

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias
Escuela de Química

Trabajo Final de Graduación sometido a la consideración de la Comisión de Trabajos
Finales de Graduación para optar por el grado de Licenciado en Química

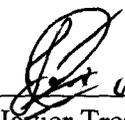
Remoción de metales pesados en lixiviados mediante fitorremediación

José Alfredo Jerez Chaverri

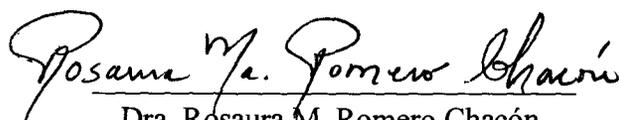
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio,
San Pedro de Montes de Oca
San José, Costa Rica

2013

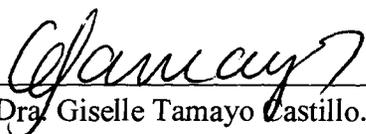
Este trabajo final de graduación fue aceptado por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciado en Química.



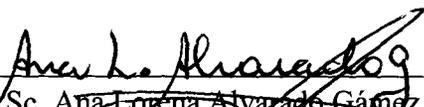
Dr. Javier Trejos Zelaya.
Decano de Facultad de Ciencias
Presidente del Tribunal.



Dra. Rosaura M. Romero Chacón.
Directora de tesis.



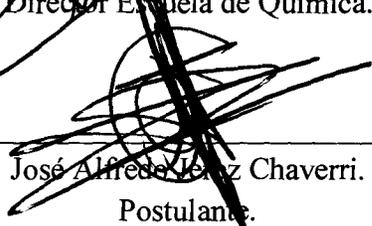
Dra. Giselle Tamayo Castillo.
Asesora.



M.Sc. Ana Lorena Alvarado Gámiz.
Asesora



Dr. Cristian Campos Fernández.
Director Escuela de Química.



José Alfredo Lenz Chaverri.
Postulante.

DEDICATORIA

A Dios por darme las convicciones para seguir siempre adelante, y en especial a mi hermana Priscila, así como al resto de mi familia y buenos amigos por haberme apoyado incondicionalmente durante toda mi carrera.

Mantén la paz en tu alma en la ruidosa confusión de la vida. (Max Ehrmann)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a la Dra. Rosaura M. Romero Chacón, directora de esta tesis, por su gran apoyo, su paciencia y su confianza tanto en mi persona como en mi trabajo. Igualmente, agradezco a la Dra. Giselle Tamayo Castillo así como a la M.Sc. Ana Lorena Alvarado Gámez, por el tiempo dedicado y sus aportes en la realización de este proyecto.

Al personal del Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA), en especial al señor Juan Carlos Brenes González y al señor Luis Diego Zúñiga Marín, por toda la colaboración brindada en la ejecución de la parte experimental.

Agradezco también a la profesora Patricia Guzmán Loría, así como a los encargados del Cuarto de Instrumentos de la Escuela de Química de la Universidad de Costa Rica. Mi gratitud al personal encargado de análisis de aguas y abonos orgánicos del Centro de Investigaciones Agronómicas por todo el apoyo brindado.

A mi familia y amigos que han estado conmigo, y a Dios por darme la fortaleza y haberme permitido alcanzar esta nueva meta en mi vida.

ÍNDICE GENERAL

Portada.....	i
Tribunal examinador.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice general	v
Índice de cuadros.....	vii
Índice de figuras	viii
Lista de acrónimos.....	x
Resumen	xi
1. Introducción.....	1
1.1 Situación de la basura en Costa Rica	1
1.2 Caracterización de lixiviados en rellenos sanitarios	3
1.3 Toxicidad de los metales pesados	6
1.4 Tratamiento de lixiviados	9
1.4.1 Procesos anaerobios.....	10
1.4.2 Procesos aerobios.....	11
1.4.3 Sistemas naturales.....	11
1.4.4 Evaporación	12
1.4.5 Recirculación de lixiviados.....	12
1.4.6 Procesos químicos de oxidación	13
1.4.7 Procesos de coagulación y adsorción.....	13
1.5 Fitorremediación.....	14
1.5.1 Tipos de hiperacumulación	17
1.5.2 Mecanismo de fitoextracción.....	18
1.5.2.1 Bioactivación de los metales en la rizosfera.....	19
1.5.2.2 Transporte de la raíz a las hojas y el rol de los transportadores en la absorción de metales.....	21
1.5.2.3 Distribución y retención de iones metálicos	22
1.5.3 Estrategias y respuestas de plantas a metales pesados	23
1.5.4 Ventajas y desventajas de la fitorremediación.....	24
1.5.5 Usos de la fitorremediación en tratamiento de lixiviados.....	25
1.6 Plantas utilizadas para fitorremediación.....	25

2. Objetivos.....	29
2.1 Objetivo General.....	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. Parte experimental	30
3.1 Equipo utilizado.....	30
3.2 Selección de las plantas	31
3.2.1 Cultivo de las plantas.....	31
3.2.2 Adaptación de las plantas a hidroponía	32
3.3 Realización de ensayos de cinética de remoción.....	32
3.3.1 Realización del ensayo en agua	32
3.3.2 Realización del ensayo en suelos.....	33
3.4 Técnica de análisis de absorción atómica.....	34
3.4.1 Limpieza de cristalería utilizada en el análisis	34
3.4.2 Utilización de blancos para análisis	34
3.5 Recolección y tratamiento de las muestras	34
3.5.1 Recolección de la muestra de lixiviado	34
3.5.2 Digestión de las muestras de ensayo en agua	35
3.5.3 Digestión de las muestras de ensayo en suelo	35
3.5.4 Digestión de muestras de parte aérea y raíz de plantas	35
4. Resultados y discusión	36
4.1 Diseño experimental de los ensayos realizados	36
4.2 Caracterización química del lixiviado utilizado	40
4.3 Pruebas preliminares de toxicidad del lixiviado en plantas.....	45
4.4 Cinética de remoción de cromo y plomo en agua.....	51
4.5 Cinética de remoción de cromo y plomo en tierra.....	58
4.6 Acumulación de los metales en la planta.....	65
4.7 Remoción de nitrógeno amoniacal y nitrógeno nítrico en ensayo	66
5. Conclusiones y recomendaciones.....	71
6. Bibliografía.....	74
Anexos.....	83
Anexo 1. Determinación de metales en muestras de agua.....	83
Anexo 2. Determinación de metales en muestras de suelo.....	84
Anexo 3. Determinación de metales en muestras de planta	86
Anexo 4. Arrastre de incertidumbres en la determinación de metales por AA ..	88

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I	Contaminantes encontrados frecuentemente en lixiviados.....	4
Cuadro II	Ámbitos de concentración de metales pesados más comúnmente encontrados en lixiviados	5
Cuadro III	Comparación de características típicas de los lixiviados de rellenos sanitarios en función de su edad	6
Cuadro IV	Características químicas, físicas y toxicológicas del cromo y el plomo	8
Cuadro V	Clasificación de mecanismos o estrategias que se utilizan para la fitorremediación	16
Cuadro VI	Estrategias y respuestas de plantas ante la contaminación con metales pesados.....	23
Cuadro VII	Ventajas y desventajas de tecnologías de fitorremediación	24
Cuadro VIII	Caracterización química realizada para la muestra de lixiviado del relleno sanitario Los Mangos	40
Cuadro IX	Fases de estabilización de lixiviados de rellenos sanitarios	42
Cuadro X	Resultados de la exposición del girasol (<i>Helianthus annuus</i>) y la “marigold” (<i>Tagetes erecta</i>) a lixiviado tras una semana de aplicación.	46
Cuadro XI	Resultados de la exposición de <i>Cajanus cajan</i> a diferentes metales pesados a diferentes concentraciones	50
Cuadro XII	Límites de detección y cuantificación calculados en las curvas para la determinación de metales pesados en ensayos hidropónicos.....	53
Cuadro XIII	Porcentaje de metales que se disminuye en cada uno de los ensayos de absorción de metales en hidroponía	56
Cuadro XIV	Cantidad de cromo y plomo absorbido por plantas de <i>Cajanus cajan</i> en hidroponía	65
Cuadro XV	Remoción de nitrógeno amoniacal y nitrógeno nítrico por parte de <i>Cajanus cajan</i> en hidroponía durante 15 días	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructuras de compuestos sideróforos quelantes de hierro	17
Figura 2.	Agentes quelantes comúnmente utilizados en técnicas de hiperacumulación inducida	18
Figura 3.	Procesos que se llevan a cabo durante la hiperacumulación	19
Figura 4.	Vías de entrada de los metales a la planta	22
Figura 5.	Ejemplos de plantas utilizadas para la fitorremediación de metales pesados	26
Figura 6.	Equipo de absorción atómica Varian, modelo 220	30
Figura 7.	Analizador de inyección de flujo LACHAT, modelo QuikChem 8000 ...	30
Figura 8.	Ubicación de relleno sanitario Los Mangos	36
Figura 9.	Pileta de recolección de lixiviados donde se realizaron muestreos	37
Figura 10.	Sistema de remoción de metales en hidroponía utilizado.....	38
Figura 11.	Ensayo realizado para la cinética de remoción de metales en tierras con lixiviado	39
Figura 12.	Eutrofización de aguas en un río	43
Figura 13.	Exposición por dos semanas de <i>Cajanus cajan</i> a un medio conteniendo 10 y 20% lixiviado de un relleno sanitario.....	47
Figura 14.	Comparación entre los tratamientos realizados al gandul utilizando diferentes metales pesados al penúltimo día del ensayo	49
Figura 15.	Curvas de cuantificación utilizadas en la determinación de metales pesados en el sistema de hidroponía #1	51
Figura 16.	Curvas de cuantificación utilizadas en la determinación de metales pesados en los sistemas de hidroponía #2 y 3	52
Figura 17.	Resultados para la cuantificación de cromo en cada uno de los sistemas hidropónicos utilizados	54
Figura 18.	Resultados para la cuantificación de plomo en cada uno de los sistemas hidropónicos utilizados	55
Figura 19.	Comparación fenotípica entre los ensayos realizados en agua con	

	metales pesados al día #16	58
Figura 20.	Curvas utilizadas para la cuantificación de cromo y plomo, para la determinación de estos metales en tierra	59
Figura 21.	Resultados para la determinación de metales pesados en suelos en función de los días de toma de muestra	60
Figura 22.	Fotos de ensayo en tierras al día #98	65
Figura 23.	Blanco de curva de remoción de metales en agua, utilizado para realizar la cuantificación de la remoción de nitrógeno amoniacal y nitrógeno nítrico	67
Figura 24.	Conversión de nitrógeno inorgánico (nítrico) en nitrógeno orgánico (aminoácidos).....	69
Figura 25.	Reacción del glutamato con el amonio (NH_4^+) para la síntesis de glutamina	69

LISTA DE ACRÓNIMOS

AA	Absorción atómica
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
BPCs	Bifenilos policlorados
COT	Carbono orgánico total
COV	Carbono orgánico volátil
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DQO	Demanda química de oxígeno
EBI	Enterprises Berthier Inc.
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FC	Fitoquelatinas
FIA	Analizador de inyección de flujo
GAM	Gran área metropolitana
HEDTA	Ácido hidroxietilendiaminotriacético
ITCR	Instituto tecnológico de Costa Rica
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
MSNM	Metros sobre el nivel del mar
MT	Metalotioneínas
NTA	Ácido nitrilotriacético
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
P + L	Producción más limpia
PROAMSA	Proyectos Ambientales S.A.
TNT	Trinitrotolueno
WPP	Grupo WPP continental.

INFORMACIÓN DESCRIPTIVA

Jerez Chaverri, José Alfredo

“Remoción de metales pesados en lixiviados mediante fitorremediación”

Tesis de Licenciatura

J.A. Jerez C., 2013

104 h.: 25 il.: 81 ref.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue valorar el uso de la fitorremediación para disminuir la cantidad de metales pesados en lixiviados. Para esto, se caracterizó la composición de un lixiviado tomado del relleno sanitario Los Mangos ubicado en barrio San José de Alajuela, y se determinó su contenido de metales pesados. De igual forma, con base en la literatura que se consultó, se realizaron pruebas para seleccionar una planta hiperacumuladora de metales que disminuyera el contenido de ellos en un medio enriquecido con lixiviados, tanto en una matriz hidropónica como en el suelo.

Se seleccionaron especies conocidas por su potencial de hiperacumulación, tales como el girasol (*Helianthus annuus*), el marigold (*Tagetes erecta*), así como el frijol de gandul (*Cajanus cajan*). Una vez realizados los ensayos con lixiviado, se determinó que sólo el frijol de gandul tolera las condiciones agresivas de un medio enriquecido con lixiviado, por lo que dicha planta se seleccionó para realizar los ensayos de remediación. Se realizaron pruebas de toxicidad y de hiperacumulación de cadmio, cobre, cromo, níquel y plomo utilizando esta especie. De estos metales, el primero resultó ser potencialmente tóxico, mientras que para los demás se obtuvieron resultados de acumulación en la planta de (3400 ± 100) mg/kg para el caso del cobre, (1000 ± 100) mg/kg para el cromo, (460 ± 40) mg/kg para el níquel, mientras que (1600 ± 100) mg/kg para el plomo.

Posteriormente, se realizaron las cinéticas de absorción de metales pesados para el cromo y el plomo en medio tanto hidropónico (con un 25% v/v de lixiviado) durante 16 días, y en suelos (con un 30% v/v de lixiviado contenido en el agua de riego) durante 98 días. Para ambos medios se utilizaron concentraciones entre (5– 10) mg kg⁻¹ de cada metal. Los resultados mostraron que es posible disminuir entre (36,6 – 46,0) % de cromo y entre (31,6 – 46,7) % del plomo contenidos en el medio acuoso. En el caso de la tierra, la disminución del cromo se dio en un 34,7 % del metal agregado, y en el caso del plomo no parece haber diferencia significativa entre el primer y el último día. En todos los experimentos realizados se utilizaron plantas control para valorar posibles efectos tóxicos ocasionados por los metales.

Además, se determinó la concentración de cromo y plomo tanto en la parte aérea como en las raíces del frijol de gandul de las plantas utilizadas en el ensayo en medio hidropónico. Los resultados obtenidos indicaron que para el caso del cromo, un 20,9% de este se encuentra en la parte aérea de la planta, mientras que en la raíz se encuentra un 79,1%. Para el caso del plomo, se encontró un 5,8% y un 94,2% en la parte aérea y en la raíz, respectivamente.

Por último, se determinó que *Cajanus cajan* disminuye el nitrógeno contenido en los lixiviados en un 80,4%.

Palabras claves: *Cajanus cajan*, cromo, fitoextracción, fitorremediación, lixiviados, metales pesados, plomo, relleno sanitario.

Directora de tesis: Dra. Rosaura M. Romero Chacón.

Unidad académica: Escuela de Química/Universidad de Costa Rica.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Situación de la basura en Costa Rica

La generación de desechos tecnológicos, industriales, agrícolas y domésticos, ha creado un problema de contaminación que crece a nivel mundial. Esto se ha venido incrementando sobretodo en las últimas décadas gracias al aumento de la población, a la creación de una cultura de consumismo y el uso desmedido de los materiales. Los residuos generados han venido a representar un reto para los gobiernos nacionales y locales, posicionándose así como un problema que involucra a todo ser humano y cuya solución nadie quiere asumir.

Sólo en el 2007, se generaron más de 600 millones de toneladas de basura municipal en todo el mundo (OECD, 2012), la cual es generada a partir de la actividad residencial, comercial, institucional, de barrido y de limpieza (AMPERO-IP & CEGESTI, 2007). Esta basura, representa únicamente una muy pequeña fracción del total generado, siendo mayor en proporción aquella representada por los desechos industriales y la relacionada con actividades agrícolas. A nivel de Costa Rica, en ese mismo año, las cifras de basura municipal rondaron las 3600 toneladas diarias, lo que corresponde a un total de 1300000 toneladas de desechos anuales (AMBERO-IP & CEGESTI, 2007). Tal cantidad, equivaldría a llenar por año alrededor de 1300 piscinas olímpicas de basura compactada con una densidad de alrededor de los 400 kg/m³ (Jaramillo, 2002).

La naturaleza química de los desechos municipales, de igual forma que la cantidad de ellos, es un factor variable que se encuentra estrechamente relacionado con aspectos como son la cantidad de habitantes, actividades propias de la zona, los patrones de consumo, así como con el estilo de vida del habitante que los genera (OECD, 2012). Así, podrían encontrarse desde desechos comunes como papel, plástico, desechos orgánicos, hasta otros como material bioinfeccioso, sustancias químicas, material radiactivo y desechos electrónicos.

En Costa Rica, los residuos sólidos inorgánicos que provienen de domicilios del Gran Área Metropolitana (GAM) están compuestos principalmente de papeles y cartón (59% de los residuos), plástico (31%), metales (6%) y un 4% que corresponde a otros materiales inorgánicos como el vidrio. Además de estos materiales inorgánicos (importantes contaminantes en función de su alta estabilidad química o baja degradabilidad), se han inventariado otros desechos como materia orgánica, textiles y hule (AMBERO-IP & CEGESTI, 2007).

Actualmente, más de 12000 toneladas de basura son recolectadas diariamente en Costa Rica. La responsabilidad de recolección recae principalmente en los gobiernos locales, siendo estos los encargados de la recolección y la disposición final de al menos un 70% de los desechos generados en cada una de las comunidades. De estos desechos, un 52% son tratados en rellenos sanitarios, un 17% en vertederos semicontrolados, mientras que al menos un 22% son llevados a vertederos de cielo abierto (Elizondo & Astorga, 2007). Las declaratorias de emergencia a nivel nacional en torno a desechos sólidos, han dado paso a reglamentos sobre rellenos sanitarios como la ley 8839, vigente actualmente (publicada en La Gaceta N°135 del 13 de Julio del 2010, Poder Legislativo, Costa Rica, 2010). Sin embargo, la cantidad de residuos sólidos o desechos que son dispuestos de manera descontrolada, ya sea en botaderos a cielo abierto o en lotes abandonados, además de ríos y orillas de carreteras, es más del 50% del total de desechos generados (Gaviria & Soto, 2007). Inclusive en muchos casos no se cubre la totalidad del territorio nacional en el servicio de recolección. Por lo anterior, la reglamentación en sí no significa un gran avance en la problemática de los residuos para Costa Rica.

El uso de rellenos sanitarios funge actualmente como una de las mejores alternativas para la disposición final de los desechos generados a corto y mediano plazo. Esto, como alternativa a la falta de respuesta de la población costarricense ante postulados tan simples de reutilización, reciclaje, reducción y rechazo de materiales contaminantes, además de la aparente pereza social por asumir roles proactivos en tendencias actuales como P+L. Sin embargo, la utilización de rellenos a la larga significa enterrar fuentes de energía y materia que podrían ser posteriormente reutilizables.

La costumbre de enterrar los desechos sólidos provenientes de fuentes municipales ha tenido su evolución propia. Se empezó inicialmente con botaderos a cielo abierto, que carecían de control alguno, y en los que se acumulaban desechos a modo de pila, quemándolos ocasionalmente. Estos botaderos de basura constituyen una forma poco apropiada de disposición de los desechos, dado que se encuentran expuestos a la intemperie, con la consecuente aparición de plagas y vectores de transmisión de enfermedades como moscas, cucarachas y roedores.

Costa Rica ha evolucionado hacia la aparición de rellenos sanitarios regulados, con una arquitectura orientada al cumplimiento de criterios científicos ambientales y normas operacionales específicas del confinamiento de los desechos. En estos rellenos se cubren los desechos con tierra, y se le da un tratamiento adecuado a los líquidos generados (conocidos como lixiviados), y una disposición apropiada de los gases generados. El sector privado se ha visto involucrado ofreciendo alternativas de recolección y de disposición final de desechos sólidos para las municipalidades. Organizaciones como WPP, PROAMSA, EBI de Costa Rica, entre otras, han asumido el rol de recolección y disposición final de desechos sanitarios, paralelo a la polémica ambiental entre gobiernos, grupos ambientalistas y la población misma que se encuentra vulnerable ante estos temas. Sin embargo, ante una problemática que crece al ritmo de la población y del desarrollo, esta metodología de disposición parece no ser suficiente.

1.2 Caracterización de lixiviados en rellenos sanitarios

Los lixiviados de rellenos sanitarios son el resultado de la percolación de líquidos a través de los desechos durante procesos de estabilización, es decir, líquidos que brotan hacia la superficie o se infiltran hacia el terreno donde se encuentra instalado un relleno sanitario o un vertedero de basura (Méndez *et al.*, 2009). Estos son considerados contaminantes importantes, dado que acarrean cantidades significativas de materia orgánica, como fenoles y compuestos orgánicos volátiles, a la vez que acarrean cargas importantes de materia en descomposición. Se han identificado de igual forma cantidades

importantes de metales pesados y compuestos inorgánicos en algunos rellenos, hallándose esto estrechamente relacionado a la contaminación de afluentes cercanos, o bien a la infiltración a las capas inferiores de terreno y la contaminación de mantos acuíferos.

La generación de lixiviados difiere de un sitio a otro y depende de muchos factores: grado de compactación de los desechos, grado de humedad inicial de la basura, material de cubierta de las celdas, precipitación pluvial, humedad atmosférica, temperatura, evaporación, evapotranspiración, escurrimiento, infiltración, capacidad de campo de relleno, entre otros (Méndez *et al.*, 2004). Por esta misma razón, la composición química, así como la carga biológica del lixiviado son factores altamente variables. El olor fétido y su color desagradable hacen que se clasifique como uno de los desechos más contaminantes y que mayor repugnancia genera entre la comunidad involucrada y el personal técnico que lo debe manipular (Méndez *et al.*, 2009). El lixiviado en sí generalmente presenta alta demanda química de oxígeno y una cantidad importante de carbono orgánico total, así como una alta variabilidad en contaminantes de naturaleza inorgánica (sólidos totales, metales pesados, nitrógeno amoniacal, cloruros, entre otros) y orgánica (fenoles, bifenilos policlorados, dioxinas) (Öman *et al.*, 2007). El cuadro I presenta los contaminantes más frecuentemente encontrados en lixiviados.

Cuadro I. Contaminantes encontrados frecuentemente en lixiviados (Heng *et al.*, 2010).

Grupo de contaminantes en lixiviados	Componentes que los constituyen
Materia Orgánica	Ácidos, alcoholes, aldehídos, y otros usualmente cuantificados como demanda química de oxígeno (DQO), demanda bioquímica de oxígeno (DBO), o carbono orgánico total (COT). Se incluyen igualmente ácidos grasos y otros como ácidos húmicos y fúlvicos.
Materia Inorgánica	Sulfatos, cloruros, amonio, calcio, magnesio, sodio, potasio, bicarbonato, hierro, manganeso y metales pesados como plomo, níquel, cobre, cadmio, cromo y zinc.
Compuestos orgánicos (Xenobióticos)	Hidrocarburos aromáticos, fenoles, hidrocarburos alifáticos clorados, pesticidas y plastificantes como bifenilos policlorados (BPCs), dioxinas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre otros.

En cuanto a la carga de metales pesados, esta varía significativamente entre diferentes rellenos sanitarios. Algunos metales pesados se pueden encontrar en

concentraciones moderadas en los lixiviados de rellenos municipales, como cadmio (Cd), níquel (Ni), zinc (Zn), cobre (Cu), cromo (Cr) y plomo (Pb) (González *et al.*, 2009). Los rangos típicos más comúnmente encontrados se listan en el cuadro II. Una parte importante de la variabilidad encontrada en metales pesados entre los diferentes rellenos, es debida a la diferencia entre la composición de los residuos y tecnologías utilizadas en los rellenos, mientras que otra parte se atribuye a la inexistencia de protocolos para el muestreo, filtración, y almacenamiento de muestras de lixiviados (Jensen *et al.*, 1999). Otros aspectos químicos del medio, como por ejemplo el pH o la presencia de materia coloidal, son factores importantes, ya que los coloides tienen alta afinidad por los metales pesados, contribuyendo la presencia de ellos en la cantidad de metales encontrados.

Cuadro II. Ámbitos de concentración de metales pesados más comúnmente encontrados en lixiviados (Jensen *et al.*, 1999).

Metal	Ámbito de concentración (µg/L)
Cadmio	2 – 20
Níquel	100 – 400
Zinc	500 – 2000
Cobre	20 – 100
Cromo	100 – 500
Plomo	50 – 200

La edad del lixiviado es también una variable que influye en su carga contaminante o composición química. El cuadro III muestra la composición de un lixiviado joven (en este caso con menos de un año) y un lixiviado maduro (que se considera de 5 años o más). Como se puede observar, la concentración tanto de sustancias de naturaleza orgánica como inorgánica es por lo general mayor en un lixiviado joven, que no ha atravesado las etapas de estabilización. Lo anterior repercute en la disposición final del lixiviado, y es un factor decisivo al considerar el tipo de tratamiento a seguir durante la disposición del líquido contaminante.

Cuadro III. Comparación de características típicas de los lixiviados de rellenos sanitarios en función de su edad (Heng *et al.*, 2010).

Característica	Lixiviado Joven	Lixiviado Viejo
Demanda química oxígeno (mg L ⁻¹)	3641,2	875,4
Demanda bioquímica de oxígeno (mg L ⁻¹)	2031,6	195,8
Carbono orgánico disuelto (mg L ⁻¹)	1240	290,3
pH	6,52	5,72
Amonio (mg L ⁻¹)	288,6	260,0
Nitrito (mg L ⁻¹)	1,8	0,72
Nitrato (mg L ⁻¹)	1,8	0,73
Nitrógeno total (mg L ⁻¹)	474,8	304,46
Calcio (mg L ⁻¹)	421,4	181,9
Cloruro (mg L ⁻¹)	893,8	735,1
Hierro (mg L ⁻¹)	32,1	11,2
Magnesio (mg L ⁻¹)	153,6	132,8
Sodio (mg L ⁻¹)	764,2	688
Sulfato (mg L ⁻¹)	196,8	81,7
Fenol (mg L ⁻¹)	783,8	175,4

1.3 Toxicidad de los metales pesados

El término metales pesados es aplicado a un grupo de metales y semimetales (metalloides) a los que se les asocia un importante potencial de contaminación, toxicidad y ecotoxicidad. A la vez, este término es atribuido a aquellos elementos de carácter metálico que tienen una densidad mayor de los 5 g cm⁻³. En los suelos, estos elementos incluyen generalmente metales como arsénico (As), cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), hierro (Fe), mercurio (Hg), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni), plomo (Pb) y zinc (Zn) (McLaughlin, 2005).

La mayoría de estos metales se encuentran en la naturaleza como cationes, a excepción de algunos metalloides como el arsénico que se encuentran como aniones con oxígeno (por ejemplo AsO₃³⁻). Estos a su vez, están presentes en la superficie terrestre como impurezas incrustadas en diferentes tipos de rocas. La mayor concentración de estas rocas se encuentra por lo general en áreas o depósitos, asociados con actividad volcánica reciente o pasada. Como es de esperarse, zonas con estas características exhiben patrones anormales de concentración de metales pesados en suelos, sedimentos y afluentes de aguas superficiales o subterráneas. Aún de origen natural, estos enriquecimientos en metales

pueden significar un riesgo para los organismos vivos que habitan la zona (Van der Peck, 2006).

Por otro lado, el aumento de las concentraciones de metales pesados está asociado con actividades como la minería y fundición. Estas actividades causan contaminación del aire y son asociadas a la deposición atmosférica de polvo contaminado. Otras fuentes importantes de contaminación antropogénica de estos metales incluyen fertilizantes, lodos de aguas residuales, disposición atmosférica por quema de combustibles, entre otros. Inclusive, antes de la década de 1980, se utilizaban escorias conteniendo un gran contenido de estos metales para el empedrado de carreteras, lo que significó la dispersión de estos sobre largas áreas de terrenos (Van der Peck, 2006).

El término de metales traza es frecuentemente utilizado como sinónimo de metales pesados, siendo esta última asociación incorrecta al excluir metales como Cr, Fe y Mn, los cuales se encuentran en el suelo a concentraciones mayores que 100 mg kg^{-1} (McLaughlin, 2005). A concentraciones naturales, muchos de estos metales, como por ejemplo el zinc, cobre, selenio y cromo, juegan un rol importante en procesos bioquímicos siendo requeridos en pequeñas cantidades por muchos organismos para su normal desarrollo (Van der Peck, 2006). Debido a su baja solubilidad en disoluciones neutras y alcalinas, muchas plantas han desarrollado estrategias para movilizar los metales desde su fase sólida, facilitando así la toma por las raíces. Ejemplo de esto son plantas que segregan compuestos para formar quelatos que juegan un papel importante en la adquisición de cobre, hierro y zinc (McLaughlin, 2005; Wirén, 2000).

Otros metales como el cadmio, mercurio y plomo, por el contrario, no son esenciales y son tóxicos inclusive a bajas concentraciones tanto para los animales como para las plantas (McLaughlin, 2005). El cadmio, ha sido asociado con el desarrollo de cáncer de pulmón al ingresar al cuerpo por vía respiratoria, además de ser relacionado con la posibilidad de desarrollar cáncer de próstata (Nordberg *et al.*, 2005). Por otro lado el mercurio, es catalogado como tóxico para las células en su estado divalente, interfiriendo en los grupos SH que constituyen componentes de las proteínas. El cuadro IV exhibe las

características químicas, físicas y toxicológicas que se le atribuyen a los metales cuya absorción por parte de las plantas se estudiarán más adelante.

Cuadro IV. Características químicas, físicas y toxicológicas del cromo y el plomo (Nordberg *et al.*, 2007; Nordberg, 2001).

Metal	Características físicas y químicas	Fuentes y aplicaciones	Características toxicológicas
Cromo	Peso atómico de 51,99 uma, número atómico 24, densidad de 7,2 g cm ⁻³ , punto de fusión de 1857 ± 20 °C, con estados de oxidación conocidos de +2, +3 y +6, alta dureza y de forma cristalina.	Este se encuentra en la naturaleza principalmente como cromita (FeOCr ₂ O ₃), ampliamente distribuida en la corteza terrestre, y que puede obtenerse de minería. La aplicación más importante del cromo puro es el cromado de una gran variedad de equipos, como piezas de automóvil y equipos eléctricos, además de ser utilizado también como pigmento por su intensa coloración al encontrarse como cromatos (CrO ₄ ²⁻ y Cr ₂ O ₇ ²⁻).	El Cr(II) es muy inestable, por lo que se oxida fácilmente a Cr(III). Por su parte, el Cr(VI), presente en los cromatos, es un agente oxidante fuerte que se reduce a Cr(III), reducción que es significativa en la toxicidad de compuestos de Cr(VI), como cromatos, dicromatos y ácido crómico. La forma trivalente del cromo es 500 a 1000 veces menos tóxica que su forma hexavalente. Los compuestos de Cr(VI) se absorben rápidamente después de la ingestión o inhalación. Algunos otros efectos de la toxicidad del cromo incluyen úlceras, irritación cutánea y sensibilidad de la piel, efectos respiratorios agudos por irritación de mucosas, ulceración del tabique nasal, necrosis renal y hepática, además de efectos cancerígenos principalmente en los pulmones.
Plomo	Peso atómico de 207,19 uma, número atómico 82, densidad 11,3 g cm ⁻³ , punto de fusión de 327,5 °C, con estados de oxidación conocidos de +2 y +4, y con 4 isótopos conocidos.	Los minerales de plomo se encuentran en muchos lugares del mundo, siendo el más rico la galena (sulfuro de plomo), que constituye la fuente principal de producción comercial de este metal. El plomo metálico se utiliza en forma de planchas o tubos cuando se requiere una gran maleabilidad y resistencia a la corrosión, como es el caso de la industria química o en la industria de la construcción, además del revestimiento de cables, como componente de soldadura y como empaste en la industria automovilística. Es un material excelente como protector de radiaciones ionizantes.	La principal vía de entrada del plomo al organismo es por inhalación, aunque también puede entrar por ingestión. Del plomo que entra al organismo por ingestión sólo se absorbe entre (10 - 15) %, mientras que el inhalado se absorbe por completo, siendo así la vía por inhalación la más significativa. Una vez absorbido en la sangre, el plomo se distribuye en tres compartimentos: la sangre, los tejidos blandos (riñón, médula ósea, hígado y cerebro), y el tejido mineralizado (huesos y dientes). El plomo es especialmente peligroso por su elevada toxicidad. Entre los efectos fisiológicos atribuidos al plomo se encuentran efectos neurológicos, hematológicos, endocrinos, renales, efectos sobre la reproducción y el desarrollo, así como efectos como posible cancerígeno. La toxicidad leve producida por plomo incluye síntomas como mialgia o parestesia, fatiga leve, irritabilidad, letargo, así como molestias abdominales. La toxicidad moderada incluye artralgia, fatiga general, agotamiento muscular, temblor, cefalea, dolor abdominal difuso, vómitos, pérdida de peso, estreñimiento.

1.4 Tratamiento de lixiviados

El tratamiento de los lixiviados de un relleno sanitario consiste en llevar a cabo operaciones o procesos con los que se busca remover gran parte de sus contaminantes antes de la disposición final. Determinar el tratamiento adecuado para los lixiviados es complicado, ya que como se vio, se trata de residuos líquidos con altos contenidos de sustancias tanto orgánicas como inorgánicas, así como una enorme variabilidad química, lo que dificulta la selección de una metodología de tratamiento adecuada. Por lo tanto, cada lixiviado proveniente de un relleno sanitario debe ser evaluado individualmente y sometido a pruebas de tratabilidad para encontrar el sistema de tratamiento adecuado para su manejo (Méndez, 2009).

Algunos de los procesos que se aplican al tratamiento de lixiviados son de naturaleza fisicoquímica. Existen en la bibliografía numerosas referencias de tratamientos fisicoquímicos de lixiviados, mismos que presentan los inconvenientes del costo de los reactivos químicos y generación de lodos de difícil disposición (Méndez, 2009). Así, la selección de un tratamiento para lixiviados conlleva el conocer los parámetros físicos y químicos que los caracterizan. Entre los aspectos que se deben tomar en cuenta para escoger una metodología de tratamiento se encuentran (Giraldo, 2001):

1. Cantidad de los lixiviados: La cantidad de los lixiviados varía en función de tres variables principales: el área del relleno, la cantidad de infiltración y el sistema de drenaje. Así, deben encontrarse metodologías de almacenamiento y de tratamiento que no se interpongan en el sistema de tratamiento propio del relleno, y que sean suficientes como para que no quede lixiviado sin la posibilidad de ser tratado. Lograr este equilibrio es especialmente difícil en lugares donde existen grandes variaciones en las precipitaciones pluviales.
2. Calidad de los lixiviados: Este aspecto está relacionado con la edad del lixiviado, siendo la generación de lixiviado joven más contaminante que el lixiviado maduro (ver cuadro III). Como regla general, a partir del momento de la generación del

lixiviado joven, las concentraciones de las sustancias disminuyen continuamente en el tiempo, a excepción del caso de algunos metales pesados cuyas reacciones de oxidación y reducción predisponen la concentración, favoreciendo su disponibilidad a través del tiempo. La calidad en los lixiviados jóvenes acarrea problemas de manipulación gracias a la alta contaminación, así como a las cargas significativas de compuestos orgánicos (efluentes con alta DQO), detergentes (que favorecen la formación de espuma), agentes incrustantes (que taponean tuberías y salidas de agua), entre otros.

3. Otras consideraciones: Entre otras consideraciones se encuentra la generación de compuestos orgánicos volátiles (que podrían escapar a la atmósfera de procesos de tratamiento aeróbicos y anaeróbicos), así como la generación de lodos en los sistemas de tratamiento que necesiten de otro tratamiento posterior.

Tomando en consideración estos factores, es posible seleccionar un tratamiento adecuado para los lixiviados. Seleccionar una metodología debe contemplar en determinados casos que la muestra sea tratada de forma efectiva, a la vez que esta misma metodología no resulte afectada por otros contaminantes que pueda contener la misma muestra. Algunas metodologías de tratamiento se exponen a continuación.

1.4.1 Procesos anaerobios

Son procesos fermentativos que se caracterizan por la conversión de materia orgánica a metano y dióxido de carbono en ausencia de oxígeno, y con la intervención de diversas poblaciones bacterianas. La degradación se da en cuatro fases: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis.

En el caso de los lixiviados, este tipo de procesos son aplicados a aquellos que tienen cantidades grandes de materia orgánica (generalmente lixiviados jóvenes), con ventajas como simplicidad y poca generación de lodos (que requieren bajos costos de inversión). Sin embargo, presenta desventajas como altas generaciones de compuestos

reducidos, generalmente tóxicos para los microorganismos (amoníaco y metano), además de la formación de incrustaciones o dureza que podría afectar el medio físico donde se esté llevando a cabo (Giraldo, 2001). Inclusive, se ha reportado el uso de sistemas anaeróbicos de tratamiento en forma conjunta, esto es, que a través de la adición de lixiviados se aumenta la biodegradabilidad anaerobia de aguas residuales domésticas (Barba *et al.*, 2010), dado que estos aportan el fósforo y el nitrógeno amoniacal necesario al medio, a la vez que son tratados de forma sencilla y con bajos costos de operación.

1.4.2 Procesos aerobios

A diferencia de los procesos anaerobios, estos cuentan con oxígeno como agente oxidante, por lo que se llevan a cabo reacciones del tipo oxidación – reducción. Por lo general, el oxígeno no se encuentra presente en el medio, por lo que es introducido de forma artificial, generalmente por burbujeo de aire. Dependiendo del medio que se trate, estos sistemas podrían acarrear problemas de generación de espumas, precipitación de incrustaciones, además de altas concentraciones de lodos activados. En el caso de lixiviados con altos contenidos en carbono orgánico volátil (COV), estos son acarreados con el oxígeno de estos sistemas (Giraldo, 2001). Estos procesos aerobios han sido exitosamente probados tanto en lixiviados que se encuentran en fase de fermentación ácida (lixiviados jóvenes, entre 2 y 5 años), como aquellos que se encuentran en fase metanogénica (lixiviados viejos, más de 5 años) (Glynn, J & Heinke, G, 1999).

1.4.3 Sistemas naturales

Estos sistemas conforman las lagunas artificiales y los humedales comúnmente utilizados para los desechos líquidos, y tienen la ventaja de manejar volúmenes altos sin la consecuente aparición de precipitados, formación de espumas, y toxicidad de microorganismos. La principal desventaja que se tiene con estos sistemas es la cantidad de terreno que se requiere para localizar estas lagunas. A su vez estas funcionan como áreas de amortiguamiento visual, de olores y de ruido, siendo colocadas alrededor del relleno donde

se utilizan como parte de los sistemas naturales de tratamiento, tal como es el caso de los humedales (Giraldo, 2001).

1.4.4 Evaporación

Esta técnica constituye la ventaja de que se logra reducir el volumen del lixiviado de manera significativa, además que permite que se aproveche el biogás generado por los procesos anaerobios del relleno como fuente del calor para la evaporación, convirtiendo este biogás a dióxido de carbono, mismo que constituye un residuo gaseoso menos contaminante que el metano inicialmente producido. Los residuos una vez sometidos a procesos de evaporación, requieren usualmente de procesos de post quemado, con el objetivo de evitar que muchos de ellos sean liberados al ambiente (Giraldo, 2001).

De igual forma, la evaporación de los lixiviados puede realizarse haciendo uso de la luz del sol como fuente de radiación para su evaporación. Sin embargo, para que un proceso de evaporación por la luz del sol se produzca, se requiere de un gran periodo de exposición a la radiación solar directa, periodo durante el cual otros fenómenos climáticos como precipitaciones pluviales se podrían dar, contrarrestando el efecto de la evaporación. Dado este panorama, se han creado mecanismos del tipo invernadero donde se permite aprovechar la mayor cantidad de calor atrapado, acelerando de esta forma el proceso de evaporación (Szantó *et al.*, 2011).

1.4.5 Recirculación de lixiviados

Se trata de hacer recircular los lixiviados por un periodo largo de tiempo a través de los rellenos sanitarios, con el objetivo de maximizar la tasa de producción de biogás, utilizando como materia prima principal los ácidos grasos presentes en los lixiviados, así como otras fuentes de materia orgánica presentes. El objetivo es utilizar el relleno sanitario como un gran reactor anaerobio de forma tal que dentro de este, se logre la conversión de los ácidos grasos en metano. Consecuentemente, al disminuir la concentración de ácidos grasos en el lixiviado aumenta el pH, con la consecutiva precipitación de los metales en el

medio tras disminuir su solubilidad. Así, se reduce significativamente tanto la cantidad de materia orgánica como la cantidad de metales que arrastra el lixiviado (Giraldo, 2001). Una desventaja podría tratarse del costo del equipo utilizado para la recirculación.

1.4.6 Procesos químicos de oxidación

Son procesos químicos que se realizan con la generación de radicales hidroxilo (OH^\cdot), con un potencial de oxidación considerable, que son altamente reactivos y no son selectivos. Generalmente, estos procesos son divididos en dos grupos: aquellos que no utilizan luz para generar estos radicales (oxidación química), y aquellos en donde se utiliza luz para generarlos (fotólisis) (Bodzek *et al.*, 2006).

Entre los procesos de oxidación química más conocidos se encuentran la oxidación con ozono en un medio básico, el uso de ozono con peróxido de hidrógeno, la oxidación con reactivo de Fenton (preparado a partir de peróxido de hidrógeno en presencia de sulfato de hierro (II)), así como la fotocatalisis (generación de iones hidroxilo de agua, mediante el uso de catalíticos semiconductores expuestos a la luz, como el caso del óxido de titanio (IV)) y el uso de luz ultravioleta con iones peryodato (IO_4^-) (Domènech *et al.*, 2001).

Gran parte de estos métodos de oxidación tienen la ventaja de que pueden ser aplicados en los lixiviados *in-situ*, ya que la activación con la luz los favorece y es barata y remueven, en algunos casos, hasta el 80% del carbono orgánico total. Sin embargo, presentan la desventaja de que requieren de la adición de reactivos al medio, tal es el caso de la oxidación con reactivo de Fenton que genera altas cargas de sulfatos (Bodzek *et al.*, 2006).

1.4.7 Procesos de coagulación y adsorción

La aplicación de procesos de coagulación en los lixiviados se lleva a cabo para reducir sustancias orgánicas e inorgánicas que se encuentran en forma de coloides, sólidos suspendidos y disueltos en el agua (Bodzek *et al.*, 2006). En procesos que utilizan sulfato

de hierro (II) a condiciones de pH y cantidades de coagulante optimizadas, se ha llegado a reducir hasta un 21% de carbono orgánico total, un 42% de remoción del color, así como un 31,20% de reducción en la turbidez (Talebi *et al.*, 2009).

Entre las principales sustancias utilizadas como coagulantes se encuentra el sulfato de aluminio, sulfato de hierro (II), cloruro de hierro (III), entre otros. La dosis del coagulante y el pH del sistema son los parámetros más importantes en el proceso de coagulación, con la desventaja de que estos deben de ser determinados para cada lixiviado (Bodzek *et al.*, 2006). La dosificación en el uso de coagulantes es muy importante, puesto que algunos autores como Nájera *et al.* (2009) reconocen un punto en el cual el uso de coagulante extra más bien disminuye la eficiencia en la remoción. Por otro lado, el tipo de coagulante utilizado es un aspecto aún más importante, ya que en algunos lixiviados tratados con cloruro de hierro (III) se encontró mayor eficiencia de remoción (67%) que en otros tratados con sulfato de hierro (II), (eficiencia del 10%). Sin embargo, este tipo de generalización no puede ser extendida a todos los lixiviados (Nájera *et al.*, 2009).

Además de estos tratamientos químicos, la adsorción funciona como una alternativa para sustancias tanto biodegradables como no biodegradables, ya que no es selectiva para la mayor parte de sustancias orgánicas. Esta tiene la ventaja de que el adsorbente puede ser regenerado numerosas veces luego de su tratamiento. Como adsorbente, generalmente es utilizado carbón activado, aunque otros como zeolita y vermiculita han demostrado ser también eficientes. El uso de carbón activado (principalmente como polvo y no granulado) permite la remoción hasta del 70% de la demanda química de oxígeno (DQO), así como de nitrógeno amoniacal (Bodzek *et al.*, 2006).

1.5 Fitorremediación

El término fitorremediación proviene de *fito*, que en griego significa planta o vegetal, y del término *remediar*, que proviene del latín *remediare* (Núñez *et al.*, 2004). Se trata de una serie de tecnologías o procesos que utilizan plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos, lodos y

sedimentos (Volke & Velasco, 2002). Se han identificado una amplia variedad de especies empleadas para este fin (Delgadillo *et al.*, 2011). Estas técnicas utilizan plantas capaces de secuestrar contaminantes para evitar su propagación en el medio, reubicarlos dentro de la misma, o bien, degradarlos o metabolizarlos en otras sustancias menos tóxicas (Volke & Velasco, 2002).

De manera más completa, la fitorremediación representa una tecnología sustentable que utiliza las plantas para reducir la concentración de contaminantes a partir de procesos bioquímicos realizados por las plantas y microorganismos asociados a su sistema de raíz. Estos procesos conducen a la reducción, mineralización, degradación, volatilización y estabilización de los diversos contaminantes (Núñez *et al.*, 2004). Según sea el proceso del que se trate, se han definido diferentes mecanismos o estrategias de fitorremediación entre las que se incluye la rizodegradación, fitoextracción y fitoestabilización, entre otras. Estas se describen en el cuadro V.

La aplicación de estas técnicas puede ser efectuada tanto fuera del área de tratamiento (métodos *ex-situ*), así como propiamente en el área de tratamiento (métodos *in-situ*), siendo estos segundos preferidos al requerir de menos recursos económicos y ser a su vez más fáciles de llevar a cabo. El hecho de que la fitorremediación sea una metodología que pueda ser aplicada de manera *in-situ*, permite que la destrucción, transformación, inmovilización o cualquier técnica que vaya a ser aplicada para reducir la disponibilidad del contaminante pueda realizarse sin la necesidad de excavar o transportar el medio contaminado, lo que a su vez reduce el impacto en el ecosistema y por supuesto, los costos de aplicación (Ghosh & Singh, 2005).

Cuadro V. Clasificación de mecanismos o estrategias que se utilizan para la fitorremediación (Volke & Velasco, 2002; EPA, 2000; Núñez *et al.*, 2004).

Técnica	Descripción
Rizodegradación	Se lleva a cabo en el suelo que rodea las raíces, y hace uso de sustancias que son excretadas naturalmente por éstas para suministrar nutrientes y crear condiciones favorables para organismos con actividad biológica. La rizodegradación incluye poblaciones microbianas que se alimentan de azúcares, aminoácidos, y otros compuestos que son liberados por las plantas (como parte de sus actividades fisiológicas y metabólicas), convirtiéndose estas poblaciones en las responsables de la degradación de contaminantes orgánicos presentes en el medio: pesticidas, compuestos clorados, bifenilos policlorados, y otros.
Fitoextracción	Los contaminantes son captados por las raíces y posteriormente son traslocados y/o acumulados hacia los tallos y hojas. Esta tecnología es la más frecuentemente aplicada a contaminación de suelos por metales pesados. Al final, el contaminante es removido por la recolección de las plantas.
Fitoestabilización	En esta, se da la generación de compuestos químicos en las raíces de las plantas que adsorben los contaminantes del suelo o bien, forman complejos, limitando así la movilidad y disponibilidad de ellos en el medio donde se encuentran. Esta ocurre a nivel de la raíz, alterando el ambiente químico del medio (frecuentemente suelo), afectando la disposición química, o bien, la forma química del contaminante. Algunas plantas por ejemplo, precipitan contaminantes al cambiar el pH del medio al producir CO ₂ , mientras que otras adsorben, complejan, o reducen la valencia del metal.
Fitodegradación	Consiste en el metabolismo de los contaminantes en contacto con los tejidos de la planta, a través de enzimas que catalizan su degradación. Se ha identificado el metabolismo de numerosas sustancias, tales como herbicidas, disolventes clorados, e inclusive reservorios de TNT. Con frecuencia, estas reacciones enzimáticas son llevadas a cabo por plantas y microorganismos en la rizosfera, ya sea de manera parcial o total, para luego ser asimilados por las plantas y secuestrados en sus vacuolas.
Rizofiltración	Es la adsorción o precipitación sobre las raíces, o bien, la absorción dentro de estas de contaminantes en disolución alrededor de la raíz, debido a factores bióticos y abióticos. Este se ha utilizado en metales como plomo, cadmio, cobre, cromo, radionúclidos, entre otros.
Fitovolatilización	Consiste en la toma y la transpiración de un contaminante por una planta, con la liberación posterior del contaminante o de una forma modificada hacia la atmósfera. Ejemplo de esto es la liberación de mercurio y selenio a la atmósfera. Con frecuencia, la liberación del contaminante a la atmósfera se hace en una forma química menos contaminante, o bien, más susceptible a procesos de degradación. La transformación por lo general se efectúa en la raíz, y su liberación se lleva a cabo durante la transpiración.

1.5.1 Tipos de hiperacumulación de metales en plantas

Dependiendo de las condiciones que favorecen el proceso, la hiperacumulación de metales se puede ver de dos formas: natural e inducida. La *hiperacumulación natural* por un lado, es aquella donde las plantas tienen la capacidad de solubilizar metales y absorberlos del suelo mediante sus raíces, para luego trasladarlos a los brotes y a las hojas, donde se almacenan (Sheoran *et al.*, 2011).

Las raíces de estas plantas juegan el papel central en la hiperacumulación natural, ya que son específicamente desarrolladas para capturar elementos o nutrientes esenciales del suelo, y a su vez cuentan con enormes áreas superficiales (pelos radicales) con las que cubren una gran cantidad del terreno. Las plantas acumuladoras a través de las raíces segregan compuestos quelantes de metales, como los ácidos mugiénico y avénico (figura 1), los cuales funcionan principalmente como quelantes metálicos especializados llamados sideróforos (compuestos que facilitan la absorción del hierro) (Lasat, 2000). Otras plantas por su parte, segregan compuestos como ácido cítrico, malónico y ácido oxálico que igualmente actúan como quelantes, pero a su vez disminuyen el pH del suelo, aumentando de esta forma la solubilidad de los metales, con lo que se incrementa su biodisponibilidad y la facilidad con que las plantas los introducen en sus tejidos vegetales (Sheoran *et al.*, 2011).

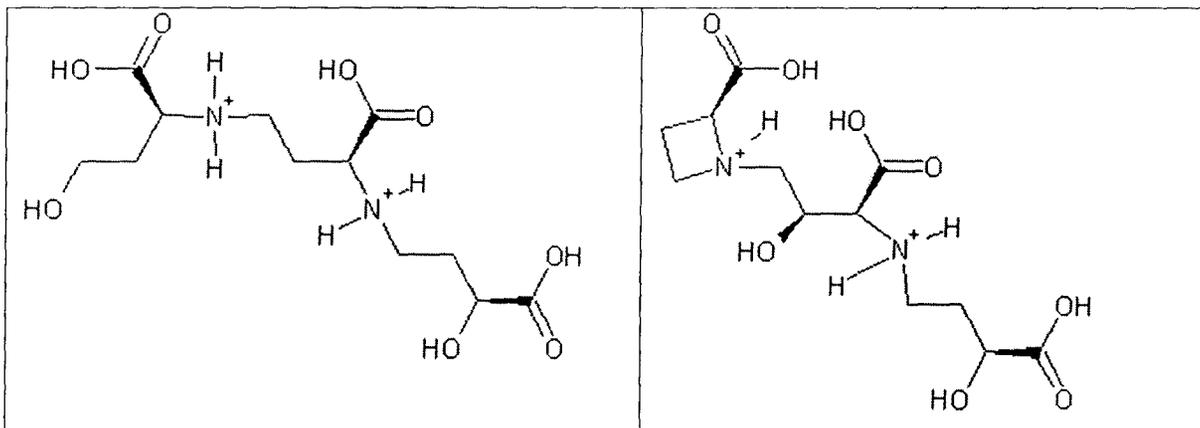


Figura 1. Estructuras de compuestos sideróforos: quelantes de hierro. Se muestra el ácido avénico (izquierda), así como el ácido mugiénico (derecha) (Wirén, 2000).

La *hiperacumulación química o inducida*, es aquella en que la movilidad de los metales se ve incrementada por tratamientos químicos. Este tipo de hiperacumulación es utilizada en plantas que tienen gran cantidad de biomasa, lo cual es una ventaja para la acumulación de metales, pero carecen de la capacidad de tomar estos del suelo. A su vez, es muy utilizada para elementos como plomo y oro, los cuales se adhieren tan fuertemente al suelo que no son capturados por las plantas en su entorno. Básicamente, se trata de modificar las condiciones que rigen el equilibrio o la interacción entre los metales con el suelo y con las plantas, favoreciendo la interacción con las raíces. Para esto, se utilizan diversos agentes quelantes, como los oxalatos, tartratos, ácido etilendiaminotetracético (EDTA), ácido nitrilotriacético (NTA), entre otros (figura 2) (Sheoran *et al.*, 2011).

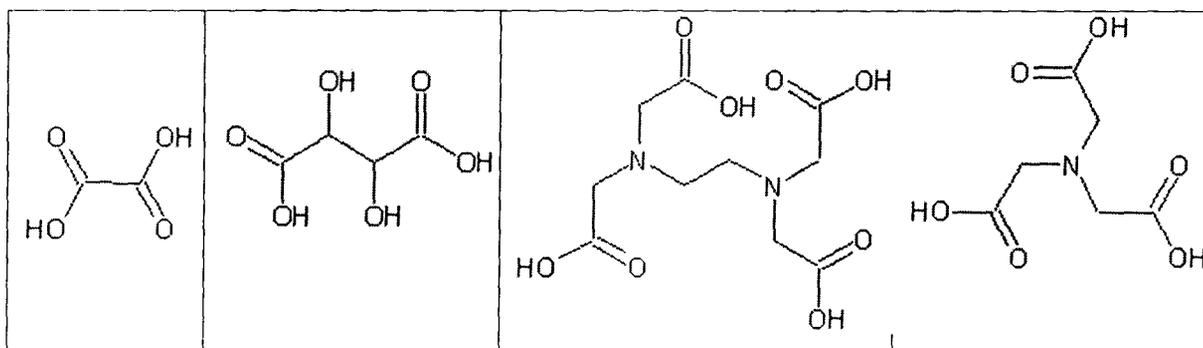


Figura 2. Agentes quelantes comúnmente utilizados en hiperacumulación inducida. De izquierda a derecha se muestra el ácido oxálico, el ácido tartárico, el EDTA y el NTA.

1.5.2 Mecanismo de fitoextracción

La acumulación de metales pesados es un fenómeno fisiológico de las plantas que se realiza principalmente a través de la fitoextracción. Para protegerse a sí mismas del envenenamiento por metales, las plantas desarrollan un mecanismo en el cual el metal entra directamente en el citoplasma de las células y de inmediato sea inactivado, complejo o excluido. Con esto, se previene que este participe de procesos celulares esenciales, siendo así tolerado por la planta que lo está acumulando (Sheoran *et al.*, 2011). La figura 3, muestra los principales procesos que se llevan a cabo en el mecanismo de hiperacumulación de metales.

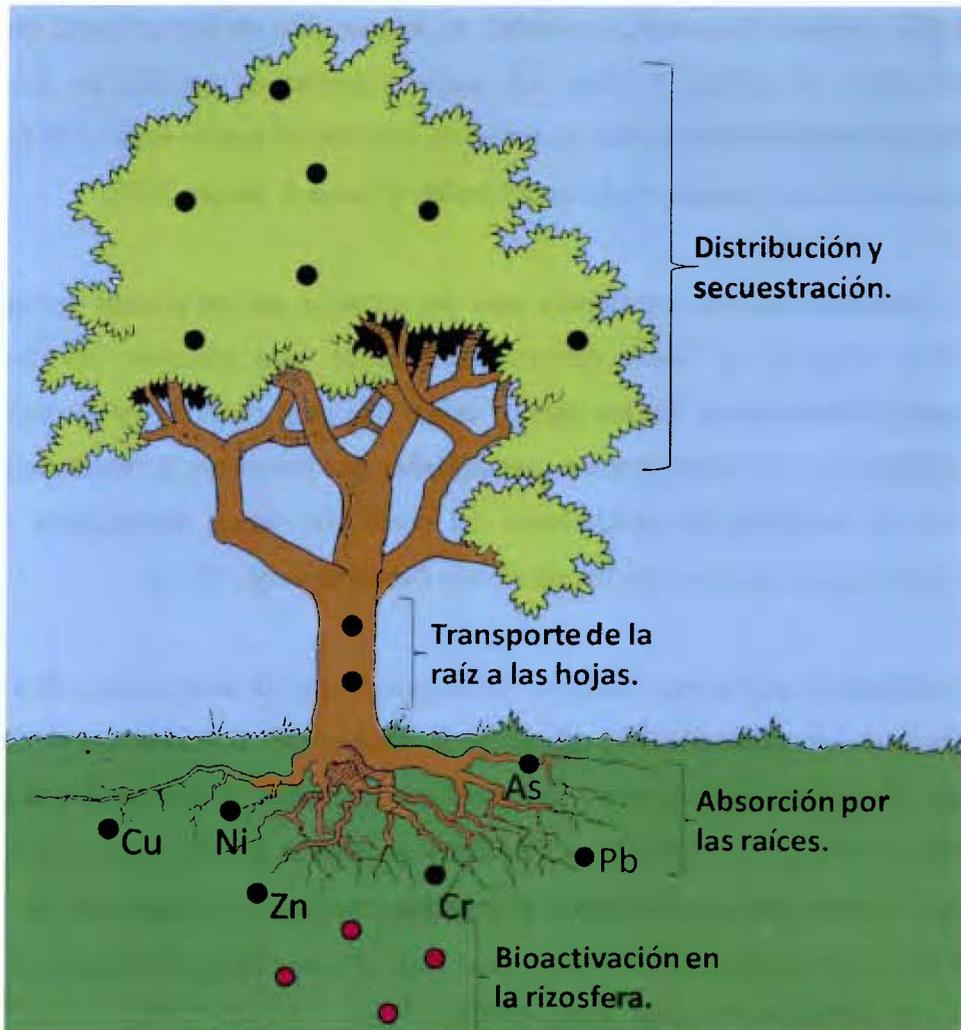


Figura 3. Procesos que se llevan a cabo en el mecanismo de hiperacumulación de metales en plantas por medio de fitoextracción.

Como puede verse, estos mecanismos se dan a través de toda la estructura vegetal, iniciando con un ciclo de absorción en las raíces, y finalizando con la distribución y secuestro de los metales en los diferentes tejidos de las hojas, lugar donde son fijados dentro de diferentes tejidos. A continuación se desarrolla cada uno de estos procesos.

1.5.2.1. Bioactivación de los metales en la rizosfera

Los metales pesados guardan gran afinidad con materia orgánica disuelta en los medios líquidos, así como con los ácidos húmicos y arcillas orgánicas en el caso de medios sólidos como la tierra. La solubilidad de los metales en el suelo es controlada por factores

como el pH, cantidad del metal, capacidad de intercambio de los cationes, potencial de óxido reducción del medio, y otros. La mayor cantidad de metales en disolución se encuentran únicamente cuando están en forma de iones en un medio ácido o de complejos o quelatos formados con materia orgánica del medio (Ghosh & Singh, 2005).

La disponibilidad de los metales para ser tomados por las plantas depende de qué tan solubles sean en un suelo determinado, siendo esto afectado por los factores anteriormente mencionados. En los suelos, existe una gran cantidad de microorganismos que en conjunto con las raíces forman comunidades que favorecen la biodisponibilidad de los metales al modificar las condiciones del suelo por varios mecanismos conocidos. Algunos de estos mecanismos son los siguientes (Sheoran *et al.*, 2011):

1. Acidificación por la raíz: Como se vio anteriormente, la acidificación de los suelos y la liberación de carboxilatos producto de la disociación de ácidos carboxílicos en las raíces, favorecen potencialmente la formación de quelatos y la posterior absorción del metal. La liberación de los protones en las raíces para la acidificación de la rizosfera es llevada a cabo por la membrana plasmática mediante la liberación de la enzima ATPasa, misma que regula el pH dentro y fuera de las células, facilitando la absorción activa de nutrientes (Moya & Agüi, 1996).

2. Secreción de compuestos quelantes de metales: Esta, se trata de la secreción de sideróforos mencionada anteriormente (figura 1), que promueve la disponibilidad de metales para la toma de estos por las raíces de las plantas, principalmente en el caso del hierro. Los agentes quelantes, además de facilitar la permanencia de los metales en el agua del suelo, promueven su desorción de la fase sólida del suelo. Aunque esto funciona en el caso de los metales pesados, la mayor parte de las plantas utiliza estos mecanismos para la absorción de hierro, aluminio y zinc.

3. Secreción de enzimas reductoras de iones: Algunas plantas dicotiledóneas liberan enzimas reductoras que pueden reducir metales como Fe^{3+} y Cu^{2+} , a estados de

oxidación menores, incrementando así la capacidad de ser tomados por la planta a través de sus raíces.

4. Organismos que viven en la rizosfera: Algunos microorganismos como las bacterias y los hongos micorriza (hongos que viven en las raíces en una asociación de simbiosis), se encuentran en grandes concentraciones en la rizosfera. Estas colonias incrementan la capacidad de las raíces para tomar metales mediante varias formas. Por ejemplo, algunos catalizan las reacciones de oxidación – reducción con las que se incrementa la disponibilidad de los metales: tal es el caso de bacterias que transforman el Cr^{6+} en Cr^{3+} , que es significativamente menos tóxico. Otros microorganismos, liberan compuestos orgánicos que funcionan como quelantes. Además, las micorrizas tienen el potencial de incrementar el área de absorción de las raíces, con lo que estimulan la adquisición de nutrientes de las plantas, incluyendo los iones metálicos.

1.5.2.2 Transporte de la raíz a las hojas y el rol de los transportadores en la absorción de metales

Para llevar el agua y los nutrientes necesarios de las raíces hasta las hojas, las plantas utilizan un mecanismo que incluye el sistema de tejidos conductores que comprende el tejido vascular, mismo que contiene varios grupos de células especializadas como son el xilema y el floema. Estas células están formadas por redes de células huecas, traqueidas y tubos cribosos, que unidas transportan los fluidos (incluyendo los metales pesados) por toda la planta, tanto desde la raíz hasta las hojas, así como desde éstas a otras partes de la planta (Audesirk & Audesirk, 2008).

El agua y los iones metálicos que son tomados por la raíz, son transportados en principio por el xilema a las diferentes partes de las hojas (figura 4). Este transporte, permite el movimiento libre del disolvente y de los metales pesados a través de conductos huecos, pero únicamente en forma de quelatos que hayan sido formados. La traslocación del metal de la raíz a las hojas se da mediante transportadores que los llevan desde el simplasto de las raíces hasta los espacios intercelulares (apoplasto) del xilema, conducidos

por una diferencia de presión causada por la transpiración del agua en las hojas de las plantas (Sheoran *et al.*, 2011). De esta forma, los metales son llevados desde las células de las raíces hasta los tejidos conductores.

Sin embargo, antes de entrar en las células de las raíces (simplasto), los metales son tomados por el apoplasto de la raíz (Sheoran *et al.*, 2011). Es a través de sitios activos de la membrana, así como canales de proteínas, que se permite que los metales

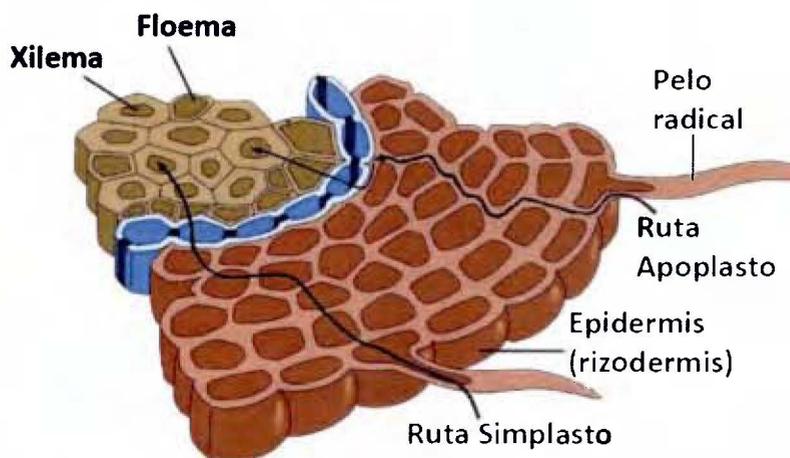


Figura 4. Vías de entrada de los metales en la planta a través de las vías exterior (apoplasto) o interior (simplasto) a las células de la raíz (Moore *et al.*, 1997).

atravesen la membrana de las células vegetales, ya que en principio esta membrana tiene poca afinidad por los metales. Inclusive, el potencial de la membrana es negativo por dentro de la membrana citoplasmática, lo cual provee el potencial necesario para facilitar la entrada de los cationes mediante transportadores secundarios (Ghosh & Singh, 2005).

1.5.2.3 Distribución y retención de iones metálicos

Una vez que los metales han sido trasladados a las células de las hojas, estos son almacenados en locaciones de la célula, tales como la epidermis, los mesófilos, paredes celulares y vacuolas, siendo estos sitios donde el metal no pueda poner en riesgo los procesos vitales de las células. Por ejemplo, el almacenamiento en la vacuola reduce las interacciones entre los procesos metabólicos y los metales, mientras que la localización de estos en el tejido de la epidermis tiene un impacto menos significativo en tejidos más activos metabólicamente, como los mesófilos (Sheoran *et al.*, 2011).

Las vacuolas son componentes importantes en el almacenamiento de los iones metálicos, donde son frecuentemente quelados, ya sea por ácidos orgánicos o fitoquelatinas (FC) y metalotioneínas (MT). Estos últimos, son péptidos y proteínas ricos en cisteína que secuestran metales. Las metalotioneínas particularmente, son compuestos con bajo peso molecular y contienen alrededor de 60 a 80 residuos de aminoácidos de los cuales entre 9 y 16 unidades son de cisteína, mismos que son genéticamente codificados por la planta. Por otro lado, las fitoquelatinas principalmente están compuestas de tres aminoácidos (glutamato, cisteína y glicina), que a diferencia de las metalotioneínas no son codificadas directamente por los genes, sino que son productos secundarios de rutas biosintéticas (Ghosh & Singh, 2005).

1.5.3 Estrategias y respuestas de plantas a metales pesados

En suelos que están contaminados con metales, las plantas utilizan tres estrategias básicas para crecer sin que ellos ejerzan un efecto toxicológico significativo en su metabolismo. Basadas en estas estrategias, las plantas se clasifican en tres tipos, los cuales se enlistan en el cuadro VI.

Cuadro VI. Estrategias y respuestas de plantas ante la contaminación con metales pesados (Ghosh & Singh, 2005).

Estrategia de la planta	Fundamento teórico
Excluidores de metales	Se trata de plantas que previenen la entrada del metal en las partes aéreas, manteniendo baja y constante la concentración de los metales en el suelo, con lo que se restringe la presencia del metal principalmente en la raíz. Las plantas logran esto alterando la permeabilidad de su membrana, o bien, cambiando la capacidad de las células de las paredes para ligarse a los metales del medio.
Indicadores de metales	Plantas que acumulan metales en los tejidos de sus partes aéreas en una cantidad proporcional a la cantidad del contaminante que se encuentra disponible en el suelo o medio en el que se encuentra. La tolerancia a los niveles de estos metales se produce gracias a que estos se almacenan como compuestos quelados o bien son almacenados en partes donde no afectan el funcionamiento de la planta.
Hiperacumuladoras de metales	Se trata de plantas que acumulan mayor cantidad de metales de los que están presentes en los suelos, por lo que no constituyen un indicador fiable para conocer la cantidad de metales presentes en estos. Estas plantas concentran los contaminantes en sus raíces, brotes y hojas, inclusive a concentraciones mayores de los 1000mg/g para especies de metales no esenciales, y mayores que los 10000 mg/g para otros como manganeso y zinc.

1.5.4 Ventajas y desventajas de la fitorremediación

La tecnología de la fitorremediación tiene numerosas ventajas, sobretodo al ser comparada con otras tecnologías. De igual forma, tiene ciertas limitaciones que impiden que pueda ser aplicada en todos los casos específicos de remediación que se deseen implementar.

Cada una de estas limitaciones y ventajas deben de ser analizadas de forma individual cada vez que se desee poner en marcha un ensayo de fitorremediación, ya que la importancia de estas depende principalmente de aspectos propios del ensayo como la planta, el tipo de terreno y el contaminante considerado. El cuadro VII expone algunas ventajas y limitaciones atribuidas a la fitorremediación, las cuales se consideran en términos generales.

Cuadro VII. Ventajas y desventajas de tecnologías de fitorremediación (Ghosh & Singh, 2005).

Ventajas	Limitaciones o desventajas
1. Aplicable a una gran cantidad de compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos. 2. Aplicable tanto en sustratos sólidos y líquidos, y de forma <i>in-situ</i> y <i>ex-situ</i> . 3. Su aplicación <i>in-situ</i> ejerce un mínimo impacto sobre los terrenos donde es aplicada. 4. Reduce la cantidad de desechos en más de un 95%. 5. No requiere de equipo caro o de personal altamente especializado. 6. En aplicaciones a larga escala, la energía química de los materiales almacenados podría ser utilizada para generar energía térmica. 7. Aplicaciones <i>in-situ</i> disminuyen la propagación de los contaminantes vía aérea o por el agua.	1. Restringida a sitios con contaminación superficial, o bien, se encuentra dentro de la zona de la raíz o de las plantas utilizadas. 2. Su aplicación puede requerir de muchos años. 3. Restringida a sitios con una concentración baja en contaminantes. 4. Restringida por condiciones climáticas de las plantas utilizadas. 5. Requieren de una disposición adecuada de las plantas o biomasa, una vez que son cosechadas. 6. Pueden afectar la biodiversidad si se introducen especies no nativas para remediar. 7. La utilización futura de los productos de estas plantas contaminadas es causa de preocupación (Ingesta de frutos por ejemplo).

1.5.5 Usos de la fitorremediación en tratamiento de lixiviados

Aunque en la actualidad no es común el uso de la tecnología de fitorremediación para tratar los lixiviados de un relleno sanitario, sí se han realizado estudios en torno a su aplicabilidad. En algunos casos, el uso de árboles y de plantas como pastos para la fitorremediación de lixiviados ha sido exitosa. Sin embargo, hay un número importante de ejemplos donde la fitorremediación ha fallado, principalmente por la aplicación excesiva de lixiviado, así como por el desconocimiento del impacto que tienen estos sobre el sistema de intercambio de nutrientes entre la planta y el suelo (Jones *et al.*, 2006).

El-Gendy (2008) demostró la factibilidad que tiene el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) gracias a su alto contenido en biomasa, su rápida tasa de crecimiento y su denso sistema de raíces, para remover metales contaminantes como cadmio, cromo, cobre, níquel y plomo de lixiviados de un relleno sanitario, removiendo así concentraciones que van desde el (24 - 80) % del total de metales agregados en disolución. Inclusive, plantas como ésta tienen la facilidad de que son colocadas como plantas flotantes, lo que facilita enormemente la implementación de sistemas de fitorremediación como sistemas de raíz flotante.

Por otro lado, la eficiencia y la capacidad del pasto africano (*Pennisetum clandestinum*) para la remoción de metales pesados como cobre, cromo, hierro, níquel, zinc y plomo en lixiviados, ha sido probado con buenos resultados con ensayos hasta de 180 días con una concentración de 50% de lixiviado, sin mostrar síntomas aparentes de estrés. Dada la alta tolerancia de esta especie a altos niveles de contaminación, es posible utilizarla para la descontaminación y remediación de sitios contaminados con lixiviados (Sögüt *et al.*, 2005).

1.6 Plantas utilizadas para fitorremediación

Existen diferentes plantas en las que se ha identificado potencial para fitorremediación. Estas plantas se encuentran en numerosas familias, así como también,

algunas otras corresponden a modificaciones genéticas que se han realizado para adaptarlas a la fitorremediación de contaminantes específicos como cadmio, mercurio o bifenilos policlorados (Delgadillo *et al.*, 2011). Algunas de las plantas que se conoce que absorben metales pesados se muestran en la figura 5.



Figura 5. Ejemplos de plantas utilizadas para fitorremediación de metales pesados. Se muestra de izquierda a derecha el girasol (*Helianthus annuus*), marigold (*Tagetes erecta*), frijol de gandul (*Cajanus cajan*), y el lirio acuático (*Eichhornia crassipes*).

El girasol cuenta con numerosos reportes como planta hiperacumuladora. Yankov & Tahsin, (2001) han reportado la acumulación de metales como cobre, plomo y zinc tanto en las raíces como en las hojas de esta especie, y la acumulación de cadmio principalmente en las raíces, a partir de suelos contaminados con estos metales. Por otro lado, autores como Kastori *et al.*, (1992), han estudiado la acumulación de metales pesados en girasol utilizando hidroponía, obteniendo resultados positivos para la acumulación de estos mismos cuatro metales al estar disueltos en agua.

Gutiérrez *et al.*, (2011) demostraron que no existen diferencias significativas en el desarrollo temprano de plántulas de girasol que hayan sido germinadas en suelos con concentraciones entre los (12,5 – 200) mg/L de cadmio, cromo, níquel y plomo. Inclusive, este mismo autor comprobó que factores como la temperatura tienen mayor efecto sobre la germinación de las plantas que la presencia de los metales.

El marigold puede ser utilizado para la remediación de suelos contaminados con metales pesados. Se ha comprobado la eficiencia de remover cadmio y plomo de sitios contaminados con estos metales utilizando la planta, siendo esta capacidad de remoción proporcional a la cantidad de contaminantes presente en el medio (Bosiacki, 2009). A su vez, Rodríguez *et al.*, (2010) concluyeron que a pesar de que el marigold acumula cantidades significativas de cadmio, cobre, níquel y plomo en etapas tempranas de su ciclo de vida, estos pueden causar alteraciones fisiológicas y morfológicas en las plántulas, tales como disminución del contenido de clorofila.

El *Cajanus cajan*, conocido como frijol de gandul o frijol de palo (figura 5), es la leguminosa de mayor cultivo en los países de trópico bajo, cuyas semillas son muy utilizadas como fuente de proteína. Se trata de una planta tanto anual como perenne, perteneciente a la familia *Papilionaceae* (Cedano, 2006) con un sistema de raíces que alcanza hasta tres metros de longitud y con numerosas raíces laterales que le permiten crecer en sitios secos o de estaciones alternas bien marcadas, principalmente en zonas tropicales ubicadas entre los 30° latitud norte y 30° latitud sur (Cedano, 2006; León, 2000).

Se trata de una planta perenne, altamente resistente a las sequías, y que tolera terrenos desde arenosos a arcillosos, pesados y pedregosos. Resiste un amplio rango de acidez, con valores de pH que va desde los 4,5 hasta los 8,5 en los terrenos, además de rangos de temperatura desde los 10 °C hasta los 35 °C. Diversos autores difieren sobre el origen de esta planta, pero la mayoría coincide en que es originaria de la India, mientras que otros atribuyen el origen al Oeste de África (Cedano, 2006).

El gandul prefiere condiciones húmedas y cálidas para lograr su máximo desarrollo vegetativo, condiciones propias de los países tropicales. Inclusive, temperaturas menores a los 17 °C retardan el crecimiento del cultivo y el desarrollo vegetativo de la planta, afectando de forma significativa su productividad. Así, las condiciones de altas temperaturas con alta humedad provocan un rendimiento exuberante de las plantas, por lo que puede ser cultivada en regiones con temperaturas altas como Carolina del Norte.

Además, puede ser sembrado desde el nivel del mar hasta los 3000 metros de altura, siendo su óptimo desarrollo aquel que se alcanza por debajo de los 750 msnm (Cedano, 2006).

El gandul ha demostrado ser una planta adecuada para el tratamiento de terrenos contaminados con metales pesados, siendo una especie conocida por la acumulación de estos y apta para crecer en una diversidad de tipos de suelo y bajo climas variados. Díaz y Massol (2003), han demostrado la utilidad que tiene esta especie como planta indicadora para evaluar la biodisponibilidad de los metales pesados en ambientes naturales, evaluando de esta forma la presencia de cadmio, cobalto, cobre, cromo, manganeso, níquel, plomo y zinc en terrenos contaminados en Puerto Rico, a consecuencia de actividades militares. Este estudio demostró concentraciones hasta de 228 mg de cromo por kilogramo de planta seca, tras una exposición de 3 meses de las plantas al terreno contaminado.

Por otro lado, Bailón (2006) estudió la absorción de plomo por parte de *Cajanus cajan* en tierra, encontrando un contenido de plomo en hojas de 28,94 mg por kilogramo de peso seco, utilizando EDTA para mejorar la disponibilidad de este metal. A su vez, demostró que características fisiológicas de la planta, tales como contenido de biomasa, contenido de clorofila y longitud de raíces y tallos de las plantas no se ven afectados tras la exposición de la planta a plomo, al menos a las condiciones estudiadas.

El efecto de metales como el cadmio, el níquel y el zinc sobre el gandul ha sido estudiado. Sivasankar demostró que niveles sobre los 150 mg de zinc por kilogramo de tierra pueden resultar tóxicos para la planta (Sivasankar *et al.*, 2012), afectando la cantidad de clorofila, la longitud de las raíces y el tallo de las hojas a estas concentraciones, siendo ideales los niveles entre los 50 y los 100 mg de zinc por kilogramo de tierra. En el caso del cadmio y del níquel, Sheoran encontró que la tasa de respiración del gandul disminuye significativamente al estar expuestos a ellos, siendo el efecto del cadmio mayor que la exposición al níquel (Sheoran *et al.*, 1990).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Valorar el uso de la fitorremediación para disminuir la cantidad de metales pesados en lixiviados, como alternativa para reducir el impacto de éstos sobre el ambiente.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar la composición de lixiviados provenientes de un relleno sanitario en cuanto a su contenido de metales pesados.
- Seleccionar una especie vegetal para la remediación de los lixiviados con base en el contenido de metales pesados en ellos.
- Determinar la capacidad de la planta para absorber los metales de los lixiviados utilizando un sistema hidropónico y un sistema en suelos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipo utilizado

La determinación de la cantidad de metales mediante absorción atómica (AA) en muestras de aguas, suelo y plantas se realizó en un instrumento marca Varian modelo 220, perteneciente a la Escuela de Química (figura 6). Se utilizaron lámparas de cátodo hueco de cromo y de plomo.



Figura 6. Equipo de absorción atómica Varian, modelo 220.

El nitrógeno amoniacal y el nitrógeno nítrico, se determinaron mediante espectroscopia UV-Visible, utilizando el método 10-107-06-2-O y el método 10-107-04-1-D, empleando un analizador de inyección de flujo (FIA) marca LACHAT, modelo QuikChem 8000, ubicado en el Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica (figura 7). Ambos métodos de análisis son proporcionados por los fabricantes del equipo.



Figura 7. Analizador de inyección de flujo LACHAT, modelo QuikChem 8000.

La determinación de salinidad, pH, conductividad y temperatura del lixiviado se realizó *in situ* el día de la gira haciendo uso de un equipo portátil para medición marca YSI, modelo 63. El oxígeno disuelto, igualmente se midió *in-situ*, haciendo uso de un medidor portátil de ThermoScientificOrion (3 - Star) con una sonda de RDO. La determinación de

los elementos mayores del lixiviado, se realizó por medio de un espectrofotómetro de plasma inductivamente acoplado (ICP), utilizando un equipo Perkin Elmer modelo Óptima 8300.

3.2 Selección de las plantas

Para la selección de la planta a utilizar se realizaron pruebas preliminares con tres especies elegidas con base en sus reportes como plantas hiperacumuladoras: girasol (*Helianthus annuus*), marigold (*Tagetes erecta*), y frijol de gandul (*Cajanus cajan*).

Las plantas *Helianthus annuus* y *Tagetes erecta* se germinaron y cultivaron en medio hidropónico de manera exitosa. Sin embargo, al momento de ser expuestas a concentraciones bajas de lixiviado, ambas especies no toleraron las condiciones, razón por la cual se optó por realizar pruebas con *Cajanus cajan*. Para esta última, se obtuvieron resultados positivos tanto en la germinación como en su aclimatación en cultivo hidropónico, y en su exposición a diferentes concentraciones del lixiviado.

Posteriormente, se realizaron pruebas en condiciones controladas, durante las cuales *Cajanus cajan* se expuso a concentraciones de 5mg/kg y 10 mg/kg de cinco metales pesados durante 16 días: cadmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr), níquel (Ni) y plomo (Pb). Para esta parte se utilizaron tres individuos por concentración, a los que se les realizó tanto una observación fenotípica para determinar cualitativamente la toxicidad del metal en la planta, así como una cuantificación final de la cantidad acumulada de cada uno de los metales en la planta.

3.2.1 Cultivo de las plantas

Todas las plantas utilizadas en los ensayos de selección, pruebas preliminares y en la cinética de remoción, se germinaron en un sustrato de musgo de turbera marca NUTRIPEAT®. Las plantas fueron abonadas con disoluciones hidropónicas comerciales “mayor” y “menor” marca EverGreen®, a la mitad de la medida recomendada (según

indicación del fabricante), y se mantuvieron en condiciones moderadas de iluminación, utilizando para este objetivo una malla verde polisombra comercial (sarán 30% sombra).

3.2.2 Adaptación de las plantas a hidroponía

Trascurridos los primeros quince días a partir de la germinación, todas las plantas utilizadas en los diferentes ensayos fueron transferidas a hidroponía, utilizando las mismas disoluciones hidropónicas comerciales marca EverGreen® a la medida recomendada (dada por el fabricante). El medio hidropónico fue oxigenado manualmente, aproximadamente cada 48 horas, y las plantas se mantuvieron en condiciones moderadas de iluminación. La disposición de las plantas en el medio hidropónico se realizó con la técnica de raíz flotante.

3.3 Realización de ensayos de cinética de remoción

3.3.1 Realización del ensayo en agua

Para la realización de los ensayos en agua, se preparó un medio acuoso a pH 6, que consistió en un 75% v/v de medio conteniendo disoluciones comerciales para hidroponía, y un 25% v/v de lixiviado autoclavado, enriquecido con 10 mg/kg del metal pesado en estudio (plomo o cromo). En el caso del cromo, este se empleó en forma de $K_2Cr_2O_7$, mientras que el plomo como $Pb(NO_3)_2$.

El recipiente utilizado fue construido en vidrio polarizado, con dimensiones de 30 x 40 cm de base y 25 cm de altura, que se encontraba forrado en su exterior con plástico negro, para prevenir la entrada de la luz. Las plantas fueron dispuestas sobre láminas de poliestireno, y prensadas con espuma de poliuretano. El ensayo fue realizado con tres réplicas de sistemas conteniendo el metal, y un sistema extra como control, con un total de 15 plantas por cada sistema. La incorporación de aire al medio se realizó con una bomba de pecera SUN SUN (modelo HP 400).

Durante el ensayo, se tomaron muestras del medio expuesto a las plantas cada 48 horas, durante un total 16 días naturales. Las pérdidas por evaporación fueron controladas ajustando el contenido de agua perdido entre la última toma de muestra y el momento de realizar la siguiente. La valoración de las plantas fue realizada por seguimiento fenotípico de éstas mediante la revisión de caída de hojas, cambios en la coloración y otros daños estructurales evidentes que pudieran sufrir.

3.3.2 Realización del ensayo en suelos

Para la realización de los ensayos en tierra se prepararon 8 recipientes de tierra conteniendo lixiviado y 10 mg/kg del metal en estudio (plomo o cromo). La cantidad de medio enriquecido a incorporar a la tierra se determinó midiendo la capacidad de campo de la tierra. Las sales utilizadas en este ensayo fueron las mismas que para el ensayo en hidroponía.

El medio que se utilizó para enriquecer la tierra con lixiviado y metales consistió en una disolución a pH 6 de 70% v/v de agua destilada, y 30% v/v de lixiviado autoclavado, conteniendo en su totalidad una concentración entre (5 – 10) mg/kg del metal.

La incorporación del medio acuoso a la tierra se realizó distribuyéndolo homogéneamente primero en una cuarta parte de la tierra, e incorporando luego la segunda cuarta parte, posteriormente la tercera y finalmente la cuarta, alcanzando de esta forma la capacidad de campo del suelo utilizado. En cada uno de estos pasos, la tierra fue homogenizada de forma manual, utilizando para esto un recipiente que se había lavado previamente con agua destilada.

Se prepararon 8 recipientes tipo maceta, cada uno con 5 individuos. Los intervalos para la toma de las muestras fueron variados, extendiendo el tiempo de estudio hasta los 98 días naturales. Tanto para el ensayo con cromo como para el ensayo con plomo, durante los 98 días se contó con un control (a las mismas condiciones que los demás ensayos y con los mismos componentes, pero sin metal), además de mantener durante todo el ensayo la

humedad de la tierra de todas las macetas con una disolución que contenía un 70% v/v de agua destilada, y un 30% v/v de lixiviado. La valoración de las plantas fue realizada por seguimiento fenotípico: caída de hojas, cambios en la coloración y otros daños estructurales evidentes.

3.4 Técnica de análisis de absorción atómica

3.4.1 Limpieza de cristalería utilizada en el análisis

Toda cristalería utilizada en los análisis correspondientes se lavó dos veces empleando jabón líquido para vajillas y agua de la tubería. Posteriormente, se lavó tres veces con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente.

3.4.2 Utilización de blancos para análisis

Para los análisis realizados de agua, suelos y plantas, se contó con un blanco que contenía todos los reactivos utilizados durante la digestión así como durante el análisis, a excepción del analito. La señal de este blanco fue automáticamente corregida por el equipo.

3.5 Recolección y tratamiento de las muestras

3.5.1 Recolección de la muestra de lixiviado

La recolección del lixiviado se realizó en el Relleno Sanitario Los Mangos, ubicado en Barrio San José de Alajuela. Específicamente, la muestra de lixiviado se recolectó en una pileta conteniendo lixiviado joven: el lixiviado contenido en la pileta se agitó y se tomaron muestras en cuatro puntos diferentes, las cuales se mezclaron posteriormente en un recipiente de plástico tipo tambor. Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al laboratorio, siendo mantenidas en recipientes cerrados y alejados de la luz hasta el momento de su análisis y empleo en los ensayos de acumulación.

3.5.2 Digestión de las muestras de ensayo en agua

Alícuotas de 25 mL del medio del ensayo en agua (ver punto 3.3.1) conteniendo 15 mL del ácido nítrico concentrado (grado reactivo JT Baker), se digirieron durante 2 horas a 80 °C. Pasado este tiempo, las muestras fueron aforadas con agua destilada en balones de 50 mL para su posterior trasvase a frascos de Nalgene® oscuros, donde se mantuvieron hasta el momento del análisis.

3.5.3 Digestión de las muestras de ensayo en suelo

Masas conocidas de suelo fueron determinadas mediante balanza analítica (Marca AND®, modelo HN 200) y calcinadas por 4 horas a 600 °C y el residuo de la calcinación fue digerido con HNO₃ concentrado (grado reactivo JT Baker) durante 4 horas a 80 °C. El resultado de la digestión fue filtrado bajo presión haciendo uso de papel filtro tipo Whatman 42. El filtrado se aforó con agua destilada en balones de 100 mL en el caso de las muestras que contenían cromo y en balones de 50 mL para las que contenían plomo. Finalmente, estas fueron dispuestas en frascos de Nalgene® oscuros y guardadas hasta el momento del análisis.

3.5.4 Digestión de las muestras de parte aérea y raíz de las plantas utilizadas

Las plantas se secaron mediante liofilización en un equipo marca LABCONCO® (modelo FreeZone 12) durante 12 horas. Una masa conocida de cada muestra seca, medida mediante balanza analítica (Marca AND®, modelo HN 200), se calcinó durante 4 horas a 600 °C y trasvasó a erlenmeyers de 125 mL. Una vez en éstos, las muestras fueron digeridas utilizando HNO₃ concentrado (grado reactivo JT Baker) durante 2 horas a 80 °C y posteriormente trasvasadas cuantitativamente a un balón de 50 mL. Finalmente, estas fueron dispuestas en frascos de Nalgene® oscuros y guardadas hasta el momento del análisis.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Diseño experimental de los ensayos realizados

La recolección de muestras de lixiviado se llevó a cabo en el relleno sanitario Los Mangos, entre las 9:45 y 11:20 am del día 29 de noviembre de 2011. Este lugar, conocido previamente como el botadero a cielo abierto “La Chanchera”, se encuentra ubicado en barrio San José en la provincia de Alajuela



Figura 8. Relleno sanitario Los Mangos, barrio San José de Alajuela. Coordenadas 10.013313,-84.259987.

(figura 8) y es administrado por el grupo WPP Continental. Este relleno se encarga de dar servicio a más de 600 mil habitantes distribuidos en 15 cantones, recibiendo un promedio de 550 toneladas de desechos por día.

Las condiciones de la gira fueron soleadas, con temperaturas altas, sin precipitación ni presencia de nubes. El muestreo fue realizado en una de las piletas diseñadas para la recolección de lixiviados de la celda #7 del relleno sanitario (la cual se encontraba activa al momento de la toma de la muestra) (figura 9), donde los desechos son depositados y comprimidos manualmente sin previa clasificación. En el relleno sanitario Los Mangos, previo a la disposición final de los lixiviados en el río Itiquís, estos son sometidos a un tratamiento de coagulación y de fermentación anaeróbica. En la pileta de la cual se tomaron los lixiviados, estos aún no han sido sometidos a ningún tratamiento. La recolección del lixiviado se realizó tras su agitación uniforme en la pileta, tomando muestras en cuatro

puntos y uniéndolas mediante un mezclado uniforme. Posteriormente, las muestras (3 en total) fueron nuevamente mezcladas y trasladadas al laboratorio, siendo mantenidas en recipientes cerrados y lejos de la luz para evitar su



Figura 9. Pileta de recolección de lixiviados donde se tomó la muestra.

contaminación, o bien, que pudieran oxidarse por el oxígeno del aire antes de los análisis correspondientes.

La escogencia de plantas para el estudio se realizó considerando especies de plantas que contaran con reportes como plantas hiperacumuladoras o bien, tolerantes a metales. Posteriormente, estas plantas fueron probadas con la muestra de lixiviado a diferentes concentraciones, con el objetivo de seleccionar la planta que tuviera mejor resistencia a las condiciones agresivas del medio.

Los ensayos de remoción de metales en hidroponía se realizaron tres veces de acuerdo al procedimiento establecido previamente (ver punto 3.3.1). Además, se contó con dos blancos que contenían plantas en: medio de hidroponía y lixiviado, y otro únicamente con medio de hidroponía. Al momento de la colocación del ensayo, las plantas tenían 6 semanas de edad. La figura 10 muestra los ensayos el primer día, con los sistemas utilizados.

Las condiciones de luz, de temperatura y aireación del medio en los sistemas se mantuvieron constantes tanto para el control como para los sistemas conteniendo metales, por lo que esta clase de factores y su efecto sobre las plantas utilizadas se excluye de cualquier cambio fenotípico que se pudiera observar. Para la aireación, se utilizó una bomba para pecera con la que se burbujeó aire durante el transcurso del ensayo,

manteniendo el agua con condiciones de oxígeno que aseguraran que la planta no sufriera de anoxia. Por otro lado, las pérdidas por evaporación de agua fueron monitoreadas, asegurando así que la cantidad de metales determinada en los ensayos fuera proporcional a los metales tomados por la planta, y que el efecto de evaporación no causara un error positivo en la concentración de metales a determinar.



Figura 10. Sistema de remoción de metales en hidroponía. Se presentan los cuatro sistemas en la estructura utilizada (izquierda) y los sistemas individuales (derecha). Cada sistema contiene 15 plantas.

La toma de las muestras fue realizada cada 2 días, para un total de 7 muestreos para el cromo y 8 para el plomo. Ambos ensayos fueron realizados por aparte, asegurando así que no existieran efectos de sinergia, de antagonismo o de competencia entre estos (Rodríguez *et al.*, 2009). La duración de ambos ensayos fue de 16 días, considerando este tiempo adecuado para monitorear fenotípicamente las plantas respecto a los efectos toxicológicos que los metales pueden producir. Una vez recolectadas todas las muestras, estas fueron guardadas en recipientes cerrados y posteriormente analizados.

Para los ensayos de remoción de metales en tierra, se utilizaron cinco plantas por cada maceta, colocando un total de 8 macetas por metal y una maceta extra para utilizarla como control. Al momento de colocar el ensayo, las plantas utilizadas tenían 6 semanas de edad. La figura 11 muestra el ensayo colocado al primer día, donde se muestran las 8 plantas utilizadas para cada metal y en el centro la maceta de control.

Para la puesta en marcha de este ensayo, se hizo necesario conocer la cantidad de agua que soportaba la tierra utilizada, con la finalidad de disponer de la cantidad necesaria tanto de lixiviado como del metal contaminante y preparar la tierra enriquecida con ambos componentes. Para esto, se tomó tierra seca hasta llevarla a la capacidad de campo. De esta forma se conoció la cantidad de medio enriquecido que se le podía agregar a la tierra sin que hubiera pérdidas por lixiviación de agua, que podría arrastrar los metales fuera de las macetas.



Figura 11. Ensayo realizado para la cinética de remoción de metales en tierras con lixiviado. A la derecha las macetas con cromo, al centro el control, y a la izquierda las macetas con plomo.

Además, durante la realización del ensayo, la humedad del suelo se mantuvo constante regando diariamente su superficie con cantidades pequeñas del medio, de manera que no hubiera pérdidas por lixiviación ni tampoco se llegara a la sequedad del terreno. Las condiciones de luz, de temperatura y humedad se mantuvieron iguales tanto para el control como para las plantas utilizadas, por lo que esta clase de factores externos y su efecto sobre las plantas utilizadas se excluye de cualquier cambio fenotípico que se pudiera observar. El ensayo tuvo una duración de 96 días naturales, con 8 tomas de muestra en total entre intervalos variables de tiempo (figura 21).

4.2 Caracterización química del lixiviado utilizado

El cuadro VIII muestra los resultados de la caracterización química realizada para el lixiviado. Dado que se contaba con un equipo portátil para la determinación de parámetros físicos como pH, temperatura, salinidad, oxígeno soluble y conductividad eléctrica, estas mediciones fueron realizadas en el momento del muestreo y en diferentes puntos de la pileta representada en la figura 9. La determinación de los demás parámetros fue realizada en el laboratorio.

Cuadro VIII. Caracterización química realizada para la muestra de lixiviado del relleno sanitario Los Mangos.

Parámetro medido	Valor
Parámetros físicos y medidos <i>in-situ</i>.	
pH	7,5
Temperatura (°C)	35,5
Conductividad Eléctrica (mScm ⁻¹)	18
Salinidad (ppt)	10,5
Oxígeno soluble (mg L ⁻¹)	0,2
Densidad (g mL ⁻¹) a 25 °C	1,01
Contenido de nitrógeno.	
Nitrógeno total (% m/m)	0,15
Nitrógeno amoniacal (NH ₄ ⁺) (mg L ⁻¹)	1569
Nitrógeno nítrico (NO ₂ ⁻ y NO ₃ ⁻) (mg L ⁻¹)	0,3
Análisis químico completo de elementos mayores.	
Fósforo (mg/kg)	14,0
Calcio (% m/m)	0,01
Magnesio (% m/m)	0,01
Potasio (% m/m)	0,09
Azufre (mg/kg)	33,0
Boro (mg/kg)	5,0
Contenido en metales pesados.	
Arsénico (µg L ⁻¹)	ND*
Cadmio (mg L ⁻¹)	ND
Cobre (mg L ⁻¹)	ND
Cromo (mg L ⁻¹)	ND
Hierro (mg L ⁻¹)	6,55 ± 0,08
Manganeso (mg L ⁻¹)	1,1 ± 0,1
Mercurio (µg L ⁻¹)	ND
Níquel (mg L ⁻¹)	ND
Plomo (mg L ⁻¹)	ND
Zinc (mg L ⁻¹)	0,43 ± 0,01

*ND: No detectado en la muestra. Los límites de detección para estos son: arsénico 8 µg L⁻¹, cadmio 0,38 mg L⁻¹, cobre 0,34 mg L⁻¹, cromo 1,2 mg L⁻¹, mercurio 5 µg L⁻¹, níquel 0,22 mg L⁻¹ y plomo 0,51 mg L⁻¹.

La composición química de los lixiviados es altamente variable, y responde a numerosos factores entre los que se encuentra la fase de estabilización del lixiviado. El cuadro IX muestra las características de cada una de estas fases, y su orden de aparición en el tiempo. Algunos autores han identificado otras cuatro fases de estabilización del lixiviado que se podrían dar luego de transcurridos más de 30 años de la generación de este. La identificación de dichas fases responde a postulados teóricos dado que no se cuenta con evidencia experimental o estudios que prueben la existencia de ellas (Kjeldsen *et al.*, 2005).

El comportamiento químico de los principales contaminantes presentes en un lixiviado gira en torno a la fase de estabilización en la que se encuentra (cuadro IX). La materia orgánica disponible, los elementos inorgánicos mayores, los metales pesados y otros compuestos xenobióticos están presentes en los lixiviados en función del pH, temperatura, bacterias presentes y otros factores que afectan la naturaleza química del medio (Kjeldsen *et al.*, 2005). Un lixiviado en particular, tal como el caso del lixiviado utilizado en este proyecto, no puede ser clasificado estrictamente dentro de una de estas fases, por la recirculación dentro del relleno y la generación constante de nuevos lixiviados.

Un valor relativamente alto de conductividad eléctrica para el lixiviado (cuadro VIII) indica la presencia de materia inorgánica disuelta, así como un contenido significativo de sólidos totales disueltos (Mor *et al.*, 2006). Esto puede ser atribuido principalmente a que se espera que a un pH cercano al valor neutro, la mayor parte de las especies inorgánicas se encuentren disueltas. Por otro lado, en la pileta donde se tomaron los lixiviados, estos aún no han sido sometidos a ningún tratamiento, por lo que parece normal que se encuentren altas cargas de este tipo de contaminantes.

Los altos niveles de hierro se atribuyen principalmente a los objetos de acero que han sido arrojados en el relleno sanitario. De igual forma, su coloración oscura se puede atribuir principalmente a la oxidación de todo el hierro a Fe^{3+} , con la consecuente formación de hidróxidos de hierro (III) coloidales e insolubles y a la formación de complejos férricos con ácidos fúlvicos y ácidos húmicos presentes en el terreno. Estos

últimos son de color oscuro (Mor *et al.*, 2006). De igual forma, niveles importantes de zinc son comunes en la mayoría de los lixiviados (Ogundiran & Afolabi, 2008).

Cuadro IX. Procesos o fases de estabilización de lixiviados de rellenos sanitarios (Kjeldsen *et al.*, 2005).

Fase de estabilización	Características
Fase aeróbica inicial	El oxígeno que existe en los espacios ocupados por el aire en el relleno es consumido rápidamente por el lixiviado para la formación de compuestos oxidados como el CO ₂ . Esta fase se incrementa con el aumento de la temperatura, y dura pocos días (los días durante los cuáles el oxígeno no se ha agotado).
Fase anaeróbica ácida	Fase durante la cual se dan reacciones de fermentación, una vez que el oxígeno ha sido agotado. La descomposición se da mediante dos tipos de bacterias, entre las que se encuentran las bacterias fermentativas (hidrolizan polímeros a monosacáridos, ácidos carboxílicos y alcoholes), y las bacterias acetogénicas (convierten ácidos en acetatos, hidrógeno y dióxido de carbono). Dada la conversión en ácidos de las bacterias fermentativas, el pH del medio baja.
Fase metanogénica inicial	Fase en la cual se da la conversión de los productos de la fase anaeróbica en metano y dióxido de carbono. Este se da por la vía de las bacterias metanogénicas, y la producción de estos gases está limitada por el crecimiento de estas bacterias. El pH del medio se neutraliza.
Fase metanogénica estable	Es la fase en la cuál se alcanza el máximo de producción de metano, mismo que empieza a decrecer posteriormente cuando el sustrato utilizado (ácidos carboxílicos, monosacáridos y alcoholes) se disminuyen.

Las cantidades de nitrógeno amoniacal están relacionadas principalmente con la descomposición de aminoácidos provenientes de compuestos orgánicos como las proteínas (Mor *et al.*, 2006). Por otro lado, la proporción de nitrógeno amoniacal en relación con el nitrógeno nítrico indica que en el lixiviado hay un contenido bajo de oxígeno, ya que se desfavorecen las condiciones de nitrificación (Shuokr *et al.*, 2010). Los niveles totales de oxígeno disueltos medidos en el lixiviado confirman esta suposición, encontrándose estos en 0,2 mg L⁻¹, mientras que para el agua de consumo a esta temperatura y presión atmosférica se espera un mínimo de 6,0 mg L⁻¹ (Llorca, 2006).

La existencia de altos niveles de contaminación de nitrógeno amoniacal es uno de los problemas críticos usualmente encontrados en la gestión de lixiviados provenientes de rellenos sanitarios (Shuokr *et al.*, 2010). Un alto contenido de nitrógeno amoniacal en conjunto con un contenido relativamente alto de fósforo (ver cuadro VIII), motivan el



Figura 12. Eutrofización de aguas en un río producida por enriquecimientos excesivos de nitrógeno y fósforo.

crecimiento de algas, lo que a su vez da cabida a fenómenos de eutrofización y disminución del contenido de oxígeno (figura 12). Además, cuerpos de agua con estas características son tóxicos para los organismos vivos, por lo que no pueden ser dispuestos en afluentes de agua.

La carga de macroelementos inorgánicos en el lixiviado depende de la materia orgánica disuelta y de la fase de estabilización del lixiviado (cuadro IX). Algunos metales como sodio y potasio, y aniones como cloruro, debido a su alta solubilidad, no dependen de fenómenos de precipitación, adsorción y formación de complejos, por lo que la fase de estabilización no les afecta de forma significativa. Otros como calcio y magnesio sí dependen de estos factores, siendo afectados por el pH del medio (cambiante en las fases de estabilización) y cuya disposición final tiene un efecto significativo en la dureza del agua y la consecuente aparición de incrustaciones (Kjeldsen *et al.*, 2005).

No se encontraron cantidades detectables de los metales pesados tóxicos de interés ambiental (cuadro VIII). Esta carencia puede ser atribuida a varias causas. La primera puede estar relacionada con una calidad de lixiviado que particularmente ese día no contenía metales pesados, ya que como se ha visto, la variabilidad de los lixiviados cambia de manera rápida en un mismo sitio y depende en gran medida de los desechos que han sido agregados al lixiviado. La segunda causa, se relaciona con el equilibrio de solubilidad de

los metales pesados en el relleno. Tanto la absorción, como la precipitación, son mecanismos significativos que influyen en la inmovilización de metales y disminuyen la concentración de metales en los lixiviados (Kjeldsen *et al.*, 2005).

La formación de especies como sulfuros (presentes principalmente en condiciones pobres de oxígeno), además de otros aniones altamente insolubles como los carbonatos, pueden causar la precipitación de metales como cadmio, cobre, níquel, plomo y zinc (Kjeldsen *et al.*, 2005). Otros metales, como el cromo, forman precipitados insolubles de hidróxidos a condiciones de pH altos, aunque con un valor de pH tan cercano al neutro este pareciera no ser el caso. Sin embargo, la formación de todas estas especies insolubles es discutible, dado que la gran cantidad de materia orgánica presente en un lixiviado debería en gran medida proporcionar especies orgánicas que funcionen como agentes quelantes y que favorezcan de esta forma la solubilidad de gran cantidad de metales en disolución, facilitando la movilidad de estos. En contraste a lo anterior, autores como Ogundiran (Ogundiran & Afolabi, 2008) apuntan a que la formación de estas especies quelantes se da siempre y cuando las condiciones anaeróbicas no sean favorables, contrario a lo que sucede en la caracterización realizada para oxígeno disuelto (cuadro VIII).

Por otro lado, la composición química de los lixiviados responde a numerosos factores climáticos, como la temperatura, así como a factores geológicos. Sin embargo, la mayor variación en la calidad de lixiviado y de la composición de contaminantes presentes responde principalmente a la cantidad de volumen de agua que se infiltra dentro del relleno, así como a los procesos naturales que ocurren dentro de él y que se ven afectados por las condiciones climáticas (Kalcíková *et al.*, 2011). Así, durante intervalos cortos de tiempo, sobretudo en latitudes con grandes variaciones climáticas, la calidad de los lixiviados puede variar significativamente, lo que hace necesario que ellos se deban caracterizar al momento en que se vaya a dar su tratamiento (Salem *et al.*, 2008).

Kalcíková demostró que la variabilidad de los lixiviados responde a factores climáticos, los cuales son dependientes de la época del año en que se disponen los residuos. Por ejemplo, la descomposición de los residuos se ve afectada por la temperatura, siendo

las temperaturas altas las que favorecen los procesos de descomposición (principalmente durante los veranos). En meses durante los que hay grandes precipitaciones, los lixiviados pueden ser diluidos, aumentando su cantidad a la vez que se disminuye la carga contaminante (Kalcíková *et al.*, 2011). Al haberse realizado el muestreo en un día cercano a la estación lluviosa, este podría haber sido el caso.

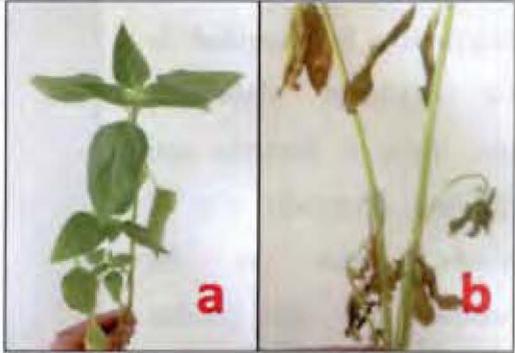
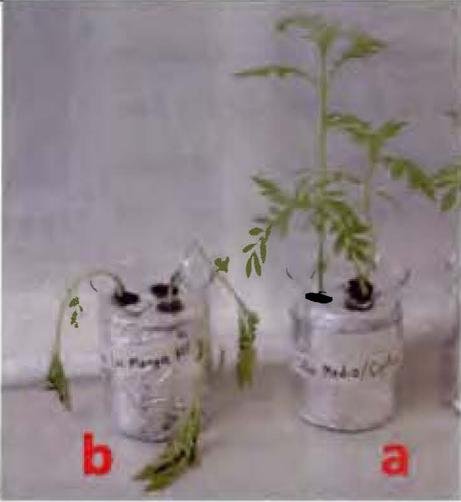
4.3 Pruebas preliminares de toxicidad del lixiviado en plantas

Tanto para el girasol como para el marigold, se realizaron pruebas en las cuales tras germinarlos en un sustrato comercial y mantenerlos en hidroponía por 8 semanas, ellos fueron expuestos al lixiviado utilizado a diferentes concentraciones para medir su resistencia al medio. El cuadro X muestra los resultados tras una semana de aplicación, renovando el medio cada 48 horas. Para esta prueba, el lixiviado fue autoclavado para evitar que cualquier microorganismo presente afectara el resultado del experimento.

Como puede verse en el cuadro, los tratamientos preliminares utilizados para las plantas de girasol y de marigold muestran claramente que las plantas no resisten concentraciones bajas de lixiviado. Las plantas marcadas con (a) representan los controles, mientras que las plantas marcadas con (b) representan la planta con el tratamiento de lixiviado. Para ambas especies, es posible ver que a bajas concentraciones se muestran síntomas de toxicidad.

La razón de esto podría estar asociada a una pérdida de turgencia por parte de las dos especies utilizadas, atribuida probablemente a la gran cantidad de solutos no volátiles presentes en los lixiviados, los que causan que haya migración de agua de la planta al medio por ósmosis, con la consecuente disminución de potencial de presión del agua presente en las vacuolas.

Cuadro X. Resultados para la exposición de girasol (*Helianthus annuus*) y marigold (*Tagetes erecta*) a lixiviado tras una semana de aplicación. Los individuos nombrados “a” corresponden a blancos.

Planta utilizada	Concentración del lixiviado (% v/v)	Resultados
Girasol	20	
Marigold	10	

Por lo anterior, se hizo necesaria la búsqueda de otra planta que lograra soportar niveles mayores de lixiviado, a la vez que absorbiera metales pesados de medios contaminados con estos. Se seleccionó el frijol de gandul (*Cajanus cajan*) como planta candidata para realizar ensayos preliminares. La escogencia del gandul se realizó con base en reportes de acumulación de metales encontrados en la literatura, mismos que fueron citados anteriormente. La figura 13 muestra una vista superior de los resultados de exposición del gandul a un medio conteniendo 10 y 20 % v/v de lixivios, tras dos semanas de aplicación. Resultados similares se obtuvieron para pruebas realizadas con medios conteniendo 40 e inclusive 60 % v/v de lixiviado. Para estas pruebas el lixiviado también fue autoclavado.

La razón de autoclavar el lixiviado a 130 °C en cada uno de los ensayos realizados, corresponde a la necesidad de quitar cualquier clase de hongo, virus o bacteria que pueda ser acarreado con el lixiviado, pues se ha demostrado que ellos pueden existir inclusive en altas concentraciones de lixiviados (Ponce & Romero, 2002). Los microorganismos podrían causar interferencia en los ensayos realizados con las plantas, con la aparición



Figura 13. Exposición de *Cajanus cajan* a un medio con lixiviado de un relleno sanitario al 10 y 20 % v/v por dos semanas de aplicación. Se muestra el control y ambos tratamientos.

consecuente de síntomas de toxicidad que correspondan a la invasión de estos microorganismos en la planta y no a la composición química de los lixiviados. Por otro lado, la presencia de microorganismos, también podría afectar el resultado del experimento, ya que ellos pueden degradar materia orgánica o inclusive producir compuestos que puedan quelatar los metales. Sin embargo, hay que reconocer que realizar el paso de autoclavado representa una limitante en el trabajo realizado, ya que por un lado el someter el lixiviado a temperaturas tan altas podría volatilizar gran parte del amoníaco presente, a la vez que podría modificar las estructuras de ciertos componentes susceptibles (proteínas principalmente). Además, en miras a la implementación en campo, una operación de autoclavado sería muy poco rentable.

La aplicación exitosa de lixiviado a concentraciones tan altas como son el 60 % v/v en hidroponía demostró que, como se indica en la literatura, esta especie resiste condiciones significativas de salinidad, grandes variaciones en el pH, además de una excesiva

aplicación de nutrientes (Cedano, 2006). Una vez conocida la resistencia del gandul a medios con altas concentraciones en lixiviados, se realizó una prueba cuantitativa para medir la cantidad de metales pesados que tomaba la planta de medios enriquecidos con 5 y 10 mg/kg de cadmio, cobre, cromo, níquel y plomo, cada ensayo por aparte. Los ensayos se realizaron durante 16 días, renovando la concentración de metales cada dos días y agitando el medio para oxigenación diariamente. Al tratarse de una prueba preliminar en la que se pretendía comparar la respuesta de la planta ante los metales en estudio, todas las pruebas fueron realizadas con el mismo número de ensayos y bajo las mismas condiciones de humedad, temperatura y luz. Igualmente, se contó con blancos, para comparar la respuesta fenotípica de las plantas ante la exposición a los metales.

Las únicas plantas que no sobrevivieron fueron las utilizadas en el ensayo con cadmio, las cuales mostraron síntomas graves de toxicidad al metal desde la primera semana del ensayo. La figura 14 muestra una comparación de las plantas control con las plantas con metales al penúltimo día de la prueba (día 15). Nótese que aunque hay evidencia de clorosis en algunos casos, la mayoría de las plantas (con excepción de las expuestas a cadmio) se encuentran en buen estado. Estas pruebas se realizaron por duplicado para corroborar los resultados. Las fotografías corresponden al segundo ensayo realizado.



Figura 14. Comparación entre los tratamientos realizados al gandul utilizando diferentes metales pesados al penúltimo día del ensayo. Para cobre, cromo, níquel y plomo se muestra el orden “control, metal a 5 mg L⁻¹ (ppm) y metal a 10 mg L⁻¹ (ppm)” de izquierda a derecha, mientras que para cadmio únicamente se muestra las plantas afectadas a los 8 días del ensayo. Además aparece el control en comparación con un ensayo conteniendo agua sin medio hidropónico, en orden “control, agua” de izquierda a derecha.

Posteriormente, se realizó la cuantificación de los metales pesados absorbidos por las plantas de este ensayo (cuadro XI). Se utilizaron diferentes muestras control para los metales de cromo y plomo y para el cobre y el níquel, debido a que en ambos casos se utilizaron medios hidropónicos preparados en diferentes momentos. Sin embargo, en los cuatro casos el control utilizado dio no detectable la presencia de metales.

Cuadro XI. Resultados de absorción de metales en *Cajanus cajan* tras la exposición de la planta a diferentes concentraciones.

Cr (mg/kg)		Pb (mg/kg)		Cu (mg/kg)		Ni (mg/kg)	
5	10	5	10	5	10	5	10
360 ± 50	1000 ± 100	1140 ± 40	1600 ± 100	1340 ± 30	3400 ± 100	350 ± 40	460 ± 40

Los límites de detección de las determinaciones para estos metales son: cobre 0,1 mg L⁻¹, cromo 2 mg L⁻¹, níquel 0,9 mg L⁻¹ y plomo 0,3 mg L⁻¹.

De las pruebas realizadas, se puede notar que los metales que son absorbidos en mayor cantidad por el gandul son el cobre y el plomo, mientras que el cromo y el níquel son absorbidos en cantidades menores (cuadro XI). Además, el hecho de que se duplique la concentración de metal en el medio no necesariamente significó que la cantidad absorbida por las plantas fuera el doble. Ello se debe a diferentes factores que regulan la absorción de metales en agua que se verán más adelante.

Con los resultados obtenidos de este último ensayo y el realizado para la determinación de la resistencia del gandul a diferentes concentraciones de lixiviados se definió realizar ensayos con concentraciones de lixiviado de 25 % y 30 % en agua y tierra respectivamente, utilizando el cromo y el plomo como metales a remediar. La escogencia de cromo y plomo como metales para este ensayo se basó en que para ambos casos se encuentran absorciones significativas del metal (hasta 1000 mg kg⁻¹ para cromo y hasta 1600 mg kg⁻¹ para plomo), además de que estos dos metales son considerados más tóxicos para el ambiente en relación con el cobre y el níquel. Removerlos significaría una mayor repercusión sobre la remediación de un ambiente contaminado.

4.4 Cinética de la remoción de cromo y plomo de un medio acuoso

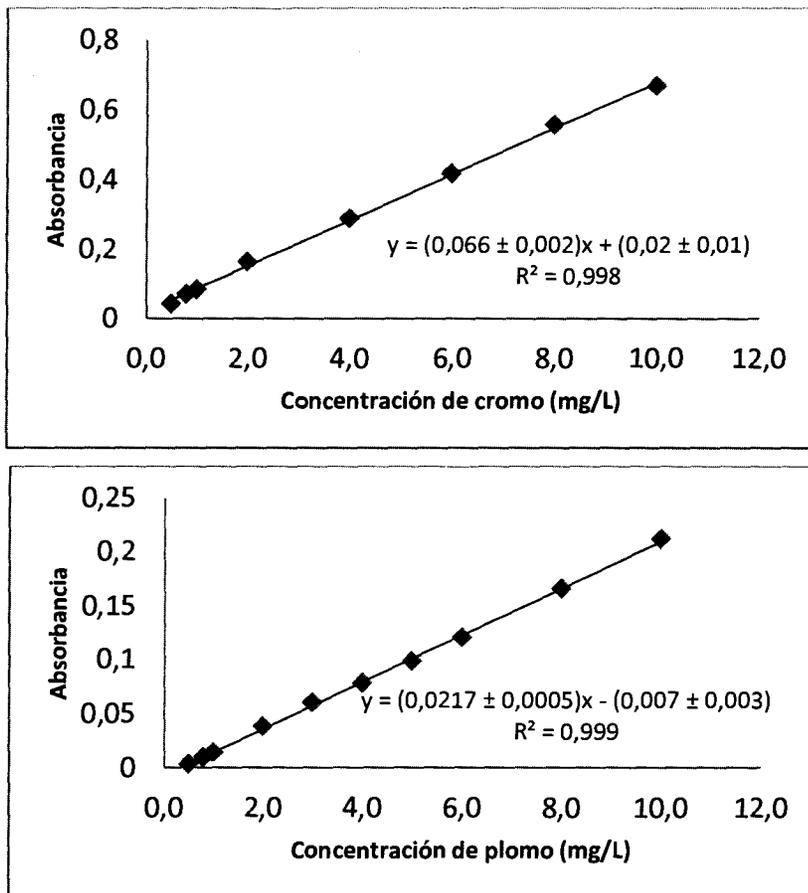
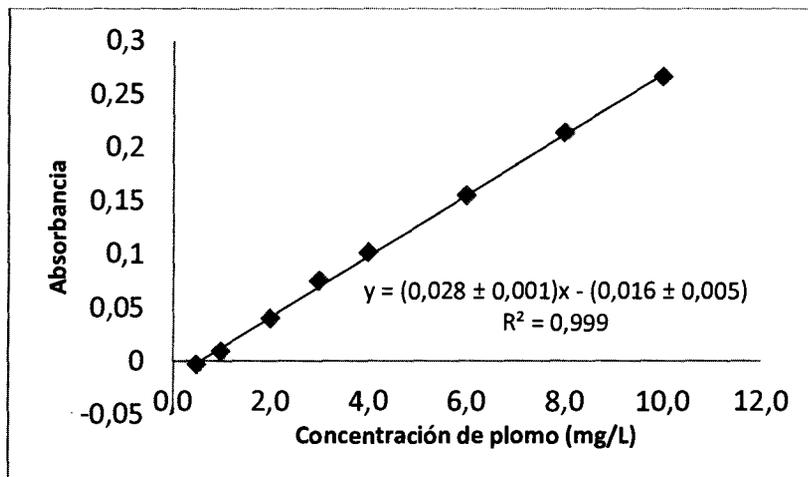
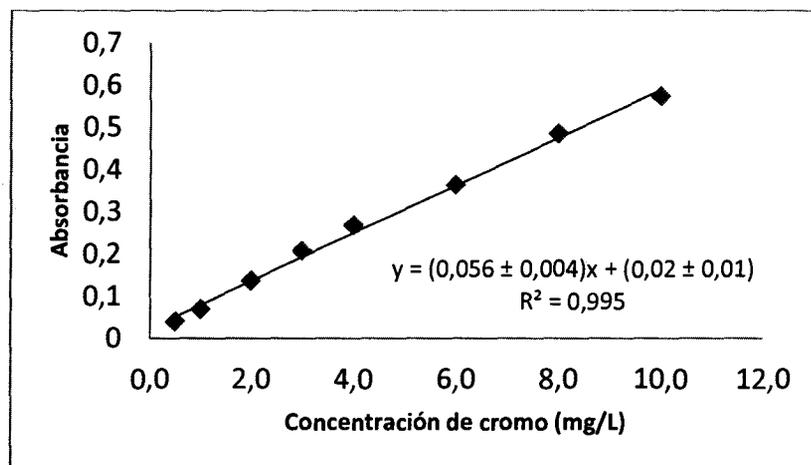


Figura 15. Curvas de cuantificación utilizadas en la determinación de metales pesados en el ensayos de hidroponía #1. Se muestra la curva de cuantificación para cromo (arriba) y la curva de cuantificación para plomo (abajo).

La figura 15 muestra la curva de cuantificación de plomo y cromo para el primer ensayo. Por cuestiones de tiempo, estos ensayos fueron realizados por aparte de los sistemas 2 y 3, siendo estos últimos cuantificados con las curvas mostradas en la figura 16. La construcción de estas curvas, tanto las de la figura 15 como las de la figura 16 se realizó para el caso del cromo, utilizando $K_2Cr_2O_7$ (99,9% de Aldrich) y

para plomo, un patrón primario de este de 1000 mg de metal como forma de $Pb(NO_3)_2$ en agua (Titrisol®). El error para la cuantificación de los patrones asociado a la curva, es calculado para estas por el análisis de incertidumbres dado por Miller & Miller (Miller & Miller, 1989) según se muestra en el Anexo 4.

Nótese que para todas estas curvas utilizadas para la cuantificación de metales (ver figuras 15 y 16), se obtienen coeficientes de correlación relativamente altos, algo que por lo general se espera que suceda en los ensayos por espectroscopía de absorción atómica,



especialmente a bajas concentraciones. A su vez, estos indican la existencia de una correlación lineal significativa, misma que se puede emplear para cuantificar por interpolación de los valores de absorbancia con un bajo error asociado. A su vez, el cuadro XII muestra los límites de detección y de cuantificación para los metales en las curvas realizadas. Cada una de las mediciones realizadas se encuentra muy por encima de los valores

Figura 16. Curvas de cuantificación utilizadas en la determinación de metales pesados en los ensayos de hidroponía #2 y 3. Se muestra la curva de cuantificación para cromo (arriba) y la curva de cuantificación para plomo (abajo).

de ambos límites. La muestra de cálculos utilizada para la determinación de los límites se encuentra en el anexo 4.

La figura 17 muestra los resultados para la cuantificación del cromo en cada uno de los sistemas, mostrando la concentración determinada en función del día que se toma la muestra. La misma representación se realiza en la figura 18, en este caso para el plomo. Tanto para el cromo como para el plomo, se ve una diferencia significativa en la cantidad

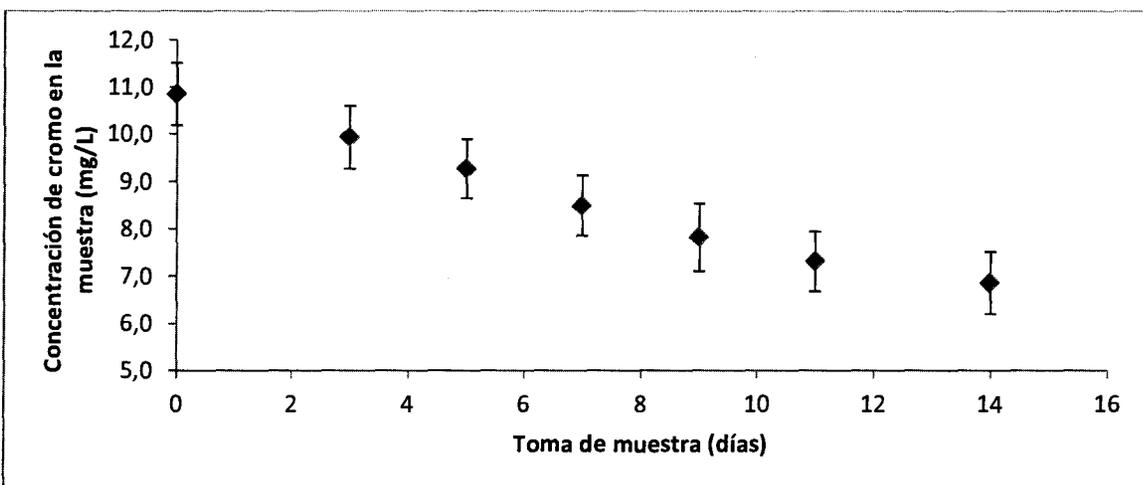
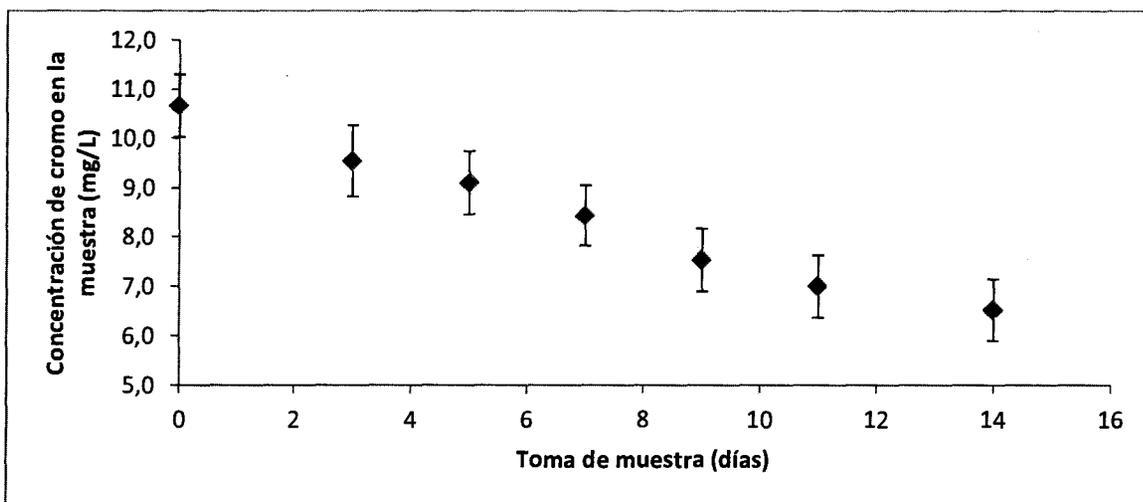
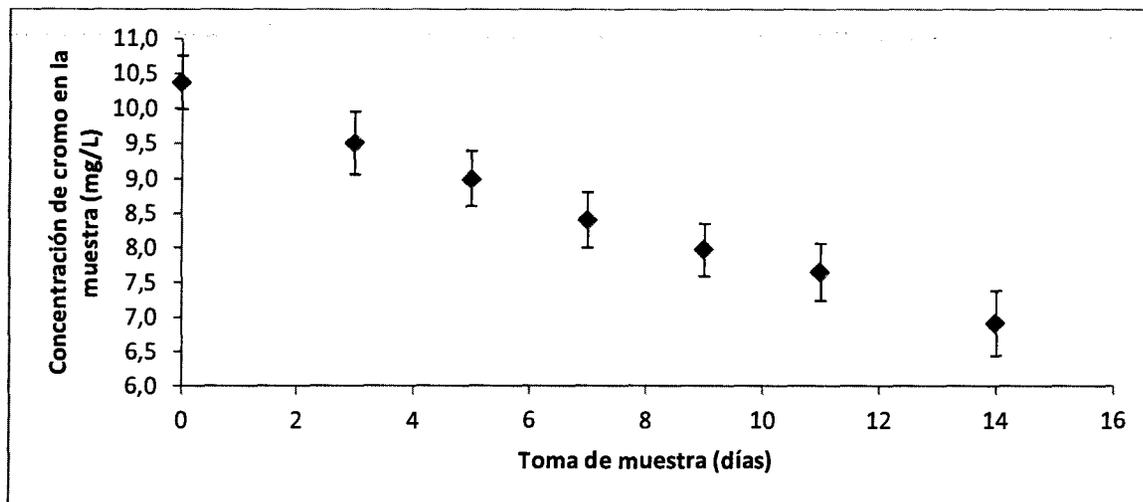


Figura 17. Resultados para la cuantificación de cromo en cada uno de los ensayos hidropónicos realizados. Se muestran los tres ensayos analizados, siendo el ensayo #1 el que aparece en la parte superior, el ensayo #2 en el medio y el #3 en la parte inferior de la figura. La muestra corresponde al medio acuoso preparado en el punto 3.3.1.

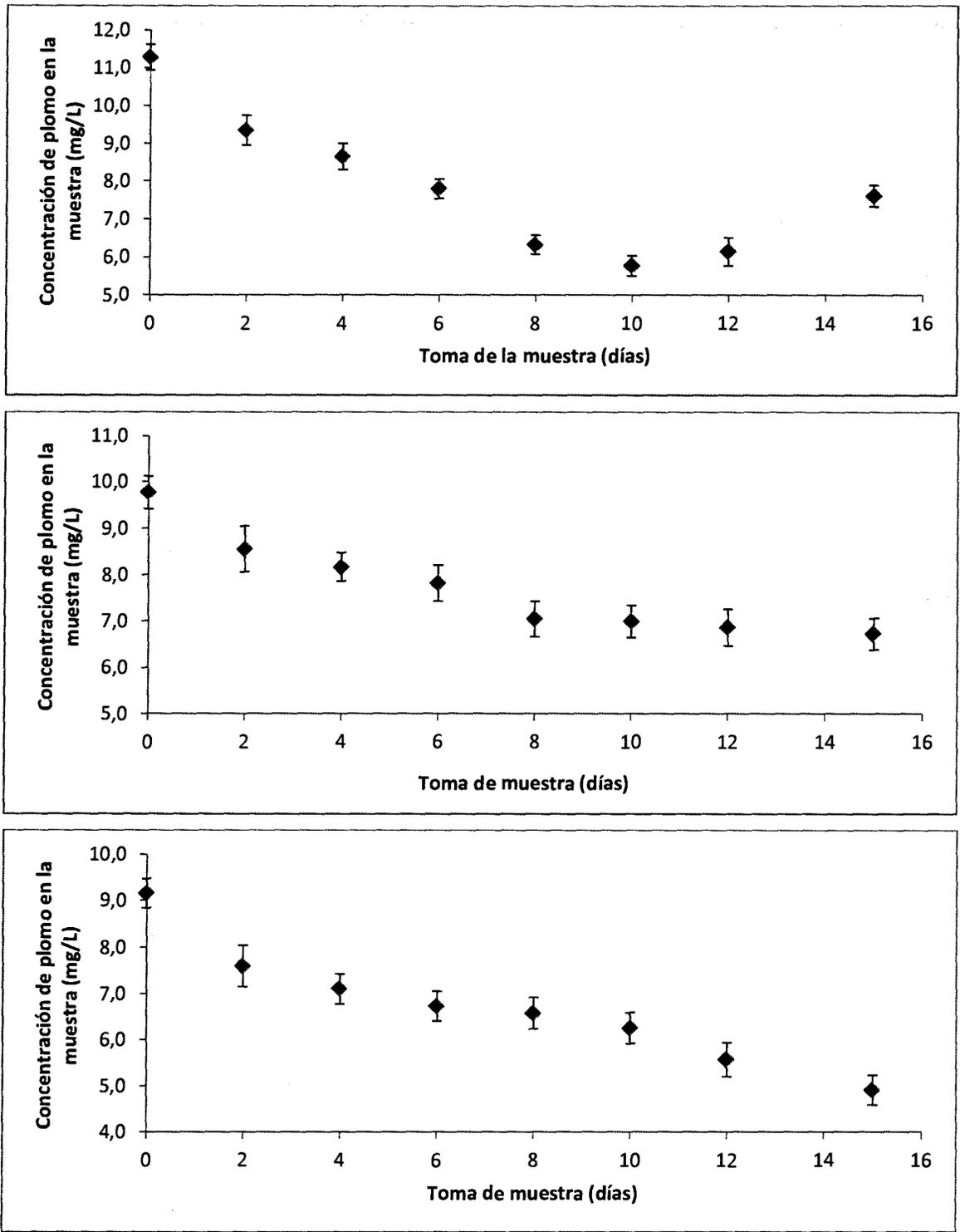


Figura 18. Resultados para la cuantificación de plomo en cada uno de los ensayos hidropónicos realizados. Se muestran los tres ensayos analizados, siendo el ensayo #1 el que aparece en la parte superior, el ensayo #2 en el medio y el #3 en la parte inferior de la figura. La muestra corresponde al medio acuoso preparado en el punto 3.3.1.

El cuadro XIII muestra el porcentaje de metales que es absorbido en los ensayos, su promedio y el coeficiente de variación calculado para los tres experimentos realizados. La alta variabilidad que se observa entre los sistemas, evidente por el valor del coeficiente de variación, probablemente se puede atribuir a la variabilidad poblacional de las propias muestras, así como aspectos externos de la planta como por ejemplo presencia de micorrizas o asociaciones simbióticas (Navarro *et al.*, 2007). Dada esta alta variabilidad, los datos son reportados como un ámbito en el porcentaje de metal absorbido por las especies en los tres ensayos.

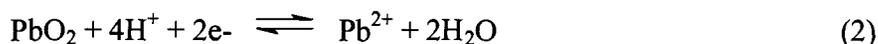
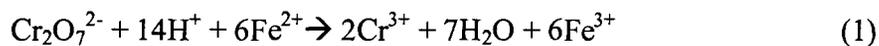
Cuadro XIII. Porcentaje de metales que se disminuye en cada uno de los ensayos de absorción de metales en hidroponía.

Metal en estudio	Porcentaje de absorción	Promedio	Coefficiente de variación
Cromo	36,6 – 46,0	40,6	12%
Plomo	31,6 – 46,7	37,0	23%

Así como la acumulación de los metales pesados por las plantas depende de factores intrínsecos a la planta, otros factores propios del medio hidropónico pueden igualmente modificar las capacidades de absorción. Numerosos investigadores han utilizado la hidroponía como un medio disponible para estudiar de manera sencilla el potencial de absorción que tienen las plantas por determinados metales pesados, así como bioensayos de toxicidad para evaluar el riesgo que representan para la planta (Iannacone & Alvaríño, 2005). Los contaminantes están más disponibles y tienen mayor movilidad en medios líquidos que en medios sólidos. Sin embargo, factores como los aniones presentes, presencia de incrustaciones, pH del medio, salinidad, la temperatura y la cantidad de oxígeno, pueden causar diferencias significativas en la cantidad de metal que esté disponible aún en medio líquido, modificando la capacidad de absorción por parte de las plantas.

Por otro lado, la especie química que forma el metal en disolución también debe considerarse, y la posibilidad que tiene la planta de acumularlo en la forma que se presenta. Aunque se espera que los metales se encuentren quelatados por la carga orgánica del medio, ellos reaccionan en el medio de acuerdo a las condiciones que se tienen. El cromo,

que ha sido introducido al medio como Cr(VI) en una sal de $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, puede reaccionar para reducirse a Cr(III), especialmente en medios ácidos y que contengan Fe(II) (reacción 1). El plomo por su parte que ha sido introducido como Pb(II), existe en el medio en forma de este o de Pb(IV) de acuerdo al pH de la disolución (reacción 2), favoreciéndose la especie reducida a condiciones ácidas (Housecroft & Sharpe, 2005).



Este tipo de transformación química de las especies en el medio podría favorecer o bien, perjudicar la biodisponibilidad del metal a las especies vegetales, cambiando así considerablemente su absorción por las plantas utilizadas, lo que modificaría la eficacia de la remoción. Dado que, como se menciona en el punto 3.3.1, ambos ensayos fueron llevados a un pH de 6 durante la preparación del medio hidropónico con lixiviado (el cual fue ajustado con HNO_3), se espera que durante la absorción de los metales por las plantas el cromo y el plomo estén disponibles (solubles en el medio), y se encuentren en un estado de oxidación de +3 y +2 respectivamente.

La figura 19 muestra tanto las plantas expuestas al plomo como al cromo el último día del ensayo. En el caso del experimento con plomo, las plantas no presentaron síntomas de toxicidad evidente, mientras que en el de cromo, las hojas inferiores de las plantas empezaron a ponerse amarillas. Lo anterior, podría deberse a la capacidad del cromo de acumularse tanto en las raíces, como en las hojas inferiores de las plantas, las cuales podrían actuar como sumideros de este. Este comportamiento se ha visto en algunas especies de la misma familia del *Cajanus cajan*, como *Phaseolus vulgaris*, donde el cromo acumulado interfiere actuando principalmente sobre el fósforo y el hierro en esta especie, causando clorosis en las hojas (Gunsé, 1987). Este podría ser el caso de la especie utilizada, aunque falta evidencia experimental para concluir el efecto del cromo sobre esta variedad de frijol.



Figura 19. Comparación fenotípica entre los ensayos realizados en agua con metales pesados al día #16. En ambos casos se presenta a la derecha el medio de control, y a la izquierda el medio con el metal en estudio. Se muestra el resultado con cromo (arriba) y el resultado con plomo (abajo).

4.5 Cinética de la remoción de cromo y plomo en tierra

La figura 20 muestra la curva utilizada para la cuantificación de cromo y la cuantificación de plomo en tierra. Al igual que para el caso de las curvas utilizadas para la cuantificación en los sistemas hidropónicos, se utilizó $K_2Cr_2O_7$ y el patrón primario de plomo para la preparación de las curvas. El error se determinó con base en el tratamiento recomendado por Miller (Miller & Miller, 1989).

Se obtuvo un límite de detección de 0,08 mg/L, y un límite de cuantificación de 0,27 mg/L para el análisis relacionado al cromo, y en el caso del plomo, los límites de detección y de cuantificación correspondieron a un valor de 0,14 mg/L y 0,48 mg/L, respectivamente. Todas las muestras analizadas se encuentran muy por encima del valor de

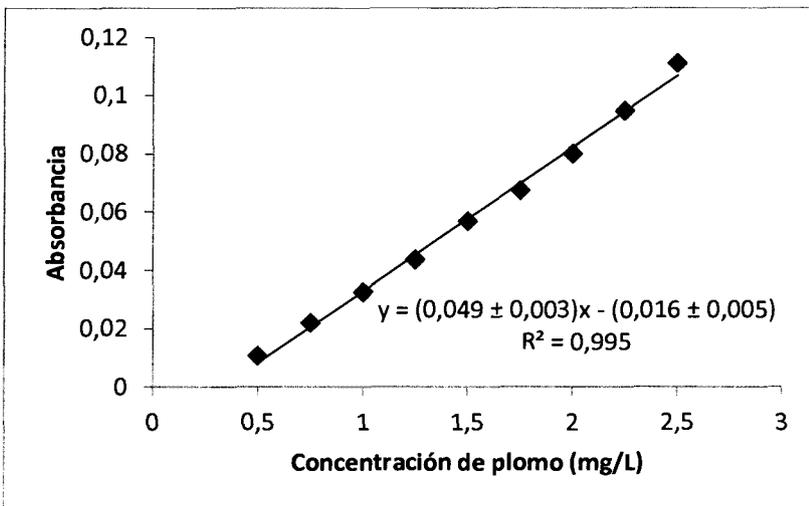
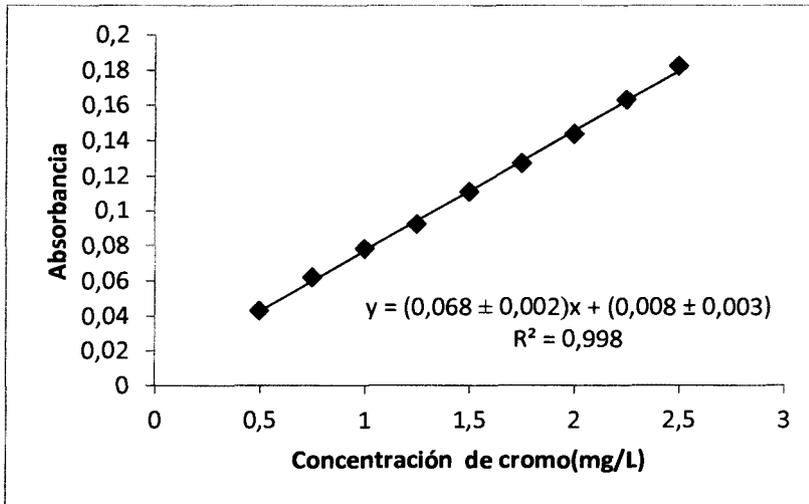


Figura 20. Curvas utilizadas para la cuantificación de cromo (arriba) y plomo (abajo), para la determinación de estos metales en tierra.

estos límites. Estas curvas de calibración fueron también utilizadas en la determinación de metales pesados en diferentes partes de la planta (ver punto 4.6), siendo igualmente mayor la señal para todas las muestras analizadas que los límites calculados en cada caso.

Obsérvese además, que igual como ocurrió con las curvas de cuantificación utilizadas para los ensayos en hidroponía, se obtuvo

una buena correlación para estas curvas. La cuantificación de los metales en tierra se realizó mediante la calcinación y digestión de muestras recolectadas en cada uno de los puntos, utilizando el procedimiento establecido previamente (Punto 3.5.3). La figura 21 muestra los resultados para la determinación de cromo y plomo en tierras en función de los días en que se toma la muestra.

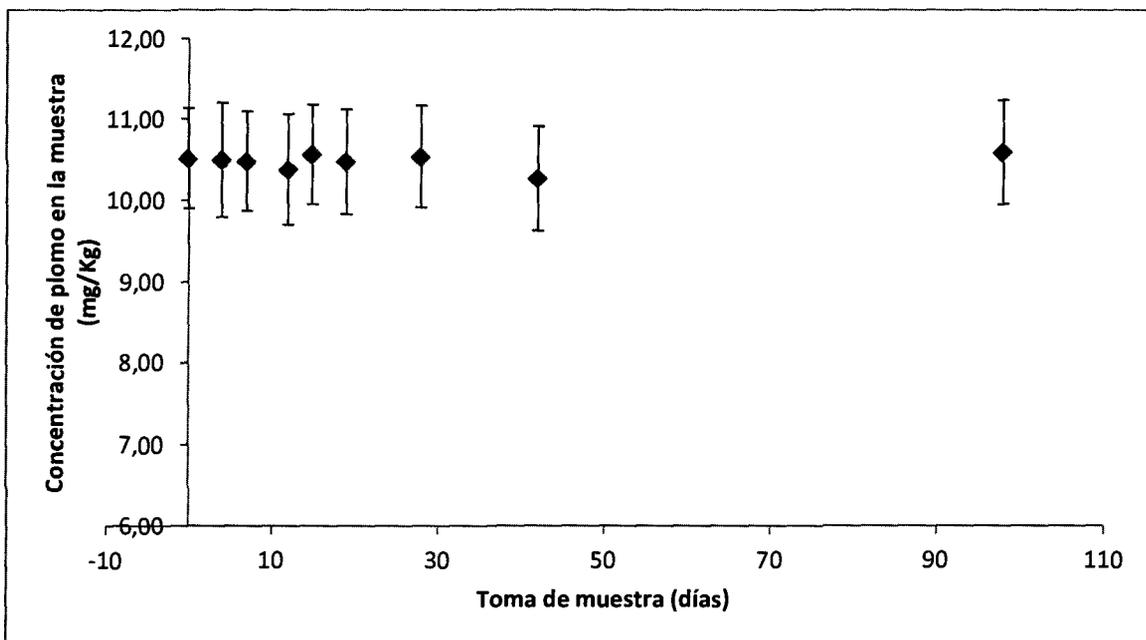
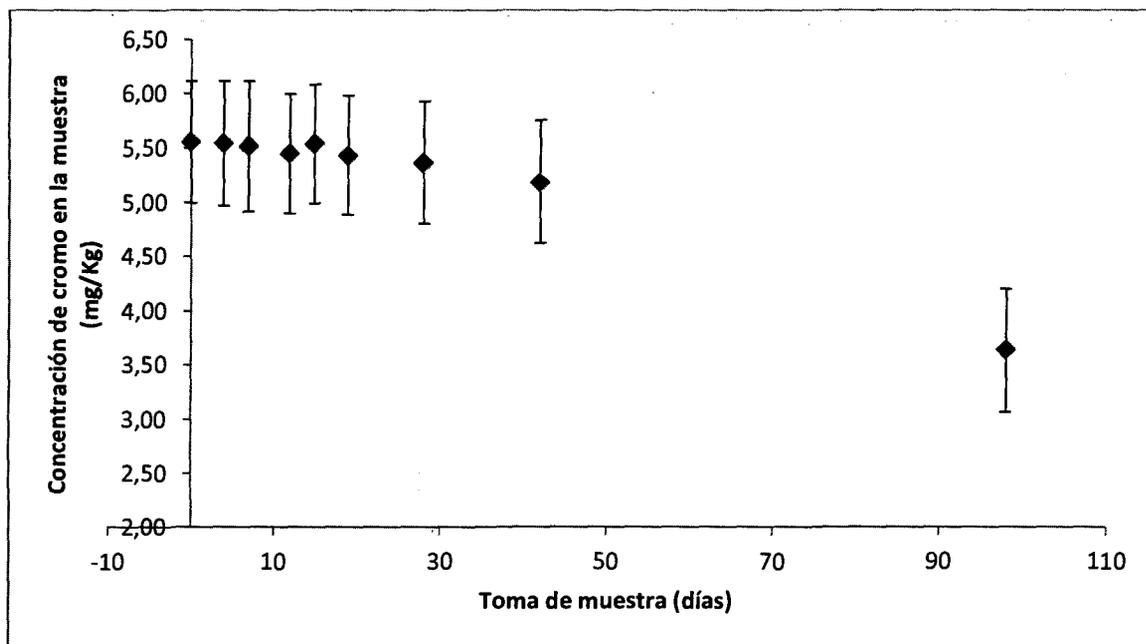


Figura 21. Resultados para la determinación de metales pesados en suelos en función de los días de toma de muestra. Se muestra el gráfico con cromo (arriba) y el gráfico con plomo (abajo). Las muestras se tratan de suelo, preparado según el punto 3.3.2.

Como se puede observar en los dos gráficos (ver figura 21 superior e inferior), a diferencia de los ensayos realizados en agua donde desde el primer día se ve disminución en la concentración de metales respecto al día cero, la concentración de los metales en la tierra se mantiene constante durante la mayor parte del ensayo. Para ambos ensayos en

tierra, se utilizó como punto inicial de la curva una concentración determinada en el día cero, misma que representa la concentración de metales pesados que se encontraban en la tierra utilizada antes de que fuera expuesta a las plantas utilizadas.

Una vez iniciado el ensayo, la toma de muestras se realizó cada dos días, y posteriormente se aumentaron los intervalos de tiempo en la recolecta. Como se puede apreciar la última de las tomas de muestra (punto 9 de ambas curvas) se realizó en el día 98, con una distancia de 56 días entre el último y el penúltimo muestreo. La razón de esto se debe a que se deseaba conocer si al pasar bastante tiempo, había alguna disminución significativa en la cantidad de metal absorbido. Como puede verse, en el caso del cromo la concentración se mantiene constante durante los primeros 42 días del ensayo, mientras que al día 98 se encuentra con una disminución significativa del metal en el suelo (disminución del 34,7%). En el caso del plomo se obtuvieron resultados menos favorables, ya que tanto a los primeros 40 días como en el punto al día 98, no se observa disminución significativa en la concentración de este metal dentro del suelo analizado.

Los resultados parecen indicar dos cosas. La primera, que tanto el cromo como el plomo son metales que una vez en el suelo no están tan accesibles, por lo que se necesita un tiempo considerable para que las raíces de la planta crezcan en la superficie hasta invadir los espacios contaminados con estos metales, o bien, que estos metales puedan irse movilizandose lentamente hasta llegar a las raíces de la planta. La segunda, es que el cromo es un elemento con mayor movilidad que el plomo, ya que a pesar de que durante los primeros 40 días del ensayo la cantidad de ambos metales no varió mucho, al día 98 la concentración del cromo disminuyó considerablemente en relación con la del plomo, cuya concentración permaneció aún constante.

Para comprender los resultados de remediación obtenidos en tierra, se hace necesario recurrir a los postulados que explican la disponibilidad de los metales y los nutrientes en tierra para la absorción de las plantas. La concentración total de los metales en la tierra no es un parámetro exacto para predecir la disponibilidad o bien, la labilidad química que tienen los diferentes contaminantes dentro de la tierra para ser tomados por las

plantas (Almendras *et al.*, 2009). De esta forma, es imposible generalizar que exista una correlación entre la cantidad de contaminante en los suelos y el impacto toxicológico que tenga sobre la biota terrestre.

Los fenómenos y los factores químicos que regulan la disponibilidad de los nutrientes son múltiples. Además, entre diferentes suelos (con diferente composición física y química), no es posible realizar generalizaciones de la disponibilidad de un elemento en específico (Almendras *et al.*, 2009). Dado lo anterior, el estudio de estos fenómenos debe ser realizado de forma independiente para cada suelo, y aún más, para cada contaminante. Lo que regula en mayor medida la disponibilidad que tienen los metales pesados de ser tomados por las plantas es la movilidad que tengan estos en la interfaz tierra – disolución que se establece en los suelos, la cual depende mayoritariamente de la especie química, así como de las condiciones fisicoquímicas del suelo utilizado (Almendras *et al.*, 2009).

En la interfaz tierra – disolución, los metales están presentes como iones libres o bien, como especies adsorbidas. La capacidad del suelo de retener o liberar estos metales a la disolución es el factor más importante en la disponibilidad de ellos, ya que estos deben estar en disolución para poder ser transportados por el agua a los diferentes puntos del medio que estén al alcance de las raíces de la planta. Esta capacidad del suelo, es regulada por procesos químicos de adsorción y desorción, por procesos de precipitación y disolución, así como por reacciones de formación de complejos (Azevedo *et al.*, 2003). La mayor parte de estos procesos son de naturaleza química, y por lo tanto, son regulados por factores como el pH del medio, potencial redox, composición química del suelo y presencia de materia orgánica, entre otros (Almendras *et al.*, 2009).

Las fracciones inorgánicas u orgánicas del suelo, poseen cargas electrostáticas en su superficie y ellas pueden ser grandes, y lo son particularmente en la arcilla y la materia orgánica (Fassbender & Bornemisza, 1987). Los grupos involucrados en las reacciones de adsorción del suelo corresponden a aquellos que complejan metales, que en el caso de suelos altos en silicato son los grupos hidroxilo, en los altamente arcillosos los óxidos y en

aquellos que contienen altas cantidades de materia orgánica, los grupos carboxilos, aminos y fenólicos (Azevedo *et al.*, 2003).

Las fuerzas involucradas en los fenómenos de adsorción de metales pesados en los suelos pueden ser de naturaleza química (formación de complejos), o bien física (intercambio de iones con los suelos). Para los diferentes metales en su estado como catión, la afinidad de los suelos por ellos aumenta conforme aumenta la carga de los iones, o bien, disminuye con el aumento de su radio iónico. Otros factores, como la carga superficial, el pH del medio, la concentración de los metales y los aniones acompañantes, pueden igualmente afectar la adsorción de los metales (Azevedo *et al.*, 2003).

Se ha visto igualmente que suelos con alto contenido en óxidos de hierro y aluminio (suelos arcillosos), ejercen un efecto positivo en la adsorción de metales a suelos (Azevedo *et al.*, 2003). Este puede ser el caso del suelo utilizado en el ensayo realizado, ya que se contó con una tierra con un contenido importante en arcilla, lo que podría haber disminuido la movilidad de los metales, limitando así su disponibilidad. De igual forma, el pH del suelo podría haber afectado, ya que la disponibilidad de los metales es relativamente baja cuando el pH es cercano a su valor neutro (Azevedo *et al.*, 2003), y las disoluciones utilizadas para la preparación de la tierra fueron llevadas a un pH de 6.

Por otro lado, el contenido en materia orgánica puede fijar los metales a las estructuras orgánicas del suelo, tales como ácidos húmicos y fúlvicos. Sin embargo, estos complejos orgánicos pueden ser tanto solubles, como sólidos o inmovilizados. La presencia de moléculas orgánicas y algunos iones solubles en la disolución del suelo conllevará a la formación de complejos o quelatos, lo que aumentará la solubilidad total de algunos componentes inorgánicos (Fassbender & Bornemisza, 1987). Sin embargo, la capacidad de estos complejos para poder arrastrar los metales depende del potencial químico con que cuenten para su formación, en relación con muchas otras interacciones que se dan entre los metales con el suelo.

Adelakan y Abegunge (2011), estudiaron la distribución de metales sobre las superficies de suelos, encontrando que la migración de los metales desde la superficie hacia otras fracciones de suelo más profundas (entre los 15 y los 30 cm) está estrechamente relacionada con su movilidad. Así, para diferentes metales estudiados se encontró que en el caso del cromo, este migra fácilmente en comparación con otros metales como cadmio y zinc, y a su vez, estos dos aún migran más en comparación con el plomo. Relaciones como éstas de movilidad de metales en suelos pueden explicar los resultados obtenidos: que el cromo se haya removido más en comparación con el plomo por tener el primero mayor movilidad en el suelo. El cromo podría haberse desplazado desde la superficie hacia el área de contacto con las raíces, siendo finalmente atrapado por estas mediante un proceso de fitoextracción.

La poca movilidad del plomo ha sido un obstáculo a lo largo de los diferentes ensayos de fitorremediación de metales pesados realizados en suelos, aún para los realizados a escala de laboratorio. Inclusive, se ha estudiado la viabilidad de utilizar agentes quelantes como EDTA o HEDTA para incrementar la solubilidad y movilidad de dicho metal tanto en el suelo como dentro de la planta (Chaney *et al.*, 1997; Bailón, 2006). Esta poca movilidad podría inclusive significar una desventaja al momento de realizar la fitorremediación de terrenos grandes contaminados con plomo: una vez que cae al suelo, el plomo se adhiere fuertemente a las partículas del suelo y permanece en la capa superior del suelo (ATSDR, 2007). Lo anterior significa que gran parte de este plomo quedaría atrapado en la superficie sin la posibilidad de migrar hacia abajo, por lo que nunca estaría en contacto con las raíces de las plantas, imposibilitando así que se lleve a cabo el proceso de fitoextracción. Así, el plomo puede permanecer adherido a partículas del suelo o de sedimento durante muchos años (ATSDR, 2007), con un tiempo de retención en el suelo calculado que va desde los 150 hasta los 5000 años (Adelakan & Abegunde, 2011).

La figura 22 muestra las plantas utilizadas en el ensayo en último día del experimento. Como se puede observar, ni las plantas expuestas al cromo ni al plomo mostraron signos de toxicidad. Lo anterior se puede atribuir a que la cantidad de metales que está siendo removida es mínima en el caso del plomo y aún para el cromo, por lo que

en ambos casos se espera que las plantas no exhiban evidencias de toxicidad que sean atribuidas a los metales. Así, la amenaza de toxicidad que representan los metales pesados a los organismos vivos está tanto en función de su



Figura 22. Fotos de ensayo en tierras al día #98. A la derecha se muestra la foto de plantas con cromo, a la izquierda de plantas con plomo, mientras que en el centro se tiene el control.

contenido en los suelos como de su movilidad (Adelakan & Abegunde, 2011), siendo esta última la que determina la disponibilidad de estos contaminantes para entrar en el organismo de los seres vivos.

4.6 Acumulación de los metales en las plantas

Al finalizar cada ensayo hidropónico de absorción de metales, las plantas fueron analizadas para conocer el contenido de cromo o plomo, tanto en su parte aérea como en las raíces. El cuadro XIV muestra el contenido de estos metales en cada parte de las muestras. La cantidad se determinó haciendo uso de las curvas mostradas en la figura 20. El reporte del contenido de metales en las plantas se hizo con base en la masa seca.

Cuadro XIV. Cantidad de cromo y plomo absorbido por plantas de *Cajanus cajan* en medio hidropónico.

Parte de la planta	Contenido en cromo (mg/kg)	Contenido en plomo (mg/kg)
Raíz	607 ± 86	$(2,88 \pm 0,15) \times 10^3$
Parte Aérea	160 ± 17	175 ± 29

Como puede verse en los resultados experimentales analizados, tanto para el cromo como para el plomo la mayor parte del metal acumulado se encuentra en las raíces de las plantas, contrario a lo que ocurre en otras plantas hiperacumuladoras que reubican estos

elementos más eficientemente a las hojas a través del xilema (Rascio & Navari, 2011). En el caso del cromo, del total del metal acumulado un 79,1 % se encuentra en la raíz, mientras que un 20,9 % se encuentra en la parte aérea. Para el plomo, un 94,2 % del metal se encuentra en la raíz, mientras que apenas un 5,8 % del metal se encontró en la parte aérea. A su vez, nótese que los resultados de absorción de plomo en la planta son mucho mayores que los de cromo.

Experimentos similares realizados con lirio acuático (*Eichhornia crassipes*), confirman la validez de los resultados al demostrar que para experimentos realizados en hidroponía con esta especie, las concentraciones más altas de los metales pesados se encuentran en la raíz, en relación con las partes aéreas de las plantas (Cedeño *et al.*, 2008). De igual forma, Blum (1997) demostró que para gran parte de las especies en general, el contenido de los metales pesados disminuye en el orden raíz > tallo > hojas > frutos > semillas. Se ha demostrado también que la movilidad de los metales dentro de la planta está muy relacionada con la función que desempeñan estos en su organismo. Normalmente, los elementos que se consideran esenciales para el crecimiento de la planta (como el zinc) presentan una tendencia mayor de movilizarse hacia las partes aéreas de la planta, tales como las hojas, mientras que aquellos que no tienen función conocida y que fungen como metales tóxicos se suelen acumular en las raíces (Illera *et al.*, 2001). No obstante, no deberían dejarse de lado las diferencias genéticas que existen entre las diferentes especies vegetales, además de la forma como estas presenten tolerancia ante el metal al que son expuestas y la cantidad que absorben en relación a su disposición final (Rascio & Navari, 2011).

4.7 Remoción de nitrógeno amoniacal y nitrógeno nítrico en el ensayo hidropónico

Los blancos utilizados en los ensayos en medio hidropónico consistieron de 15 plantas, las cuales fueron expuestas a un medio hidropónico comercial que contenía lixiviado (figura 23). Dado lo anterior, estas muestras se tomaron para determinar el cambio en la concentración de nitrógeno amoniacal y nitrógeno nítrico en el medio, durante quince días de exposición de las plantas al medio con lixiviado (4 al 19 de junio de 2012).

El cuadro XV muestra el cambio en el contenido de nitrógeno. Como puede verse, la cantidad de nitrógeno presente en la disolución disminuye tanto para el nitrógeno en su forma amoniacal como en forma de nitrógeno nítrico. Nótese que, contrario a la caracterización química inicial realizada para el lixiviado del relleno utilizado, donde predominaba el nitrógeno como amonio (ver cuadro VIII), en ambos puntos de la curva (inicial y



Figura 23. Blanco de curva de remoción de metales en agua, utilizado para realizar la cuantificación de la remoción de nitrógeno amoniacal y nitrógeno nítrico.

final) hay un contenido mayor de nitrógeno nítrico que nitrógeno amoniacal. Lo anterior se debe a que el lixiviado fue agregado únicamente al 25% v/v, y que además el medio hidropónico comercial también contiene nitrógeno.

Cuadro XV. Remoción de nitrógeno amoniacal y nitrógeno nítrico de un medio hidropónico conteniendo lixiviado por parte de *Cajanus cajan* durante 15 días de exposición.

Muestra considerada	N-NH ₄ ⁺ (mgL ⁻¹)	N-NO ₃ ⁻ (mgL ⁻¹)
Muestra día cero	401,1	588,3
Muestra día quince	61,6	174,1

Es posible calcular el nitrógeno total que aportan esas dos especies en la disolución a partir de los datos presentados en el cuadro XV. El nitrógeno presente en el día cero es de 446 mg L⁻¹, mientras que el nitrógeno en el último día del ensayo, luego de 15 días de exposición, es de 87 mg L⁻¹. Lo anterior demuestra que al menos en los ensayos realizados, una gran parte del nitrógeno está siendo removido por la planta, obteniendo de esta forma una reducción de un 80,4 % del nitrógeno total.

La reducción de este porcentaje del nitrógeno total por parte de la especie, en el lapso de 15 días, hace que se considere que la especie podría ser una opción viable para la disminución o la remoción del nitrógeno total, de tal forma que se alcancen niveles máximos permitidos por el Reglamento de Vertido y Reuso de Aguas Residuales, N° 33601-MINAE-S. De acuerdo a la normativa actual, ese nivel no debe ser mayor a 50 mg/L de nitrógeno total para aguas residuales vertidas en un cuerpo receptor (MINAE, 2007).

Las formas iónicas preferentes de absorción de nitrógeno por la raíz son el nitrato y el amonio (Azcon & Talón, 2000), las cuales se encuentran presentes en altas cantidades en el medio en estudio. Inclusive, el *Cajanus cajan* es clasificado con frecuencia como una planta fijadora de nitrógeno, y es utilizado como individuo en la técnica de barrera para la conservación de suelos y conservación de agua (Varichón, 1994). Además, se ha identificado el papel que juega esta especie vegetal en simbiosis con la bacteria *Rhizobium* en la fijación del nitrógeno atmosférico (Neyra, 1995), siendo esta última la responsable de reducirlo a su estado de oxidación -1 presente en el amonio, mediante la enzima nitrogenasa. Posteriormente, este amonio es incorporado a los esqueletos carbonados para la producción de aminoácidos (Taiz y Zeiger, 2006).

Luego de ser absorbido, el nitrógeno llega a formar parte de tres grupos de compuestos dentro de la planta: la mayor parte en compuestos de elevado peso molecular, tales como proteínas y ácidos nucleicos, mientras que el resto se encuentra tanto como nitrógeno orgánico soluble (aminoácidos, péptidos, amidas y aminas) y nitrógeno inorgánico (iones nitrato y amonio) (Azcon & Talón, 2000). En una planta seca, el contenido de nitrógeno oscila entre el (1,5 – 5) % m/m, dependiendo de la especie.

El nitrógeno dentro de la planta desempeña funciones metabólicas muy importantes. Su asimilación requiere de varios procesos químicos que conllevan un alto costo energético (figura 24). La especie más común de absorción del nitrógeno es en forma del ión nitrato (NO_3^-), que por medio de la enzima nitrato reductasa es posteriormente reducido a nitrito (NO_2^-), un ión que es altamente tóxico y que por ello debe ser rápidamente transformado a otra especie química diferente. Posteriormente, este último es llevado a los cloroplastos de

las hojas y a los plástidos de las raíces donde es reducido a nitrógeno amoniacal (NH_4^+) por medio de la enzima nitrato reductasa (Pereyra, 2001). Estos

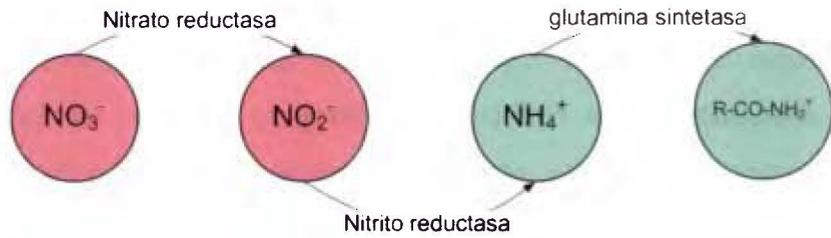


Figura 24. Conversión de nitrógeno inorgánico (nitrato) en nitrógeno orgánico (aminoácidos).

dos procesos de reducción y la posterior conversión del amonio al grupo amida de la glutamina, demandan una cantidad relativamente significativa de energía en forma de ATP, siendo esta de 12 ATP por átomo de nitrógeno (Taiz & Zeiger, 2006).

Así, una vez que el nitrógeno se encuentra en forma de amonio (NH_4^+), este se incorpora en los esqueletos de carbono para la formación de aminoácidos. El primer paso de la reacción combina el ión amonio con el glutamato (un anión de un aminoácido no esencial) para la formación de glutamina, reacción metabólica compleja en la cual intervienen numerosos cationes divalentes como Mg^{2+} , Mn^{2+} o Co^{2+} (figura 25) (Pereyra, 2001). Una vez que el nitrógeno ha sido asimilado en la glutamina y el glutamato, éste es incorporado en otros aminoácidos mediante reacciones de transaminación, haciendo uso de las enzimas aminotransferasas.

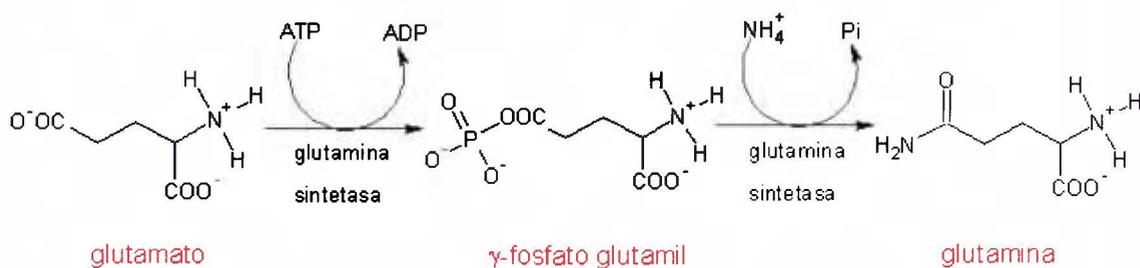


Figura 25. Reacción del glutamato con el amonio (NH_4^+) para la síntesis de glutamina.

Los síntomas de deficiencia de nitrógeno en plantas incluyen clorosis (hojas amarillas carentes de clorofila), acumulación de antocianinas que se manifiesta en forma de coloración púrpura, así como caída de hojas. Por lo contrario, los excesos pueden manifestarse por un crecimiento acelerado de biomasa con una mala calidad en el

desarrollo de la estructura de la planta, así como bajos rendimientos en frutos, floración y apareamiento de semillas (Azcon & Talón, 2000). Ninguno de estos síntomas se presentaron en las plantas sometidas a estos tratamientos, ya que en comparación con otras plantas sometidas únicamente a medio comercial de hidroponía (control de agua con medio hidropónico), se presentaron las mismas características fenotípicas durante el tiempo que duró el ensayo.

El uso de los lixiviados de rellenos sanitarios para la irrigación de terrenos con cultivos que requieren de fertilización, como ciertos pastos, ha sido estudiado con éxito en especies como *Lolium sp.* (Revel *et al.*, 1999). De igual forma, ciertas especies arbóreas, como álamos, sauces, arces, eucaliptos y chopos, son utilizados para eliminar altas concentraciones de nitrógeno amoniacal en lixiviados, gracias a su capacidad de descontaminación. Estos cultivos, han resultado funcionales para remediar grandes cantidades de materia orgánica y de iones inorgánicos como el amonio, ya que tienen características que la favorecen tales como crecimiento acelerado, alta producción de biomasa, tolerancia a metales pesados, resistencia al frío y enfermedades, entre otras. En determinados casos, este tipo de tratamientos se llevaron a cabo antes de utilizar los lixiviados para irrigar otros terrenos como caña, ya que ésta última es incapaz de soportar un medio con altas cargas inorgánicas sin sufrir los efectos de la deshidratación (Bódalo *et al.*, 2007).

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los rellenos sanitarios han venido a funcionar como una alternativa para la disposición de los residuos sólidos municipales generados en la mayor parte de las comunidades de Costa Rica. La generación de subproductos de desecho a partir de la descomposición de la basura ha generado problemáticas de contaminación difíciles de tratar, tal es el caso de los lixiviados.

Los lixiviados contienen cantidades excesivas de materia orgánica e inorgánica en suspensión y disuelta, por lo que son considerados contaminantes potentes si se disponen en ecosistemas sin ser tratados. La cantidad de contaminantes, así como la naturaleza química de éstos varía en gran medida entre los sitios de muestreo, así como entre las épocas del año y las condiciones climáticas, por lo que el tratamiento de los lixiviados demanda una cantidad considerable de estudios antes de ser llevado a cabo. La mayor parte de los tratamientos dependen de factores variables como son la caracterización química, la cantidad de lixiviado, así como otras características fisicoquímicas especiales que pueda tener.

Dentro de las alternativas de tratamiento, considerando que los lixiviados pueden tener cantidades significativas de metales pesados, la fitoextracción demostró ser una alternativa viable para la remoción de estos contaminantes. Esta permitió que en el caso de cromo y plomo se redujeran los niveles de contaminación en concentraciones considerables. De igual forma, su implementación a futuro dentro de un relleno sanitario gozaría de los beneficios que tiene la fitorremediación: bajo costo, fácil de implementar, estéticamente agradable, entre otros.

El potencial que tienen las plantas para hiperacumular metales no es suficiente para seleccionar individuos capaces de llevar a cabo la fitorremediación en lixiviados. Antes de la selección es importante, realizar pruebas preliminares para medir la capacidad que tienen las plantas de tolerar las condiciones agresivas de los lixiviados, tal y como fue el caso del frijol de gandul (*Cajanus cajan*), mismo que demostró ser más adecuado para este tipo de

ensayos frente a otras plantas comúnmente utilizadas como son el girasol (*Helianthus annuus*) y el marigold (*Tagetes erecta*). Así, los individuos seleccionados para trabajar con lixiviados deben cumplir con dos aspectos: ser resistentes al contenido de los lixiviados e hiperacumular metales.

El frijol de gandul toleró hasta un 60% v/v de un lixiviado autoclavado, con un pH de 6.0 que se recolectó en el relleno sanitario Los Mangos en noviembre del 2011. La implementación de este ensayo a escala de laboratorio y su proyección en un futuro a un relleno sanitario queda sujeta a la modificación de aspectos experimentales que tuvieron que considerarse, tales como ajustes de pH y la necesidad de autoclavar el lixiviado. Definitivamente el autoclavado del lixiviado *in situ* sería impensable, pero si para la especie fuera necesaria la reducción de la carga microbiana en el lixiviado, podrían intentarse otras formas de hacerlo.

Plantas de frijol de gandul de 6 semanas de edad redujeron más del 30 % del metal contenido en el medio con lixiviado en un lapso de 16 días. La utilización de plantas con mayor biomasa podría provocar una reducción mayor del metal contaminante, al ser estos dos factores proporcionales entre sí. Además, se demostró que la mayor parte de los metales que son removidos por esta especie se encuentran en la raíz y que la planta en hidroponía remueve una cantidad mayor de plomo que de cromo.

Además, es posible notar que el proceso de absorción inicia tan pronto como las plantas son expuestas al medio, en el caso de los ensayos realizados en agua. Lo anterior demuestra la disponibilidad que tienen los contaminantes al estar expuestos a las plantas en una matriz líquida, sobretodo en matrices como los lixiviados que cuentan con cantidades considerables de materia orgánica que podrían funcionar como quelantes. En sistemas hidropónicos principalmente, aspectos como el oxígeno del medio, el pH, la presencia de quelantes y aniones disponibles, deberían ser considerados antes de valorar el proceso de fitorremediación.

En el caso de los ensayos realizados en tierra, se nota como después de 42 días de exposición de las plantas al metal, ellas no absorben cantidades significativas de este. Sólo en el caso del cromo, luego de 98 días de aplicación se notaron cambios estadísticamente significativos en la cantidad de metal que se absorbe del suelo. Lo anterior hace suponer que la movilidad del cromo en tierra es mayor que la del plomo, por lo que éste presenta mayor disponibilidad en la tierra, lo que se explica al considerar los suelos como interfaces sólidas donde se dan fenómenos de adsorción – desorción, precipitación, etc. Aspectos como el pH, tipo de suelo, cantidad de materia orgánica presente, humedad, densidad, entre otros, afectan la capacidad que tiene el suelo de retener los metales pesados, evitando que estos sean tomados por la planta.

El frijol de gandul tiene capacidad de disminuir en más de un 80 % la cantidad de nitrógeno disponible en un medio hidropónico conteniendo 25 %v/v de lixiviado. Resultados de este tipo son satisfactorios al proyectarse a rellenos sanitarios, ya que supuesta en marcha en un futuro, podría significar una solución al problema de contaminación ambiental que la basura está creando actualmente.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Adelakan, B; Abegunde, K. (2011). Heavy metals contamination of soil and groundwater at automobile mechanic villages in Ibadan, Nigeria. *International Journal of the Physical Sciences* 6 (5).
2. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). (2007). Resumen de salud pública para el Plomo. Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU. Estados Unidos.
3. Almendras, M; Carballa, M; Diels, L; Vanbroekhoven, K; Chamy, R. (2009). Prediction of Heavy Metals Mobility and Bioavailability in Contaminated Soil Using Sequential Extraction and Biosensors. *Journal of Environmental Engineering* 12.
4. Audesirk, T; Audesirk, G. (2008). Biología: La vida en la tierra. Octava edición. Editorial Pearson Educación de México, México.
5. Azcon, J; Talón, M. (2008). Fundamentos de fisiología vegetal. Primera edición. Editorial McGraw Hill Interamericana. México.
6. Azevedo, M; Ferracciú, L; Guimarães, L. (2003). Biosolids and heavy metals in solids. *Scientia Agricola* 60 (4).
7. Bailón, S. (2006). Lead bioaccumulation by three tropical plant species. Trabajo final de graduación. Universidad de Puerto Rico.
8. Barba, L; Torres, P; Rodríguez, J; Marmolejo, L; Pizarro, C. (2010). Influencia de la incorporación de lixiviados sobre la biodegradabilidad anaerobia de aguas residuales domésticas. *Ingeniería e Investigación*, 30 (1).
9. Blum, W. (1997). Cadmium uptake by higher plants. Fourth International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements (IK Iskandar, SE Hardy, AC Chang y GM Pierzynski, Eds.). Berkeley, California.

10. Bódalo, A; Hidalgo, A; Gómez, M; Murcia, M; Marín, V. (2007). Tecnologías de tratamientos de vertedero (II): Tratamientos de bajo coste. *Ingeniería Química* 452.
11. Bodzek, M; Surmacz, J; Hung, Y. (2006). Hazardous Industrial Waste Treatment, editorial CRC Press.
12. Bosiacki, M. (2009). Phytoextraction of cadmium and lead by selected cultivars of *Tagetes erecta*. Contents of Cd and Pb in plants. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus* 8 (2).
13. Cedano, J. (2006). Guía Técnica Cultivo de Guandul. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal, Inc (CEDAF), Santo Domingo, República Dominicana.
14. Cedeño, P; Tellez, D; Pacheco, F; Rosano, G; Ascencio, J. (2008). Química y fitorremediación de la presa Manuel Ávila Camacho “Valsequillo”, Puebla. Memorias del Congreso ANCA, Universidad Autónoma de Morelos.
15. Chaney, R; Malik, M; Li, Y; Brown, S; Brewer, E; Angle, J; Baker, A. (1997). Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology* 8.
16. Consorcio alemán de empresas consultoras AMBERO y IP (AMBERO-IP); Fundación Centro de Gestión Tecnológica e Informática Industrial (CEGESTI). (2007). *Plan de gestión de residuos sólidos*. Ministerio de Ambiente, Energía y Telecomunicaciones (MINAET), San José, Costa Rica.
17. Delgadillo, A; González, C; Prieto, F; Villagómez, J; Acevedo, O. (2011). Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14.
18. Díaz, E; Massol, A. (2003). Trace Element Composition in Forage Samples from a Military Target Range, Three Agricultural Areas, and One Natural Area in Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science* 39 (2).
19. Domènech, X; Jardim, W; Litter, M. (2001). Procesos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. Usos de óxidos semiconductores y materiales relacionados

para aplicaciones ambientales y ópticas. Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo. Ministerio de Economía y Competitividad, España.

20. El-Gendy, A. (2008). Modeling of heavy metals removal from municipal landfill leachate using living biomass of water hyacinth. *International Journal of Phytoremediation* 10.

21. Elizondo, K; Astorga, Y. (2007). Diagnóstico del cierre técnico del relleno sanitario Río Azul. San José, Costa Rica: Programa de Gestión Ambiental Integral, Universidad de Costa Rica.

22. Environmental Protection Agency (EPA). (2000). Introduction to Phytoremediation. National Risk Management Research Laboratory, Ohio, Estados Unidos.

23. Fassbender, H; Bornemisza, E. (1987). Química de los suelos con énfasis en suelos de América Latina. Segunda edición. Instituto Interamericano de la Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica.

24. Gaviria, L; Soto, S. (2007). Situación de la gestión de residuos sólidos en las Municipalidades en Costa Rica: recolección, disposición y recuperación. *Tecnología en Marcha*, 20 (4).

25. Ghosh, M; Singh, S. (2005). A review of phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecology and Environmental Research* 3, (1).

26. Giraldo, E. (2001). Tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios: avances recientes. *Revista de Ingeniería*, 14. Departamento de Ingeniería Civil y Ambiental, Universidad de los Andes, Colombia.

27. Glynn, J; Heinke, G. (1999). Ingeniería Ambiental. Segunda edición en español, editorial Prentice Hall, México.

28. González, E; Tornero, M; Ángeles, Y; Bonilla, N. (2009). Concentración total y especiación de metales pesados en biosólidos de origen urbano. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25 (1).
29. Gunsé, B. (1987). Efectos del cromo sobre la nutrición y las relaciones hídricas de *Phaseolus vulgaris*. Trabajo final de graduación. Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
30. Gutiérrez, L; Melgoza, A; Alarcón, M; Ortega, J; Prado, D; Cedillo, M. (2011). Germinación del girasol silvestre (*Helianthus annuus*) en presencia de diferentes concentraciones de metales. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* 2 (1).
31. Heng, A; Nikraz, H; Tse Hung, Y. (2010). Influent of waste age on landfill leachate quality. *International Journal of Environmental Science and Development*, 1 (4).
32. Housecroft, C; Sharpe A. (2005). Inorganic Chemistry. Segunda edición. Editorial Prentice Hall. Estados Unidos.
33. Iannacone, J; Alvariño, L. (2005). Efecto ecotoxicológico de tres metales pesados sobre el crecimiento radicular de cuatro plantas vasculares. *Agric. Téc.* 65 (2).
34. Illera, V; Walter, I; Cala, V. (2001). Niveles de metales pesados en *Thymus zizis* desarrollado en suelos enmendados con residuos orgánicos urbanos. *Rev. Int. Contam. Ambient* 17 (4).
35. Jaramillo, J. (2002). Guía para el diseño, construcción y operación de rellenos sanitarios manuales. Lima, Perú: Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente.
36. Jensen, D; Christensen, T. (1999). Colloidal and dissolved metals in leachates from four Danish landfills. *Wat. Res.* 33 (9).
37. Jones, D; Williamson, K; Owen, A. (2006). Phytoremediation of landfill leachate. *Waste Management* 26.

38. Kalcíková, G; Vávrová, M; Zagorc-Koncan, J; Zgajnar A. (2011). Seasonal variations in municipal landfill leachate quality. *Management of Environmental Quality: An International Journal* 22 (5).
39. Kastori, R; Petrovié, M; Petrovié, N. (1992). Effect of excess lead, cadmium, copper and zinc on water relations in sunflower. *Journal of plant nutrition* 15 (1).
40. Kjeldsen, P; Barlaz, M; Rooker, A; Baun, A; Ledin, A; Christensen, T. (2002). Present and long-term composition of MSW landfill leachate: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 32 (4).
41. Lasat, M. (2000). The use of plants for the removal of toxic metals from contaminated soil. American Association for the Advancement of Science. Nueva York, Estados Unidos.
42. León, J (2000). Botánica de los Cultivos Tropicales. Tercera edición en español. Editorial Agroamérica del IICA, San José, Costa Rica.
43. Llorca, R. (2006). Prácticas de Atmósfera, Suelo y Agua. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
44. McLaughlin, M. (2005). Encyclopedia of Soil Science. Segunda edición. Editorial RattanLal – CRC Press.
45. Méndez, R; Castillo, E; Sauri, M; Quintal, C; Giancoman, G; Jiménez, B. (2004). Tratamiento fisicoquímico de los lixiviados de un relleno sanitario. *Ingeniería*, 8 (2).
46. Méndez, R; Castillo, E; Sauri, M; Quintal, C; Giancoman, G; Jiménez, B. (2009). Comparación de cuatro tratamientos fisicoquímicos de lixiviados. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 25 (3).
47. Miller, J; Miller, J. (1989). Estadística para Química Analítica. Segunda edición. Editorial Addison Wesley, México.

48. Ministerio de Ambiente, Energía y Comunicaciones. (2007). Reglamento de Vertido y Reúso de Aguas Residuales, Decreto N° 33601-MINAE-S. Gobierno de Costa Rica, San José, Costa Rica.
49. Moore, R; Clark, D; Vodopich, D. (1997). Botany. Plant form and function. Segunda edición, editorial McGraw Hill, Estados Unidos.
50. Mor, S; Ravindra, K; Dahiya, R; Chandra, A. (2006). Leachate characterization and assessment of groundwater pollution near municipal solid waste landfill site. *Environmental Monitoring and Assessment* 118.
51. Moya, J; Agüi, I. (1996). ATPasa de la membrana plasmática de las plantas. *ArsPharm* 37(1).
52. Nájera, H; Castañón, J; Figueroa, J; Rojas, M. (2009). Caracterización y tratamiento fisicoquímico de lixiviados maduros producidos en el sitio de disposición final de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. II Simposio Iberoamericano de Ingeniería de Residuos, Red de Ingeniería en Saneamiento Ambiental, Universitat Jaume I, España.
53. Navarro, J; Aguilar, I; López, J. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* 16 (2).
54. Neyra, M. (1995). Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno Leguminosa/Rhizobium. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia.
55. Nordberg, G. (2001). Metales: Propiedades químicas y toxicidad. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Tercera edición, Organización Internacional del trabajo (OIT), Ginebra.
56. Nordberg, G; Fowler, B; Nordberg, M; Friberg, L. (2007). Handbook of the toxicology of metals. Tercera edición, editorial AcademicPress, Inc., Estados Unidos.

57. Núñez, R; Meas, Y; Ortega, R; Olgúin, E. (2004). Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia, julio – setiembre de 2004*.
58. Ogundiran, O; Afolabi, T. (2008). Assessment of the physicochemical parameters and heavy metals toxicity of leachates from municipal solid waste open dumpsite. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 5 (2).
59. Öman, C; Junestedt, C. (2007). Chemical characterization of landfill leachates – 400 parameters and compounds. *Waste Management* 28 (2008).
60. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). (2012). *OECD Factbook 2011-2012: Economic, Environmental and Social Statistics*. Paris, Francia: OECD Publishing.
61. Pereyra, M. (2001). Asimilación del nitrógeno en plantas. Publicación de la Facultad de Agronomía, Universidad de la Pampa. La Pampa, Argentina.
62. Poder Legislativo. (2010). Ley para la gestión integral de residuos (8839). San José, Costa Rica: La Gaceta.
63. Ponce, S; Romero, W. (2002). Evaluación del sistema de descontaminación de las aguas residuales del relleno sanitario de la universidad EARTH. Trabajo final de graduación. Universidad EARTH. Guácimo, Costa Rica.
64. Rascio, N; Navari, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science* 180.
65. Revel, J; Morard, P; Bailly, J; Labbé, H; Berthout, C; Kaemmerer, M. (1999). Plants use of leachates derived from Municipal Solid Waste. *Journal of Environmental Quality* 28 (4).
66. Rodríguez, J; Valdez, R; Alcalá, J; García, L; Rodríguez, H; Tapia, J; Pérez, J; Woo, J. (2009). Relaciones entre Cd, Pb y elementos esenciales en el proceso de fitoacumulación en *Nicotiana tabacum*. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 5 (3).

67. Rodríguez, M; Delgado, A; González, M; Carrillo, R; Mejía, J; Vargas, M. (2010). Emergencia y crecimiento de plantas ornamentales en sustratos contaminados con residuos de mina. *Interciencia* 35 (1).
68. Salem, Y; Hamouri, K; Djemaa, R; Allia, K. (2008). Evaluation of landfill leachate pollution and treatment. *Desalination* 220 (1).
69. Sheoran, I; Aggarwal, N; Singh, R. (1990). Effects of cadmium and nickel on *in vivo* carbon dioxide exchange rate of pigeon pea (*Cajanus cajan*). *Plant and Soil* 129.
70. Sheoran, V; Sheoran, S; Poonia, P. (2011). Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41.
71. Shuokr, A; Hamidi, A; Mohd, Y; Mohammed, B; Muhammad, U. (2010). Leachate characterization in semi-aerobic and anaerobic sanitary landfills: A comparative study. *Journal of Environmental Management* 91.
72. Sivasankar, R; Kalaikandhan R; Vijayarengan, P. (2012). Phytoremediating capability of four plant species under zinc stress. *International Journal of Research in Environmental Science and Technology* 2 (1).
73. Sögüt, Z; Zaimoglu, B; Erdogan, R; Sucu, M. (2005). Phytoremediation of landfill leachate using *Pennisetum clandestinum*. *Journal of Environmental Biology* 26(1).
74. Szantó, M; Piraino, E; Arancibia, C. (2011). Criterios para el tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios mediante evaporación por radiación solar. Actas del IV Simposio Iberoamericano de Ingeniería de Residuos, Red de Ingeniería en Saneamiento Ambiental, Universitat Jaume I, España.
75. Talebi, A; Norli, I; Alkarkhi, A; Teng, T. (2009). Optimization of coagulation process for landfill leachate pre-treatment using response surface methodology (RSM). *Journal of Sustainable Development*, 2 (2).

76. Taiz, L; Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal. Primera edición en español. Publicaciones de la Universitat Jaume I. Castellón de la Plana, España.
77. Van der Peck, M. (2006). Soil and Water Contamination: From Molecular to Catchment Scale. Grupo Taylor & Francis, Inglaterra.
78. Varichón, P. (1994). Aspectos biológicos de huertos caseros en El Camalote, Copán, Honduras. Agencia Canadiense para el Desarrollo Internacional, Canadá.
79. Volke, T; Velasco, J. (2002). Tecnologías de Remediación para Suelos Contaminados. Editorial Instituto Nacional de la Ecología, Distrito Federal, México.
80. Wirén, N; Khodr, H; Hider, R. (2000). Hydroxylated phytosiderophore species possess an enhanced chelate stability and affinity for iron (III). *Plant Physiology* 124.
81. Yankov, B; Tahsin, N. (2001). Accumulation and distribution of Pb, Cu, Zn and Cd in sunflower (*Helianthus annuus*) grown in an industrially polluted region. *Helia* 24 (34).

ANEXO 1

MUESTRA DE CÁLCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE METALES EN AGUA

Para la muestra de cálculos de los metales en los sistemas del medio hidropónico (punto 4.4 **Cinéticas de remoción de cromo y plomo en agua**), se va a considerar el sistema #1 conteniendo agua, lixiviado y plomo. Para este sistema en hidroponía, y todos los demás de plomo y cromo, se utiliza el mismo tratamiento matemático mostrado, pero con sus propias curvas de cuantificación.

Sea la curva que relaciona absorbancia con concentración (ver figura 15),

$$y = (0,0217 \pm 0,0005)x - (0,007 \pm 0,003)$$

se tiene que, para el día cero (mismo que se utilizará como ejemplo), la concentración de la réplica 1 (en mg/L) en la disolución cuantificada por absorción atómica es,

$$y = (0,0217 \pm 0,0005)(0,1123) - (0,007 \pm 0,003) = 11,40$$

obteniendo de igual forma las concentraciones de réplica 2 y 3 de 10,93 y 11,28 mg/L respectivamente. De esta forma, se obtiene el promedio en absorción según la ecuación,

$$\text{concentración promedio} = \frac{(5,70+5,46+5,64)\text{mg/L}}{3} = 5,60\text{mg/L}$$

Dado que para la muestra se utiliza un factor de dilución de 25 mL de muestra en llevado a un volumen de 50 mL (ver punto 3.5.2), se obtiene finalmente la concentración de plomo en agua para el día cero en el sistema 1 según la ecuación,

$$\text{concentración en sistema} = 5,60 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times \frac{50 \text{ mL}}{25 \text{ mL}} = 11,20 \text{ mg/L}$$

ANEXO 2

MUESTRA DE CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN DE METALES EN TIERRA

Para la muestra de cálculos de los metales en los sistemas con tierra (punto 4.5 **Cinéticas de remoción de cromo y plomo en tierra**), se va a considerar el punto al día cero de la curva, que contiene tierra, lixiviado y plomo. Para este punto de la cinética en tierra, así como para todos los demás de plomo y cromo, se utiliza el mismo tratamiento matemático mostrado, pero con su propia curvas de cuantificación.

Sea la curva que relaciona absorbancia con concentración (ver figura 20),

$$y = (0,049 \pm 0,003)x - (0,016 \pm 0,005)$$

se tiene que, para el día cero (mismo que se utilizará como ejemplo), la concentración de la réplica 1 (en mg/L) en la disolución cuantificada por absorción atómica es,

$$x = \frac{0,0874 + (0,016 \pm 0,005)}{(0,049 \pm 0,003)} = 2,1076 \text{ mg/L}$$

lo cual, al estar contenido en un balón de 50 mL, tiene una cantidad de plomo en mg de

$$2,1076 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \cdot 0,05\text{L} = 0,1054 \text{ mg Pb}$$

Posteriormente, la cuantificación del contenido en mg/kg (ppm) de plomo en tierra se realiza sobre la masa de tierra agregada,

$$\text{ppm(Pb)} = \frac{\text{mg}_{\text{Pb}}}{\text{kg}_{\text{tierra}}} = \frac{0,1054 \text{ mg}}{0,01001\text{kg}} = 10,54 \text{ mg/kg}$$

siendo de esta forma el promedio de las tres réplicas el dado por,

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n} = \frac{(10,54 + 10,42 + 10,61)\text{mg/kg}}{3} = 10,52 \text{ mg/kg}$$

Para las muestras de cromo, debe considerarse que estas fueron aforadas en un balón de 100 mL, por lo que los cálculos se realizan con base en este volumen. Además, para las concentraciones determinadas, así como para las curvas, se realiza el arrastre de incertidumbres respectivo con un nivel de significancia de 95%, mismo que se presenta en el Anexo 4.

ANEXO 3

MUESTRA DE CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN DE METALES EN RAÍCES Y PARTES AÉREAS DE LAS PLANTAS UTILIZADAS

Para la muestra de cálculos de la determinación de metales en la planta utilizada (punto 4.6 **Acumulación de los metales en la planta**), se va a considerar la muestra #1 de raíz expuesta a plomo. Para esta muestra de planta, así como para todas las demás muestras, tanto de cromo y de plomo, como de parte aérea y de raíz, se utiliza el mismo tratamiento matemático mostrado, con su correspondiente curva de cuantificación.

Sea la curva que relaciona absorbancia con concentración (ver figura 20),

$$y = (0,049 \pm 0,003)x - (0,016 \pm 0,005)$$

se tiene que, para la muestra #1 de raíz expuesta a plomo, la concentración de la réplica #1 (en mg/L) en la disolución cuantificada por absorción atómica es,

$$x = \frac{0,0978 + (0,016 \pm 0,005)}{(0,049 \pm 0,003)} = 2,322 \text{ mg/L}$$

misma que al haber sido disuelta con un factor de 1:5 (alícuota de 20 mL en un balón aforado de 100 mL), corresponde a una concentración de,

$$x = 5 \cdot 2,322 \frac{\text{mg}}{\text{L}} = 11,61 \text{ mg/L}$$

lo cual, al estar contenido en un balón de 50 mL, tiene una cantidad de plomo en mg de

$$11,61 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \cdot 0,05\text{L} = 0,5806 \text{ mg Pb}$$

Posteriormente, la cuantificación del contenido en ppm (mg/kg) de plomo en partes de la planta (raíces en este caso) se realiza sobre la masa de tejido vegetal seco agregado,

$$\text{ppm(Pb)} = \frac{\text{mg}_{\text{Pb}}}{\text{kg}_{\text{planta}}} = \frac{0,5806 \text{ mg}}{0,00021\text{kg}} = 2768,6 \text{ mg/kg}$$

siendo de esta forma el promedio de las dos réplicas el dado por,

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n} = \frac{(2768,6 + 2729,8)\text{mg/kg}}{2} = 2749,2 \text{ mg/kg}$$

Tanto para las muestras de cromo como para las muestras de plomo se utilizan los mismos balones, así como factores de dilución. Para el caso de las raíces, se utiliza un factor de dilución de 1:5 para la cuantificación de las disoluciones al momento de hacer el ensayo, mismo que es considerado en la determinación de la incertidumbre. Además, para las concentraciones determinadas, así como para las curvas, se realiza el arrastre de incertidumbres respectivo con un nivel de significancia de 95%, mismo que se presenta en el Anexo 4.

ANEXO 4

ARRASTRE DE INCERTIDUMBRES PARA LA CURVA DE DETERMINACIÓN DE METALES POR ABSORCIÓN ATÓMICA

Para el arrastre de las incertidumbres en las curvas para absorción atómica, se ejemplificará con el cálculo para la curva de cuantificación de plomo construida para determinar este en muestras de tierra (ver figura 20). Para todas las demás curvas, el procedimiento aplicado es el mismo. Este procedimiento está dado por Miller (Miller & Miller, 1989), siendo así adaptado a los datos de cada una de las curvas correspondientes, y construidos bajo la teoría de los mínimos cuadrados.

Sean los datos calculados para la curva, donde x_i es la concentración de la muestra y y_i es la absorbancia dada por el equipo, se tiene,

Concentración (x_i)	Absorbancia (y_i)	$x_i - \bar{x}$	$y_i - \bar{y}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$
0,5	0,0105	-1,00	-0,047	1	0,00221	0,0470
0,75	0,0220	-0,75	-0,0355	0,5625	0,00126	0,0266
1	0,0325	-0,50	-0,025	0,25	0,00062	0,0125
1,25	0,0435	-0,25	-0,014	0,0625	0,00020	0,0035
1,5	0,0566	0,00	-0,0009	0	8,1E-07	0
1,75	0,0673	0,25	0,0098	0,0625	9,6E-05	0,0024
2	0,0799	0,50	0,0224	0,25	0,00050	0,0112
2,25	0,0945	0,75	0,037	0,5625	0,00137	0,0278
2,5	0,1110	1,00	0,0535	1	0,00286	0,0535
$\Sigma = 13,5$	0,5178	0	0,0003	3,75	0,00912	0,1845

Con los promedios,

$$\bar{x}_i = 1,50$$

$$\bar{y}_i = 0,0575$$

Por lo que, el coeficiente de correlación se calcula con la fórmula,

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]\}^{1/2}} = \frac{0,1845}{(3,75 \cdot 0,00912)^{1/2}} = 0,9978$$

El cálculo para la pendiente (b) y la intersección de la curva (a), está dado por las siguientes ecuaciones,

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} = \frac{0,1845}{3,75} = 0,04921$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} = 0,0575 - 0,04921(1,5) = -0,0163$$

Para el cálculo de las incertidumbres asociadas a la pendiente y la intersección se tienen los siguientes datos,

Concentración (x_i)	$(x_i)^2$	Absorbancia (y_i)	\hat{y}_i	$ y_i - \hat{y}_i $	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
0,5	0,25	0,0105	0,0083	0,0022	4,869E-06
0,75	0,5625	0,0220	0,0206	0,0014	1,973E-06
1	1	0,0325	0,0329	0,0004	1,576E-07
1,25	1,5625	0,0435	0,0452	0,0017	2,886E-06
1,5	2,25	0,0566	0,0575	0,0009	8,109E-07
1,75	3,0625	0,0673	0,0698	0,0025	6,261E-06
2	4	0,0799	0,0821	0,0022	4,858E-06
2,25	5,0625	0,0945	0,0944	0,0001	8,883E-09
2,5	6,25	0,1110	0,1067	0,0043	1,843E-05
$\Sigma = 13,5$	24	0,5178	0,5175	0,0157	4,025E-05

Para esto, se calculan los valores estadísticos de $S_{y/x}$, S_b y S_a con las respectivas ecuaciones,

$$S_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2} \right\}^{1/2} = \left\{ \frac{4,025 \cdot 10^{-5}}{7} \right\}^{1/2} = 0,002398$$

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\{\sum_i (x_i - \bar{x})^2\}^{1/2}} = \frac{0,002398}{(3,72)^{1/2}} = 0,001238$$

$$S_a = S_{y/x} \left\{ \frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2} = 0,002398 \left\{ \frac{24}{9 \cdot 3,75} \right\}^{1/2} = 0,0020221$$

El cálculo de incertidumbres se realiza a un intervalo de confianza del 95%, con un valor de *t de student* de 2,365 para un total de 9 patrones y 7 grados de libertad para la relación lineal,

$$\mu_b = S_b \cdot 2,365 = 0,001238 \cdot 2,365 = 0,002928$$

$$\mu_a = S_a \cdot 2,365 = 0,002022 \cdot 2,365 = 0,004782$$

Calculadas las incertidumbres de estos, se reporta la curva con los respectivos intervalos de confianza

$$y = (0,049 \pm 0,003)x - (0,016 \pm 0,005)$$

Para cada uno de los valores de concentración en plomo que se determinan interpolados en la muestra, debe calcularse el S_{x0} que da el error de cuantificación en la curva. Este se hace tomando como ejemplo para cálculo la absorbancia en el día 0, basado en la siguiente ecuación,

$$S_{x0} = \frac{S_{y/x}}{b} \left\{ 1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2}$$

$$S_{x0} = \frac{0,002398}{0,04921} \left\{ 1 + \frac{1}{9} + \frac{(0,0873 - 0,0575)^2}{(0,04921)^2 \cdot 3,75} \right\}^{1/2} = 0,0515868$$

Este mismo error es calculado al 95% de confianza, con el valor de *t de student* correspondiente,

$$S_{x0}(95\%) = 0,0515868 \cdot 2,365 = 0,1220$$

Para cada una de las muestras tomadas en diferentes días, una vez que se calcula la concentración de metal en la muestra, para esta se calcula el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Estos tres valores se calculan igualmente para el día 0 de la siguiente forma,

$$\bar{x} = \left(\frac{\sum_i x_i}{n} \right) = \left(\frac{10,5326 + 10,4173 + 10,6025}{3} \right) = 10,5175$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{0,01749}{2}} = 0,09351$$

$$\text{DER (CV)} = 100 \cdot \frac{s}{\bar{x}} = 100 \cdot \frac{0,09351}{10,5175} = 0,89\%$$

Obtenidos los valores tanto de la incertidumbre debida a la variabilidad (desviación estándar), incertidumbre debida a los equipos volumétricos y de determinación de masa (en el caso de la determinación en tierra se considera la incertidumbre combinada de la balanza analítica y del balón aforado, mientras que en el caso de la determinación en agua se considera la incertidumbre combinada de la pipeta y del balón aforado), además de la incertidumbre de la cuantificación en la curva (S_{x0} al 95% de confianza), esta se combina en una sola con la ecuación,

$$\mu_{\text{combinada}} = x_0 \cdot \sqrt{\left(\frac{s_{x0}}{\text{Conc}_{\text{balón}}} \right)^2 + \left(\frac{0,0001}{m_{\text{tierra}}} \right)^2 + \left(\frac{0,025}{V_{\text{balón (50mL)}}} \right)^2 + \left(\frac{s}{x_0} \right)^2}$$

$$\mu_{\text{combinada}} = 10,5172 \cdot \sqrt{\left(\frac{0,1220}{2,1049} \right)^2 + \left(\frac{0,0001}{10,0068} \right)^2 + \left(\frac{0,025}{50} \right)^2 + \left(\frac{0,0935}{10,5172} \right)^2} = 0,62$$

Finalmente se tienen los datos para todas las muestras con su incertidumbre combinada, calculadas de igual forma que se realizó para esta muestra de cálculos del día cero de plomo en tierra. Con estos valores se procede a graficar las curvas de absorción de metales en agua y tierra.

Día (muestra)	Concentración (mg/kg)	Incertidumbre combinada (mg/kg)
0	10,5	0,6
4	10,5	0,7
7	10,5	0,6
12	10,4	0,7
15	10,6	0,6
19	10,5	0,6
28	10,5	0,6
42	10,3	0,6
98	10,6	0,6

Asimismo, se calculan los límites de detección y los límites de cuantificación para la curva utilizada,

$$LD = a + 3S_{y/x} = -0,0163 + 3 \cdot 0,002398 = -0,0091$$

$$LC = a + 10S_{y/x} = -0,0163 + 10 \cdot 0,002398 = 0,0077$$

Y posteriormente, se calcula la concentración asociada a cada uno de estos límites,

$$x = \frac{-0,0091 + (0,016 \pm 0,005)}{(0,049 \pm 0,003)} = 0,1408 \text{ mg/L}$$

$$x = \frac{0,0077 + (0,016 \pm 0,005)}{(0,049 \pm 0,003)} = 0,4836$$