 48} = 11.64, p = 0.0013^*$) y ($F_{0.05 (1), 1, 48} = 11.64, p = 0.000^*$). El tipo de suelo según ANOVA ($F_{0.05, (1), 1, 48} = 28.35, p = 0.00^*$) existen diferencias significativas en la acumulación de cobre en hojas e igualmente para raíces

ANOVA ($F_{0.05, (1), 1, 48} = 12.73, p = 0.00^*$). No existe asociación entre las variables por lo tanto cada una afecta de manera independiente la acumulación de cobre tanto en hojas como raíces.

Tabla 5. Análisis factorial ANOVA 2x3x3 para biomasa en base seca en hojas y raíz

Factores	Hojas		Raíz	
	F	P	F	P
Concentración	0.48	0.62	0.96	0.39
Suelo	33.10	0.00*	44.77	0.00*
Tiempo	16.44	0.00*	75.53	0.00*
conc. x suelo	0.86	0.43	1.11	0.34
conc.x tiempo	1.59	0.22	0.13	0.88
suelo x tiempo	13.21	0.00*	56.14	0.00*
conc.x suelox tiempo	2.55	0.09	0.07	0.93

P<0.05 : probabilidad significativa

F: Constante de Fitcher

Fuente: Autores del Proyecto.

La cantidad de Biomasa es afectada significativamente por el suelo para hojas ANOVA ($F_{0.05, (1), 1, 48} = 33.10, p = 0.00^*$) y raíces ANOVA ($F_{0.05, (1), 1, 48} = 44.77, p = 0.00^*$). La variable tiempo afecta las hojas y raíces significativamente ANOVA ($F_{0.05, (1), 1, 48} = 16.44, p = 0.00^*$) y ($F_{0.05, (1), 1, 48} = 75.53, p = 0.00^*$). Las variables suelo y tiempo afectan significativamente generando una interacción y afectando la acumulación de biomasa.

Se analizó la relación entre la biomasa y el contenido de cobre en los dos tipos suelos, mediante el coeficiente de correlación de Spearman (r_s), valores próximos a 1 indican una correlación fuerte y positiva, valores próximos a -1 indican una correlación fuerte y negativa, y valores próximos a cero indican que no hay correlación lineal.

Estos datos se registran en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Coeficientes de Spearman para ppm de Cobre

	Fco-arenoso		Fco-Arci-Arenoso	
	Conc.	Tiempo	Conc.	Tiempo
ppm				
Hojas	0.71*	0.21	0.72*	0.29
Raíz	0.41*	0.53*	0.59*	0.31

Conc: Concentración

Fuente: Autores del Proyecto.

Los coeficientes de correlación significativos muestran que a medida que se aumenta la concentración aumenta la cantidad de cobre acumulado en hojas, para los dos suelos. Igualmente esta acumulación no está relacionada con el tiempo. En las raíces es igualmente significativa la acumulación del cobre aumentando la concentración para ambos suelos, pero el tiempo también es significativo, lo que indica que las raíces acumulan más cobre a medida que aumenta el tiempo, contrarió al comportamiento en las hojas.

Tabla 7. Coeficiente de Spearman para biomasa en base seca en hojas y raíz

	Fco-arenoso		Fco-Arci-Arenoso	
	Conc.	Tiempo	Conc.	Tiempo
Biomasa				
Hojas	-0.18	0.65	0.05	0.15
Raíz	-0.14	0.86*	0.00	0.15

Conc: Concentración

Fuente: Autores del Proyecto.

El coeficiente de correlación para la biomasa es significativo solo para los datos de la raíz en el suelo franco-arenoso, indicando que las plantas en este suelo acumulan más biomasa con respecto al tiempo. La biomasa no está correlacionada con ninguno de los dos suelos, tanto para hojas como raíz. Indicando que la biomasa es afectada de forma independiente en las hojas y raíz con respecto a la concentración y tiempo, excepto la biomasa en el suelo franco-arenoso en la raíz.

CONCLUSIONES

1. Se analizó como la textura de un suelo influye en la absorción, acumulación de cobre y crecimiento de los explantes de la planta *Tithonia diversifolia*, donde la mayor absorción de cobre se presentó en el suelo franco-arcillo-arenoso.
2. Se determinó que el mayor desarrollo radicular de la planta *Tithonia diversifolia* se presentó en el suelo de textura franco-arenoso, entendiéndose por desarrollo radicular como mayor cantidad de raíces secundarias y mayor cantidad de raicillas.
3. Se observó que la mayor absorción de cobre por la planta se efectuó a un pH de 4.9, debido a que a este pH se presenta mayor movilidad del catión Cu^{+2} en el suelo y por lo tanto está más disponible para la planta.
4. Se demostró que la acumulación de cobre en la planta *Tithonia diversifolia*, se realiza en sus hojas, fenómeno conocido como fitoextracción.
5. Se observó que existe una correlación entre la concentración de cobre inoculado en el suelo (2.3, 4.5 y 6.0 ppm) y la cantidad de cobre acumulado por la planta (hojas y raíz), es decir, a mayor concentración mayor acumulación.

RECOMENDACIONES

- Se sugiere iniciar el procedimiento experimental, con la introducción de las estacas en una solución de ácido indolbutílico (AIB) que es una fitohormona aceleradora del enraizamiento, esto debe realizarse por un tiempo aproximadamente de 15 minutos, y pasado este tiempo se deben sembrar seguidamente las estacas.
- Es recomendable seguir el proceso de recolección de las estacas, con aquellas que no se hayan reproducido totalmente, es decir no posean flor. Lo indicado dentro de la evolución de una investigación, es la utilización de tallos con 30 cm de largo, tomándose la parte más leñosa, junto con la parte media del tallo. Después de cortadas, es necesario colocarla en agua y no tardar mucho con su siembra, ya que son susceptibles a un deterioro significativo.
- Es necesario que el corte de las estacas se haga en forma diagonal, pues facilita la siembra y evita la acumulación de agua en la parte superior. Para ello, se coloca la estaca en el mismo sentido en que se encontraba en la planta; es decir, la parte que estaba hacia arriba debe quedar en la misma posición. Se entierra aproximadamente la tercera parte de la estaca.
- Una vez completado el crecimiento vegetativo de la planta el siguiente paso es cortarlas y proceder a su incineración, trasladando las cenizas a un vertedero de seguridad.

BIBLIOGRAFÍA

1. ANONYMOUS. Requires Right Blend of Plants and Soil Microbes. Agosto 2005. Water Environment & Technology. p6-8.
2. ARROYO, E. y Quesada, J. 2002. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos.
3. BLANCO, R. (2000): Propuesta metodológica para la aplicación del análisis de las propiedades físicas edáficas a la evaluación del suelo para usos ganaderos. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga. Inédito.
4. BOX. GE., HUNTER W.G. AND HUNTER J.S.. Estadística para investigadores. Barcelona: Editorial Reverté S..A. 1989. Cap. 10.
5. COCHRAN W.G., COX G.M. Diseños experimentales. México: Editorial Trillas, 1973. p.177-214.
6. CUTRARO, Jennifer, Goldten. Clearing up contaminats whit plants. Agosto 2005 .BioCicy p 15—23.
7. DOMENECH, X. Químicas del suelo. "El impacto de los contaminantes". Universidad Autónoma de Barcelona. Maraguano. Madrid. 1995.
8. DOMÍNGUEZ, V.A. 1997. Tratado de fertilización. 3a Edición., Mundi -Prensa. Madrid - Barcelona - México.
9. DUFFUS, J .H. 1 983. Toxicología ambiental. Universidad Heriet. Watt. Edimburgo. Omega S.A. Barcelona.

10. DUNHAM, S. J., Lombi E. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: Natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. Noviembre-Diciembre 2001. Journal of Environmental Quality. p 1919-1927.
11. EARL R.S. 1970. Manual de evaluación de suelos. Unión Tipográfica. Editorial Hispano Americana. México.
12. FLOREZ, E.L. Relaciones químicas de suelo- planta y fertilidad Universidad de Caldas, Manizales. Lumina Spargo. Colombia. 1997.
13. FUKAYA M, Nakada and Wada. The Accumulation of heavy Metals in the submerged plant (Elodea Nuttallii). 1979. Journal Biological. P 21-27.
14. GALLI, C. 2002. Degradación por medios bacterianos de compuestos químicos tóxicos. Comisión Técnica Asesora en: Ambiente y desarrollo sostenible, Buenos Aires, Argentina.
15. G.H Tilstone and M.R. Macnair. The consequence of selection for copper tolerance on the uptake an accumulation of copper in Nimulus Guttatos. 1997. Journal Bilogical. p747-751
16. GARCÍA, D.T. & R.A. LIZARAZO. 1995. Diseño de una estación móvil para el tratamiento del fluido proveniente de derrames de petróleo. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander.
17. GARY. Pierzyski, Lucinda Jackson. Plants sistem techologies for environment mangement of metals in soils 2002 Journals of natural resources and life sciences education p 31-38.
18. GEOCISA. División de Protección ambiental de suelos, <http://www.geocisa.com>.

19. GUITIÁN, F. y Carballas, T. (1976): Técnicas de análisis de suelos. Ed. Pico Sacro, Santiago de Compostela.

20. HANS, HH & BOCK, C. 199. Phytoremediation of organic contaminants. Institute of plant Nutrition and soil Science, Federal Agricultural Research Centre (FAL). Braunschweig, Germany. http://www.epfl.ch/COST837/WG1_abstracts.html.

21. JACKSON, M. L.. WHITTIG, L. D. and PENNINGTON, R. P. Segregation procedure for the mineralogical analysis of soils. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 14: 77-81, 1949.

22. JACKSON, M. L.: Análisis químico de suelos. 2a. ed. Barcelona, España, Omega, 1964.

23. JONES K Ryan, TANG Shih Chung. Evaluation of Agriculture-Based Phytoremediation in Pacific Island Ecosystems Using Trisector Planters. 2004. International Journal of Phytoremediation. p 17-26.

24. LAL, S. DE, S. K. and CHANDRA, S. Adsorption of copper by soils in aqueous media at different temperatures. Z., Pfl., Ern. Boden. 128: 54-60, 1971.

25. LASAT, M Mitch. Phytoextracción of toxic metals: A review of biological mechanisms. Enero-Febrero 2002. Journal of Environmental Quality. p 109-112.

26. LAZAR Loan, PETRISOR G Ioana. Artificial Inoculation – Perspectives in Tailings Phytostabilization. 2004. International Journal Phytoremediation. p 1-15.

27. LONERAGAN, J.F. Copper in soils and plants. Toronto. Abril, 1985. p 247-256

28. KELLER, Catherine, COSIO Claudia. Hyperaccumulation of Cadmium and Zinc in *Thalapsi Caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the Leaf Cellular Level 1. Febrero, 2004. Plant Physiology. P 716-726.

29. MARIVELA, C., Guerrero, C., López, L., Sánchez, V. y Toledo, A. Metales pesados y medio ambiente. Barcelona, España. 2002. Grupo de seminario 1-26.
30. MOREL Louis-Jean, SAISON Carine. Hyperaccumulation of Metals by *Thalapsi Caerulescens* as Affected Root Development and Cd-Zn/ Ca-Mg Interactions. 2004. International Journal of Phytoremediation. p 49-56.
31. Moreno J.L., García C., Hernández T., Ayuso M. 1997. Application of composted sewage sludges contaminated with heavy metals to an agricultural soil. Soil Sci. Plant Nutr. 43 (3): 565-573.
32. OLIVARE, Elizabeth. Nutrientes y metales en *Tithonia Diversifolia* (Hemsl). Gray (Asteraceae). Centro de Ecología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas, Venezuela. p 1-10
33. RIOS, K. Clara Inés. Guía para el cultivo y aprovechamiento del Botón de Oro. (Hems) Gray, 1999. p 5-30
34. RITMANN, Bruce E. y McCARTY, Perry L. Biotecnología del Medio Ambiente. Principios y Aplicaciones. Mc graw hill. 2005
35. RODRIGUEZ, Camila, MOTTA Beatriz. Métodos Analíticos del Laboratorio de Suelos. Bogotá, 1990. 5 ed.
36. SALAMANCA, 1717-1726. Edafología. Volumen 7-3. Septiembre 2000. pág 47-54.
37. SALT, D.E. Annual Review of Plant Physiology and plant Molecular Biology. 1998. Journal Agriculture. P49-53
38. SKOOG, WEST HOLLER CROUCH. Química Analítica. Mc Graw Hill. Séptima Edición.

39. STEVENSON, F. J. and ARDAKANI, M. S. Micronutrients in Agriculture. Ed. J. J. MORVEDT, P. M. GIORDAN and W. L. LINDSAY. Soil. Sci. Soc. Amer. Cáp. 5, 1972.
40. TERRY N, ZHU L Y. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II. Water hyacinth. Enero-Febrero 1999. Journal of Environmental Quality. P339-345.
41. THOMPSON, M. Regression Methods in the Comparison of Accuracy. Vol 107. 1982. p 1169-1175
42. TODD. A. Anderson, Ellen.L. Arthur phytoremediation an overview critical reviews in plants sciences 2005. Journal of natural resources and life sciences education. p 109—123.
43. TORRESDEY-GARDEAI, L Jorge. Phytoremediation. Abril 2003. Science Journals. p 2-5
44. LASAT, M Mitch. Phytoextracción of toxic metals: A review of biological mechanisms. Enero-Febrero 2002. Journal of Environmental Quality. p 109-112.
45. VALLEJO, V.R.; Cortina, J.; Fons, J.; Romana, J. y Sauras, T. (1993): Estrategias de muestreo en suelos forestales. El estudio del suelo y de su degradación en relación con la desertificación. MAPA. SECS.
46. VROBLESKY, A Don. Transformation and Control of Contaminants. Enero-Febrero 2005. Ground Water. p1-10
47. WALKER and BEAKER A.J. Ecophysiology of metal uptake by tolerance plants in : Heavy Metal tolerance in plants. 1990. Journal Biological. p 155-177.

48. WANG, T.C. Bioremoval of toxic elements with Aquatic Plañis and Algae. Bioremediation of Inorganics, Battelle Press. 1995. p 234-236
49. ZAR, H. Jerroid. Biostatistical Analysis. Ed 4. (1999): Biostatistical Análisis. Prentice Hall.
50. KOVALICK, W. Workshop jn phytoremedjaíjon of organic contaminants December 1996. <http://www.rtdf.org/public/phyto/>
51. MUÑOZ, F. Fitorremediación. Gestión IMA - USACH. 1997. Chile p.1-4. <http://www.usach.cl/ima/fitorrem.htm>.
52. Guía del ciudadano. Medidas Fitocorrectivas EPA septiembre 1996. Estados Unidos p 1-5. <http://www.epa.gov/ORD/NRMRL/reb/phyto haz.htm>

Anexo A. Porcentajes de humedad en muestras de raíz y hojas en la planta *Tithonia diversifolia* a los 45 días de sembradas las estacas

Tiempo 45 días		Réplicas %				
		1	2	3	4	5
F.A	[2.3] H	80.14	81.70	79.98	77.67	75.76
F.A.	[4.5] H	81.42	77.69	79.63	84.76	82.36
F.A.	[6.0] H	75.08	81.74	83.16	78.13	84.86
F.A.A.	[2.3] H	81.31	78.10	78.70	80.11	74.93
F.A.A.	[4.5] H	78.35	77.16	68.43	62.94	77.04
F.A.A.	[6.0] H	60.74	85.64	90.51	77.03	77.17
F.A.	[2.3] R	92.82	86.07	85.09	85.76	87.29
F.A.	[4.5] R	70.91	84.56	72.38	73.64	74.54
F.A.	[6.0] R	95.28	89.58	92.44	90.57	96.49
F.A.A.	[2.3] R	90.73	89.16	82.64	89.29	91.32
F.A.A.	[4.5] R	87.38	50.49	87.45	80.33	88.61
F.A.A.	[6.0] R	69.19	84.02	89.31	78.60	93.80

F.A. : Suelo Franco-arenoso

F.A.A. :Suelo Franco-arcillo-arenoso

R: Raíz

H: Hojas

[2.3], [4.5], [6.0]: Concentraciones de cobre en ppm

Fuente: Autores del Proyecto.

Anexo B. Porcentajes de humedad en muestras de raíz y hojas de la planta *Tithonia diversifolia* para 90 días de sembradas las estacas

Tiempo 90 días		Réplicas %				
		1	2	3	4	5
F.A	[2.3] H	77.15	83.21	84.65	84.15	81.15
F.A.	[4.5] H	83.32	57.48	85.27	85.27	80.95
F.A.	[6.0] H	74.17	81.70	80.46	92.11	81.00
F.A.A.	[2.3] H	74.23	63.84	72.24	70.03	70.57
F.A.A.	[4.5] H	76.59	77.61	77.68	77.83	72.75
F.A.A.	[6.0] H	70.00	67.29	74.48	66.01	71.80
F.A.	[2.3] R	76.27	88.39	85.64	84.15	81.15
F.A.	[4.5] R	93.82	92.54	90.47	87.20	89.17
F.A.	[6.0] R	88.32	86.74	87.01	91.57	87.39
F.A.A.	[2.3] R	89.71	84.40	88.40	85.43	86.37
F.A.A.	[4.5] R	92.08	89.59	91.01	91.02	92.73
F.A.A.	[6.0] R	95.52	80.71	81.93	85.22	82.70

F.A. : Suelo Franco-arenoso

F.A.A. :Suelo Franco-arcillo-arenoso

R: Raíz

H: Hojas

[2.3], [4.5], [6.0]: Concentraciones de cobre en ppm

Fuente: Autores del Proyecto.

Anexo C. Tabla de porcentajes de ceniza en muestras de raíz y hojas en la planta

Tiempo 45 días		Réplicas %				
		1	2	3	4	5
F.A.	[2.3] H	4.32	6.12	4.48	7.26	4.12
F.A.	[4.5] H	5.62	10.12	8.97	19.20	17.12
F.A.	[6.0] H	2.20	3.2	2.18	1.7	3.0
F.A.A.	[2.3] H	9.78	7.00	10.35	10.20	9.84
F.A.A.	[4.5] H	10.49	16.12	6.41	8.24	8.98
F.A.A.	[6.0] H	9.40	13.04	16.12	12.93	16.30
F.A.	[2.3] R	8.76	15.46	27.32	12.32	11.11
F.A.	[4.5] R	10.56	16.72	6.36	6.87	15.10
F.A.	[6.0] R	3.0	4.78	10.0	5.17	2.89
F.A.A.	[2.3] R	4.5	8.64	5.65	6.89	13.54
F.A.A.	[4.5] R	10.34	12.5	14.29	17.95	20.0
F.A.A.	[6.0] R	8.72	6.72	13.15	13.15	7.78

***Tithonia diversifolia* a los 45 días de sembradas las estacas**

F.A. : Suelo Franco-arenoso

F.A.A. :Suelo Franco-arcillo-arenoso

R: Raíz

H: Hojas

[2.3], [4.5], [6.0]: Concentraciones de cobre en ppm

Fuente: Autores del Proyecto.

Anexo D. Porcentajes de cenizas en muestras de raíz y hojas de la planta *Tithonia diversifolia* en un tiempo de 90 días de sembradas las estacas

F.A. : Suelo Franco-arenoso

Tiempo 90 días		Réplicas %				
		1	2	3	4	5
F.A.	[2.3] H	24.00	24.41	19.88	20.66	24.22
F.A.	[4.5] H	21.77	9.02	18.46	24.10	22.56
F.A.	[6.0] H	25.92	22.95	21.75	11.36	22.89
F.A.A.	[2.3] H	9.52	10.85	7.35	9.71	13.04
F.A.A.	[4.5] H	7.75	8.65	8.04	8.57	10.0
F.A.A.	[6.0] H	8.82	13.33	34.58	15.50	13.92
F.A.	[2.3] R	12.70	11.85	7.27	20.57	10.88
F.A.	[4.5] R	41.14	15.81	15.38	19.25	10.33
F.A.	[6.0] R	17.18	15.41	15.17	10.47	15.74
F.A.A.	[2.3] R	13.86	13.23	4.16	5.555	6.95
F.A.A.	[4.5] R	11.76	1.85	6.89	8.92	5.20
F.A.A.	[6.0] R	3.33	10.00	1.13	10.29	8.33

F.A.A. :Suelo Franco-arcillo-arenoso

R: Raíz

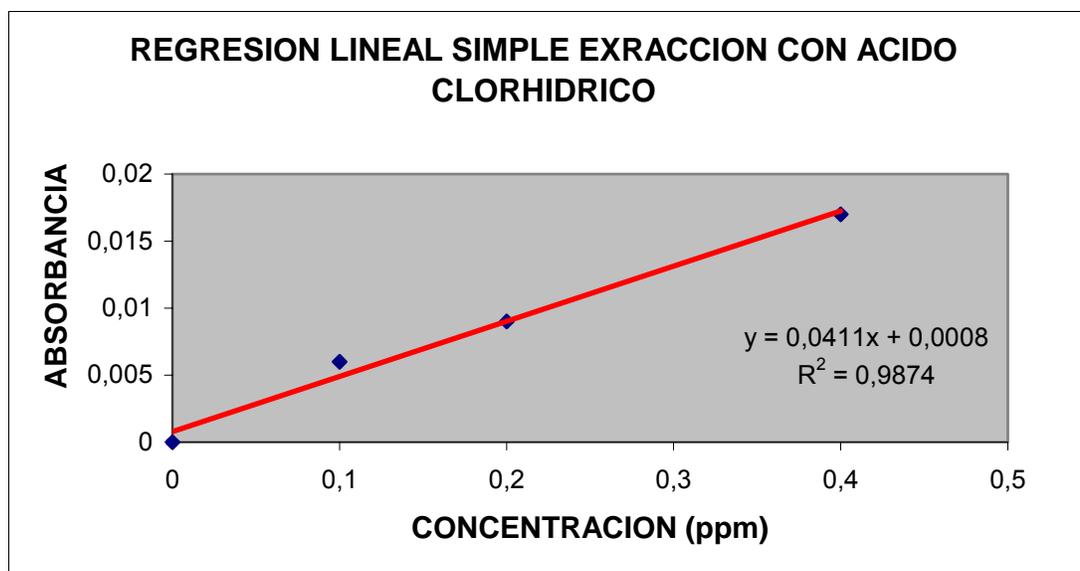
H: Hojas

[2.3], [4.5], [6.0]: Concentraciones de cobre en ppm

Fuente: Autores del Proyecto.

Anexo E. Regresión lineal simple para la absorción de cobre en hojas y raíz de la planta *Tithonia diversifolia*

CONCENTRACIÓN	ABSORBANCIA
0	0
0.1	0.006
0.2	0.009
0.4	0.017



Fuente: Autores del Proyecto.

Anexo F. Imágenes de las plantas en los suelos franco-arcillo-arenoso y franco-arenoso a los 45 y 90 días de sembradas

Figura 10. Plantas en el suelo franco-arcillo-arenoso, a los 45 días de sembradas, a una concentración de 4.5 ppm de cobre



Fuente: Autores del Proyecto.

Figura 11. Plantas en el suelo franco-arcillo-arenoso, 45 días de sembradas a una concentración de 6.0 ppm de cobre



Fuente: Autores del Proyecto.

Figura 12. Planta en el suelo franco-arenoso 45 días de sembradas a una concentración de 6.0 ppm de cobre



Fuente: Autores del Proyecto.

Figura 13. Plantas en el suelo franco-arenoso a los 45 días de sembradas con una concentración de 4.5 ppm de cobre



Fuente: Autores del Proyecto.

Figura 14. Plantas en el suelo franco-arcillo-arenoso a los 90 día de sembradas con una concentración de 4.5 ppm de cobre



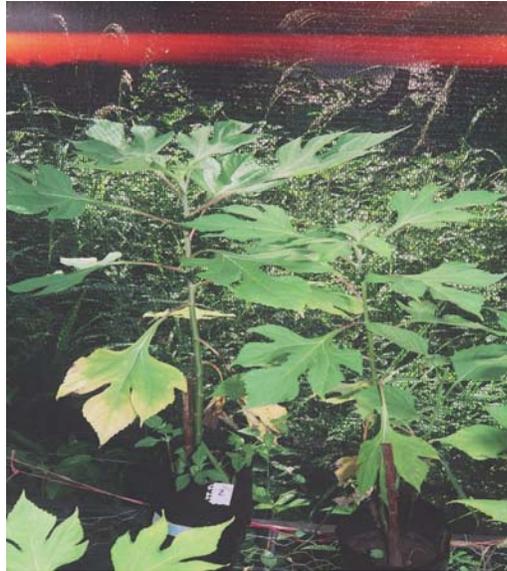
Fuente: Autores del Proyecto.

Figura 15. Plantas en el suelo franco-arcillo-arenoso a los 90 día de sembradas con una concentración de 6.0 ppm de cobre



Fuente: Autores del Proyecto.

Figura 16. Planta en el suelo franco-arenoso 90 días de sembradas a una concentración de 4.5 ppm de cobre



Fuente: Autores del Proyecto.

Figura 17. Planta en el suelo franco-arenoso 90 días de sembradas a una concentración de 6.0 ppm de cobre



Fuente: Autores del Proyecto.

Figura 18. Tipo de raíz que se presentaron en las planta sembradas en el suelo franco-arenoso



Fuente: Autores del Proyecto.

Figura 19. Tipo de raíz que se presentaron en las plantas sembradas en el suelo franco-arcillo-arenoso



Fuente: Autores del Proyecto.