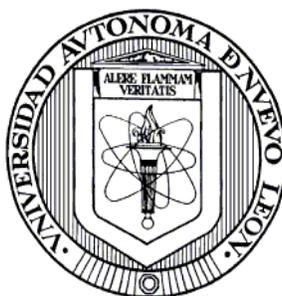


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS DE BAJO PESO
MOLECULAR PRESENTES EN EXUDADOS RADICULARES
DE *Zea mays*: APLICACIONES PARA LA REMEDIACIÓN
DE SUELOS CONTAMINADOS POR
METALES PESADOS.

Por

ADRIANA IBARRA RUBIO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación en
Química Analítica Ambiental

Mayo, 2011

CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS DE BAJO PESO
MOLECULAR PRESENTES EN EXUDADOS RADICULARES
DE *Zea mays*: APLICACIONES PARA LA REMEDIACIÓN
DE SUELOS CONTAMINADOS POR
METALES PESADOS.

Aprobación de la tesis:

Dr. Ulrico Javier López Chuken
Director de tesis

Dr. Jorge Luis Guzmán Mar
Co-director de tesis

Vocal

Dra. María Teresa Garza González
Subdirectora de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas, U.A.N.L.

RESUMEN

Adriana Ibarra Rubio

Fecha de Graduación:

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS DE BAJO PESO MOLECULAR PRESENTES EN EXUDADOS RADICULARES DE *ZEА MAYS*: APLICACIONES PARA LA REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR METALES PESADOS.

Número de páginas: 108

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con orientación Química Analítica Ambiental.

Área de Estudio: Química Analítica Ambiental

Propósito y Método del Estudio: La contaminación por metales pesados en suelos ha tomado mayor relevancia a nivel mundial debido al riesgo de acumulación y transferencia de éstos a través de la cadena alimenticia, además del potencial que tienen para filtrarse a las aguas subterráneas. Una de las tareas más difíciles para los investigadores es la búsqueda de tecnologías efectivas, ambientalmente amigables y de bajo costo para remediar sitios contaminados con metales pesados. A la fecha, gran parte de la investigación se ha enfocado al desarrollo de diversas técnicas *in situ* para la remediación de sitios contaminados.

Estudios recientes han sugerido el uso de técnicas de fitoextracción asistida por ácidos orgánicos de bajo peso molecular (AOBPM) para solubilizar metales en suelos y facilitar su extracción por plantas. En relación a esto, se sabe que algunas plantas pueden producir exudados radiculares, los cuales, ante ciertas situaciones de estrés ambiental, son liberados por las plantas y éstos pueden modificar el pH del suelo o pueden solubilizar los nutrientes necesarios para su desarrollo. La composición de éstos exudados radiculares es muy variable, e incluye AOBPM, lo cual podría sugerir su uso en programas de remediación de suelos contaminados.

Contribuciones y Conclusiones El maíz (*Zea mays* var. Asgrow) presentó buena adaptación y crecimiento en cultivo hidropónico bajo condiciones deficientes en micronutrientes. El ácido oxálico, además mostró ser el AOBPM predominante en sus exudados radiculares, sin embargo no se descarta la presencia de otros ácidos orgánicos a nivel de traza. Se identificó y caracterizó un suelo históricamente contaminado encontrando la presencia de Pb en concentraciones que superan los LMP de la normatividad nacional e internacional (EUA y la UE). La modelación de la especiación química de Pb en la solución de suelo sin tratar indicó que cerca del 100% del Pb soluble se encontraba en forma de complejos orgánicos con la materia orgánica del suelo (posiblemente ácidos húmicos y fúlvicos). La aplicación de ácido oxálico al suelo de estudio incrementó significativamente 148% ($p < 0.05$) la concentración de Pb en la fracción soluble respecto al blanco debido a la formación de complejos solubles con el oxalato. Los complejos predominantes fueron los complejos bidentados del Pb con el oxalato.

FIRMA DEL ASESOR: _____

AGRADECIMIENTOS

En el presente trabajo quisiera dedicar algunas líneas a la gente que durante éstos dos años me ha tendido la mano y me ha dado la fuerza para salir adelante.

Quisiera agradecer a Dios por darme la fuerza, el coraje y la vida para realizar cada una de mis metas durante estos años y por darme una luz en mi vida, quien día a día me motiva a luchar, mi pequeña niña Sofía Amelie.

A mi querido esposo Fernando, quien desde hace 4 años ha estado conmigo día y noche, brindándome todo su amor y comprensión.

A CONACyT, a la Facultad de Ciencias Químicas y a la UANL por brindarme la oportunidad de superarme y lograr uno de mis sueños, terminar una maestría en ciencias.

A mi asesor el Dr. Ulrico, quien desde hace años ha confiado en mí, me ha brindado grandes conocimientos, me ha apoyado a salir adelante y cumplir una de mis metas.

A mi co-asesor el Dr. Jorge Luis por dedicar tanto tiempo a mi trabajo, por brindarme infinitos conocimientos y ser una excelente persona.

A mi comité tutorial la Dra. Aracely, Dra. Ma. Teresa y Dr. Alfaro quienes ayudaron a perfeccionar mi trabajo, pero sobretodo quisiera dar las gracias por haber confiado en mí.

A mis maestros, quienes participaron en mi desarrollo profesional durante la carrera.

A mis padres y mi hermano por estar siempre conmigo.

A mi amiga Cinthya Denisse quien desde hace ya varios años ha estado conmigo, brindándome su amistad y a quien descubrí en estos últimos años y he podido darle el nombre de gran amiga.

A Laura Elizabeth, Diana, Nidia, Carolina Estrada, Laura Villarreal, Juanjo, Toño, Eder, Olivia, Sonia y Nallely por brindarme su amistad incondicional.

DEDICATORIA

Dedico con todo mi corazón este trabajo a dos personas quienes me han hecho la vida maravillosa: mi pequeña hija Sofia Amelie, quien ha despertado emociones que jamás pensé sentir y a mi querido esposo Fernando, quien me ha brindado todo su amor, respeto, apoyo y comprensión.

CONTENIDO

Capítulo	Página
RESUMEN.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
DEDICATORIA	iv
CONTENIDO	v
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE IMÁGENES	xv
NOMENCLATURA.....	xvi
1.Introducción	1
1.1..Contaminación de suelos por metales pesados.....	1
1.2..Tecnologías de remediación de sitios contaminados	1
1.2.1. Fitoextracción	2
1.2.1.1 Fitoextracción asistida químicamente (FEAQ)	3
1.3..Función y producción de exudados radiculares	5
1.3.1. Exudación de AOBPM por plantas.....	10
1.4..Justificación.....	13
1.5..Hipótesis.....	14
1.6..Objetivos.....	15
1.6.1. Objetivo general.....	15

1.6.2. Objetivos específicos	15
2. Materiales y métodos.....	16
2.1..Equipos y materiales utilizados.....	16
2.2..Selección de la especie vegetal.....	18
2.2.1. Plantas.....	18
2.2.2. Solución nutritiva	19
2.2.3. Determinación de biomasa fresca y seca.....	20
2.3..... Inducción de la producción de exudados radiculares en cultivo hidropónico	21
2.3.1. Diseño de solución nutritiva	21
2.3.2. Extracción de exudados radiculares	22
2.4. Determinación de exudados radiculares	25
2.4.1. Purificación y pre-concentración de exudados radiculares..	25
2.4.2. Caracterización y cuantificación de AOBPM presentes en los exudados radiculares.....	27
2.5..... Modelación de la especiación química de metales en la fracción soluble del suelo	29
2.5.1. Muestreo y caracterización del suelo contaminado por metales pesados.....	29
2.5.2.....Modelo de especiación	38
2.5.2.1 Primera modelación: condiciones iniciales del suelo.	39
2.5.2.2 Segunda modelación: efecto de los AOBPM en la especiación química de Pb en la fracción soluble del suelo. ..	40

2.5.2.3..... Extracción y caracterización de la solución de suelo	
.....	42
2.6 Aseguramiento de la calidad de resultados	46
2.7..Análisis estadístico	46
2.8..Disposición de residuos	47
3. Resultados y discusión	48
3.1..Selección de la especie vegetal	48
3.2..... Inducción de la producción de exudados radiculares en cultivo hidropónico	54
3.2.1. Solución nutritiva	54
3.2.2. Extracción de exudados radiculares	54
3.3..Determinación de exudados radiculares	54
3.3.1. Purificación y pre-concentración de exudados radiculares..	57
3.3.2. Caracterización de AOBPM presentes en los exudados radiculares	62
3.4. Modelación de la especiación química de metales en la fracción soluble del suelo	74
3.4.1. Muestreo y caracterización del suelo contaminado por metales pesados.....	74
3.4.2. Primera modelación: condiciones iniciales del suelo.....	77
3.4.3. Segunda modelación: efecto de los AOBPM en la especiación química de Pb en la fracción soluble del suelo	81
4. Conclusiones	90

Bibliografía.....	92
5. Anexos	106
Resumen autobiográfico.....	108

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1.1 Antecedentes relevantes sobre estudios de FEAQ utilizando AOBPM como agentes solubilizantes.....	4
Tabla 1.2 Antecedentes relevantes en la caracterización de exudados radiculares de distintas especies de plantas y sus efectos en la química de metales en suelo y/o hidroponía.....	6
Tabla 1.3 Antecedentes relevantes en la caracterización de exudados radiculares de distintas especies de plantas y sus efectos en la química de metales en suelo y/o hidroponía.....	7
Tabla 1.4 Factores que afectan la producción y composición de exudados radiculares.....	9
Tabla 2.1 Material y equipos utilizados durante el desarrollo del proyecto y su localización.....	16
Tabla 2.2 Composición química de la solución nutritiva (López-Chuken y Young, 2010).....	20
Tabla 2.3 Descripción de las fracciones provenientes del proceso de purificación y pre-concentración.....	27
Tabla 2.4 Condiciones cromatográficas para la caracterización de ácidos orgánicos presentes en los exudados radiculares de <i>Zea mays</i>	27
Tabla 2.5 Métodos utilizados para la determinación de los parámetros fisicoquímicos analizados en el suelo de estudio.....	32
Tabla 2.6 Corrección de lecturas respecto a la temperatura en la determinación de textura del suelo.....	36
Tabla 2.7 Parámetros para la determinación de metales por EAA.....	38

Tabla 2.8	Parámetros agronómicos para la determinación de la concentración de ácido oxálico y su aplicación en suelo	41
Tabla 2.9	Métodos utilizados para la determinación de los parámetros químicos en la fracción soluble del suelo.....	43
Tabla 3.1	Productividad de tallo y raíz (peso fresco) de distintas variedades de plantas bajo diferentes medios de cultivo	52
Tabla 3.2	Productividad de tallo y raíz (peso seco) de distintas variedades de plantas bajo diferentes medios de cultivo.	53
Tabla 3.3	Condiciones cromatográficas para la determinación de AOBPM mediante HPLC	55
Tabla 3.4	Tiempo de retención (t_R) de los AOBPM de estudio presentes en la Figura 3.1	56
Tabla 3.5	Porcentajes (%) de recuperación del proceso de purificación y pre-concentración de muestras en estándares de concentración conocida.	57
Tabla 3.6	Porcentajes (%) de recuperación de los estándares de concentración conocida con el proceso de activación de la resina Dowex.	58
Tabla 3.7	Tiempo de retención (t_R) de los picos de interés en la Figura 3.2.	60
Tabla 3.8	t_R de los picos de interés en la Figura 3.3.	61
Tabla 3.9	t_R de los picos de interés en la Figura 3.4	63
Tabla 3.10	t_R de los picos de interés en la figura 3.5	64
Tabla 3.11	t_R de los picos de interés en la Figura 3.6	65
Tabla 3.12	Exudación de ácido oxálico por maíz (<i>Zea mays</i> var. Asgrow).	65
Tabla 3.13	Biomasa fresca de raíz producida por maíz (<i>Zea mays</i> var. Asgrow) bajo distintos tratamientos.	68

Tabla 3.14 Exudación de ácido oxálico en muestras de exudados radiculares de <i>Zea mays</i> var Asgrow.....	69
Tabla 3.15 Evidencia de la relación entre la composición de exudados radiculares en distintas especies vegetales y/o genotipos de una misma especie.....	72
Tabla 3.16 Toma de muestras de exudados radiculares en diversas especies vegetales.....	73
Tabla 3.17 Algunos parámetros fisicoquímicos realizados al suelo de estudio.....	74
Tabla 3.18 Concentración de metales totales en el suelo de estudio.....	77
Tabla 3.19 Valores límite de concentración de metales pesados en suelo .	77
Tabla 3.20 Concentración de cationes en la fracción soluble del suelo de estudio.....	78
Tabla 3.21 Concentración de aniones solubles en la fracción soluble del suelo de estudio.	78
Tabla 3.22 Determinación de pH y COT en solución de suelo.....	79
Tabla 3.23 Especiación química del plomo soluble en el suelo de estudio (Visual MINTEQ 3.0)	79
Tabla 3.24 Porcentajes (%) de complejos inorgánicos de Pb (VisualMINTEQ 3.0).....	80
Tabla 3.25 Exudación radicular de ácido oxálico en muestras de maíz (<i>Zea mays</i> var. Asgrow) cultivadas bajo diferentes soluciones de cultivo	81
Tabla 3.26 Tratamientos de ácido oxálico aplicados al suelo de estudio.	82
Tabla 3.27 Concentración de Pb en la fracción soluble del suelo bajo distintos tratamientos de ácido oxálico.	83

Tabla 3.28Especiación química de Pb bajo distintos tratamientos de ácido oxálico (Visual MINTEQ 3.0)	84
Tabla 5.1 Datos de entrada para el modelo de especiación y saturación mineral Visual MINTEQ 3.0	106
Tabla 5.2 Datos de entrada para el modelo de especiación y saturación mineral Visual MINTEQ 3.0 (Continuación)	107

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 2.1 Esquema general de la toma de muestras de exudados radiculares producidos por maíz (<i>Zea mays</i> var. Asgrow).	24
Figura 2.2 Esquema general de la purificación y pre-concentración de muestras exudados radiculares producidos por maíz (<i>Zea mays</i> var. Asgrow).	25
Figura 2.3 División de fracciones en el proceso de purificación y pre-concentración de exudados radiculares de maíz (<i>Zea mays</i> var. Asgrow)..	26
Figura 3.1 Cromatograma una mezcla de los ocho AOBPM en estudio y su correspondiente tiempo de retención (t_R). 1: Oxálico 10 mg L ⁻¹ ; 2: Tartárico 200 mg L ⁻¹ ; 3: Málico 200 mg L ⁻¹ ; 4.Acético 300 mg L ⁻¹ ; 5. Maléico 2 mg L ⁻¹ ; 6. Cítrico 300 mg L ⁻¹ ; 7: Succínico 300 mg L ⁻¹ ; 8: Fumárico 2.5 mg L ⁻¹	56
Figura 3.2 Fracción 4 de un estándar de los ocho AOBPM de estudio.	60
Figura 3.3 Fracción 4 de blanco (agua nanopura) con el tratamiento de purificación y pre-concentración.	61
Figura 3.4 Cromatograma de la muestra 3 del tratamiento deficiente con impedancia mecánica (15 días post-germinación) sin tratamiento de purificación y pre-concentración (F-0). Se observa el pico correspondiente al ácido oxálico a un $t_R \cong 3$ min	63
Figura 3.5 Cromatograma de la muestra 3 del tratamiento deficiente sin impedancia mecánica (15 días post-germinación) sin tratamiento de purificación y pre-concentración (F-0). Se observa el pico correspondiente al ácido oxálico a un $t_R \cong 3$ min.....	64

Figura 3.6 Cromatograma de la muestra 3 del tratamiento completo (15 días post-germinación) sin tratamiento de purificación y pre-concentración (F-0). Se observa el pico correspondiente al ácido oxálico a un $t_R \cong 3$ min.	65
Figura 3.7 Exudación de ácido oxálico por maíz (<i>Zea mays</i> var. Asgrow). .	66
Figura 3.8Especiación química de plomo bajo los distintos tratamientos de ácido oxálico. Pb-MO: complejos plomo-materia orgánica; Pb-oxalato: complejos plomo-oxalato; Pb: plomo total soluble. Las especies mostradas corresponden a >99% del Pb total soluble en el suelo.	85
Figura 3.9Porcentaje de complejos orgánicos de plomo bajo los distintos tratamientos de ácido oxálico. Las especies mostradas corresponden a >99% del Pb total soluble en el suelo.	85

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 2.1 Esquema general de la toma de muestras en los distintos tratamientos.....	23
Imagen 2.2 Sitio de muestreo de suelo.....	31
Imagen 2.3 Muestreo del Triangulo-diamante-hexágono según Reetz (2001).....	31
Imagen 2.4 Clases texturales de suelo.....	35
Imagen 3.1 Foto de una planta de maíz (<i>Zea mays</i> var. Asgrow) clorótica (derecha) del tratamiento deficiente en micronutrientes sin impedancia mecánica y una planta control (izquierda) del tratamiento completo a los 23 días post-germinación.	50
Imagen 3.2 Foto de una planta de maíz (<i>Zea mays</i> var. Asgrow) clorótica del tratamiento deficiente con impedancia mecánica a los 23 días post-germinación.....	51
Imagen 3.3 Representación esquemática del papel de los AOBPM en la movilización y absorción de Fe por plantas monocotiledóneas. (Jones, 1998).....	71
Imagen 3.4 Representación esquemática de la liberación de PS y su papel en la movilización y absorción de micronutrientes por plantas. (Neumann 2007; Walker y Connolly, 2008).....	71
Imagen 3.5 Influencia del pH del suelo (Tomado de Rodríguez y Rodríguez, 2002). El ancho de banda que se muestra indica el mayor o menor grado en que cada elemento es asimilable, según el valor de pH del suelo.	76

NOMENCLATURA

AOBPM:	Ácidos Orgánicos de Bajo Peso Molecular
CC:	Capacidad de Campo
COT	Carbono Orgánico Total
CI	Carbono Inorgánico
DMA:	Ácido 2(S),3-(S),3-(S)-N-[3-(3-hidroxi-3- carboxipropilamino)-3-carboxipropil]-azetidina-2- carboxílico
DTPA:	Ácido Dietilentriaminapentaacético
H:	Humedad
HD M (+):	Solución Nutritiva Completa
HD M (-):	Solución Nutritiva Deficiente en Micronutrientes (Fe, Cu y Zn)
HD I (+)	Solución Nutritiva Deficiente en Micronutrientes (Fe, Cu y Zn) con Impedancia Mecánica
HD I (-)	Solución Nutritiva Deficiente en Micronutrientes (Fe, Cu y Zn) sin Impedancia Mecánica
HPLC:	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético
EAA	Espectroscopía de Absorción Atómica
EUA:	Estados Unidos de América
FEAQ:	Fitoextracción Asistida Químicamente
IB:	Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
LAI:	Laboratorio de Análisis Instrumental, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
LICAA:	Laboratorio de Investigación en Ciencias de los Alimentos y Ambientales, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
LMP:	Límites Máximos Permisibles
LSO:	Laboratorio de Síntesis Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
LBF:	Laboratorio de Biofarmacia, Facultad de Ciencias Químicas,

Universidad Autónoma de Nuevo León

M:	Molaridad
MO:	Materia Orgánica
mM:	Milimolar
NTA:	Ácido nitrilotriacético
PS:	Fitosiderosporas
SA:	Suelo Agrícola
SIAP:	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
Ton:	Toneladas
t_R:	Tiempo de retención
UE:	Unión Europea
USD:	Dólares estadounidenses
ZMM:	Zona Metropolitana de Monterrey

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación de suelos por metales pesados

La contaminación por metales pesados en suelos ha tomado mayor relevancia a nivel mundial debido principalmente al riesgo de acumulación y transferencia de éstos a través de la cadena alimenticia (Todd y Ruby, 2004), además del potencial que tienen para alcanzar cuerpos de agua subterráneos debido a filtraciones y escorrentías (Sun *et al.*, 2001).

En México, se ha encontrado una gran cantidad de sitios contaminados con diversos compuestos orgánicos e inorgánicos (Volke y Velasco, 2002), los cuales provienen principalmente de actividades industriales, tales como la minería y los procesos petroquímicos. Además, los derrames y la disposición clandestina de residuos peligrosos representan un aporte importante a la contaminación por metales en los suelos (Todd y Ruby, 2004).

1.2 Tecnologías de remediación de sitios contaminados

Una de las tareas más difíciles para los investigadores es la búsqueda de tecnologías efectivas, ambientalmente amigables y de bajo costo para remediar sitios contaminados con metales pesados. A la fecha, gran parte de la investigación se ha enfocado al desarrollo de diversas técnicas *in situ*

para la remediación de sitios contaminados, esto debido a que las tecnologías de limpieza convencionales en áreas extensas comúnmente se asocian con altos costos de operación y pueden afectar las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Por ejemplo, Volke y Velasco (2002) y Todd y Ruby (2004) reportan que las tecnologías de solidificación/estabilización *ex situ* tienen la desventaja de incrementar el volumen del desecho en un 10-30% debido al uso de aditivos solidificantes. Además su costo puede ser significativamente alto (≈ 500 USD ton suelo⁻¹) debido al uso de maquinaria y equipo especial. De igual manera, la aplicación de técnicas de lavado de suelos *in situ* pueden verse limitadas debido a que algunos solventes y soluciones utilizadas pueden perturbar las propiedades fisicoquímicas del suelo además de tener un alto costo (≈ 550 USD ton suelo⁻¹). Por otro lado, las tecnologías de bioremediación *in situ* tienen la ventaja de realizarse sin retirar el suelo contaminado del lugar, lo que reducen considerablemente los costos del proceso de remediación (Luo *et al.*, 2008; Pierzynski *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2001).

1.2.1. Fitoextracción

Dentro de las tecnologías de fitoremediación (*i.e.* uso de plantas para reducir, remover, degradar o inmovilizar contaminantes en el ambiente), la más especializada para la remoción de metales pesados es la fitoextracción. Esta técnica ha sido estudiada durante los últimos años debido a su costo relativamente bajo (≈ 100 USD ton suelo⁻¹) (Volke y Velasco, 2002; Todd y Ruby, 2004) y por ser estéticamente agradables al público en comparación

con las tecnologías tradicionales de remediación (Luo *et al.*, 2008; Peer *et al.*, 2005; Pierzynski *et al.*, 2005).

1.2.1.1 Fitoextracción asistida químicamente (FEAQ)

Debido a la baja solubilidad y disponibilidad de metales generalmente encontrada en los sitios contaminados, se han desarrollado técnicas de fitoextracción asistida por agentes quelantes utilizando especies acumuladoras con alta producción de biomasa y rápido crecimiento (*e.g.* mostaza (*Brassica juncea*)) (Keller *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2006a). Los quelantes más comúnmente utilizados en suelos para estimular la fitoextracción son: el EDTA, NTA y DTPA. Estos agentes secuestrantes sintéticos, aunque efectivos, tienen la desventaja de ser no selectivos, además de tener el potencial, si son aplicados sin precaución, de movilizar metales a suelo circundante no contaminado y/o aguas subterráneas (Tood y Ruby, 2004).

Estudios más recientes han sugerido el uso de los ácidos orgánicos de bajo peso molecular (AOBPM) para solubilizar metales en suelos y facilitar su extracción por plantas. Estos AOBPM tienen la ventaja de que son fácilmente biodegradables y por lo tanto pueden minimizar los riesgos de lixiviado de metales al subsuelo (Nascimento *et al.*, 2006a). La Tabla 1.1 muestra investigaciones recientes sobre la aplicación de AOBPM en estudios de FEAQ.

Tabla 1.1 Antecedentes relevantes sobre estudios de FEAQ utilizando AOBPM como agentes solubilizantes.

Autores (año)	Plantas	AOBPM* (mM kg ⁻¹)	Concentración total de metales en suelo (mg kg ⁻¹)	Aportación
Chaves de Melo et al. (2008)	1. <i>Stizolobium aterrimum</i>	Cítrico y gálico: 5 Una aplicación simple en el día 28 de crecimiento, dos dosis en el día 28 y 31 y tres aplicaciones al día 28, 31 y 34 de crecimiento.	Cd: 20 Pb: 150 Cu: 100 Zn: 150.	1. Los AOBPM mostraron tener pocos efectos fitotóxicos. 2. Múltiples aplicaciones de ácido cítrico aumentaron la fitoextracción de metales (Cd, Pb, Cu y Zn), pero el ácido gálico no presentó este efecto, por lo que sugieren la realización de más estudios en las dosis y tiempos de aplicación de AOBPM.
Liu et al. (2008)	1. <i>Sedum alfredii</i> Hance ecotipo hiperacumulador 2. <i>Sedum alfredii</i> Hance ecotipo no hiperacumulador.	Cítrico, tartárico y oxálico: 500, 1000, 2000 y 2500.	Pb: 1015 Zn: 2209 Cd: 20.9 Cu: 2013	1. Se encontró que la aplicación de AOBPM aumentó el grado de solubilidad de Zn, Cu y Cd. La solubilidad es directamente proporcional a la concentración aplicada de los AOBPM.
Nascimento et al. (2006a)	1. <i>Brassica juncea</i>	Oxálico, cítrico, vinílico y gálico: 10.	Pb: 500 Zn: 300 Cd: 50 Cu y Ni: 200	1. El ácido cítrico y gálico fueron capaces de solubilizar cantidades sustanciales de Cd, Zn, Cu y Ni del suelo, con baja fitotoxicidad y sin incrementar los riesgos de lixiviado de éstos metales. 2. La solubilización neta de estos metales por los AOBPM puede ser tan eficiente como el uso de quelantes sintéticos para el uso en fitoextracción utilizando mostaza de la india.
Evangelou et al. (2006a)	1. <i>Nicotiana tabacum</i> SR-1	Cítrico, oxálico y tartárico a concentraciones de 62.5, 125, 250.	Cu: 225 y 450 Pb: 300 y 600	1. Los AOBPM, especialmente el ácido cítrico intensificaron la biodisponibilidad de Cu, pero mostraron ineficiencia en la fitoextracción de Pb.

1.3 Función y producción de exudados radiculares

Ante ciertas situaciones de estrés ambiental (e.g. crecimiento en suelos con deficiencia en nutrientes, toxicidad por metales pesados), algunas plantas pueden presentar una respuesta fisiológica liberando compuestos que pueden modificar el pH del suelo (protones, bicarbonatos, ácidos orgánicos) o pueden reaccionar exudando ligandos orgánicos (ácidos orgánicos, fitosideroporas) para solubilizar los nutrientes necesarios para su desarrollo (Sterckeman, 2005; Neumann, 2007). Estos procesos, los cuales son altamente específicos de acuerdo a las especies vegetales, el estatus nutricional de la planta y las condiciones del suelo, pueden modificar la solubilidad y la disponibilidad de elementos traza en el suelo (Evangelou *et al.*, 2006a). En la Tabla 1.2 y 1.3, se presentan antecedentes de estudios sobre exudados radiculares, producidos por diferentes especies de plantas y sus efectos en la química de metales en suelo y/o hidroponía.

Tabla 1.2 Antecedentes relevantes en la caracterización de exudados radiculares de distintas especies de plantas y sus efectos en la química de metales en suelo y/o hidroponía.

Autores (año)	Plantas utilizadas	Concentración de metales pesados en suelo (mg kg^{-1}) ó hidroponía (mg mL^{-1})	Composición de exudados	Aportación
Srivastava et al. (1999)	Maíz (<i>Zea mays</i>)	Cultivo hidropónico: Cr^{3+} y Cr^{6+} : 5	AOBPM: cítrico, málico Aminoácidos: ácido aspártico y glicina.	La adición de AOBPM condujo a un aumento en la absorción de Cr^{3+} por maíz, debido a interacciones entre el Cr^{3+} con los ácidos orgánicos formando complejos móviles. La absorción de Cr^{6+} se vió disminuida. Los AOBPM podrían contribuir hacia la reducción del Cr^{6+} hacia Cr^{3+} .
Nigam et al. (2001)	Maíz (<i>Zea mays</i>)	Cultivo hidropónico: Cd: 5	AOBPM: ácido cítrico, málico. Aminoácidos: ácido aspártico y glicina.	La capacidad de complejación con cadmio fue en orden: ácido cítrico > málico > aspártico \approx glicina, concluyendo que los aminoácidos no juegan un papel importante en la movilización de metales.
Gaume et al. (2001a)	Maíz (<i>Zea mays</i>) L. Corso y L. Sicuani	Cultivo hidropónico: $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$: 34	AOBPM: málico, succínico y cítrico.	Las especies tolerantes a Al, tienen una mayor secreción de exudados. La secreción de ácidos orgánicos parece ser mediado por transportadores que son activados o inducidos por Al. Esto puede ser evidencia de que la exudación de ácidos orgánicos puede proveer un mecanismo de tolerancia a Al.
Chen et al. (2002)	N/A	Suelo de bosque de coníferas: Cu 6.25, Zn 8.27, Fe: 14.26, Mn: 7.14, Mg: 0.077. Suelo café oscuro: Mg: 0.061, Fe: 15.87, Mn: 8.25, Cu: 4.68, Zn: 9.27. Suelo negro: Mg: 0.067, Fe: 12.54, Mn: 6.36, Cu: 4.97, Zn: 8.46. Suelo negro alcalino: Mg: 0.082, Fe: 9.62, Mn: 7.65, Cu: 5.33, Zn: 5.94.	AOBPM: ácido cítrico y málico $500 \mu\text{mol L}^{-1}$	Los AOBPM pueden activar los nutrientes del suelo. El grado en el cual los nutrientes son activados es altamente dependiente de la cantidad y el tipo de ácidos orgánicos excretados y las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de los suelos de prueba.

Tabla 1.3 Antecedentes relevantes en la caracterización de exudados radiculares de distintas especies de plantas y sus efectos en la química de metales en suelo y/o hidroponía.

Autores (año)	Plantas utilizadas	Concentración de metales pesados en suelo (mM kg^{-1}) ó hidroponía (mg L^{-1})	Composición de exudados	Aportación
Bacilio et al. (2003)	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	N/A	Aminoácidos: histidina, prolina, valina, alanina, glicina, ácido aspártico, arginina, tirosina, metionina. Carbohidratos: manosa, galactosa, glucosa, glucuronato, xilosa y arabinosa.	La composición de los exudados liberados depende de la duración de crecimiento de la planta.
Feng et al. (2003)	Festuca roja (<i>Festuca rubra</i> L.) var. Rubina y Barnica	Cultivo hidropónico: deficiente en Fe.	DMA (ácido 2(S),3-(S),3-(S)-N-[3-(3-hidroxi-3-carboxipropilamino)-3-carboxipropil]-azetidina-2-carboxílico).	El DMA presentó actividad complejante de Fe en los exudados de plantas en cultivos con deficiencia de Fe. La secreción de DMA puede ser inducida por la deficiencia de Fe. La secreción de DMA por las raíces de <i>Festuca rubra</i> puede ser el responsable parcial de la transformación de Fe insoluble a sus formas fitodisponibles.
Hoffland et al. (2006)	7 genotipos de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	Suelo e hidroponía con deficiencia de Zn y P.	AOBPM: cítrico, oxálico, málico, malónico, maléico, fumárico, tartárico y succínico.	Los genotipos más tolerantes a la deficiencia de Zn y P, exudaron una mayor cantidad de AOBPM. Esta exudación puede ser la explicación para la tolerancia a suelos con baja concentración de Zn y P.
Liu et al. (2007)	Dos variedades de arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Suelo: 3 tratamientos de Cd: 0, 10 y 50.	AOBPM: ácido acético, fórmico, málico, tartárico, oxálico y cítrico	Existe diferencia en la composición y excreción de exudados entre variedades de plantas. Cultivos con alta acumulación de Cd secretan más que cultivos de baja acumulación de Cd. La secreción de AOBPM se favorece en medios bajo condiciones de estrés por Cd. El ácido acético y fórmico representaron el 96% del total de ácidos orgánicos presentes en los exudados.
Degryse et al. (2008)	Espinaca (<i>Spinacia oleracea</i> L.) y tomate (<i>Lycopersicon</i>)	Cultivo hidropónico: Diversos experimentos variando la actividad de Zn^{2+} (pZn) y/o la actividad	N/C	Los exudados radiculares pueden movilizar metales y probablemente pueden afectar la absorción de metales por las plantas. Puede existir la presencia de otros ligandos, además de carboxilatos (AOBPM), tales como algunos compuestos orgánicos o aromáticos. Se sugieren más estudios para evaluar la importancia de estos procesos.

	<i>esculentum</i> L.),	de Cu ²⁺ (pCu) y/o utilizando una resina quelante. Suelo: 4 tratamientos de metales: no añadido, +Cu (50), +Zn (10) o +Cu/Zn (50/100).		
Luo et al. (2008)	Cebada (<i>Hordeum vulgare</i> L. var. Jian 4) Chicharo (<i>Pisum sativum</i> L. Var. Qinxuan No. 2)	Suelo: Cu (400), Pb y Zn (500), Cd (15).	N/C	La liberación de exudados por plantas puede movilizar metales pesados. Los exudados radiculares excretados por la cebada pudieron haber causado la acumulación de una gran cantidad de metales en chícharo, cuando fueron cultivadas en un cultivo mixto. No está claro cuál es el componente de los exudados directamente responsable del aumento en la concentración de metales en chícharo en el sistema de cultivo mixto.

La producción y composición de los exudados radiculares pueden además verse afectados por factores físicos, químicos y biológicos presentes en la planta o su entorno. La Tabla 1.4 presenta los factores que pueden afectar la composición de los exudados radiculares.

Tabla 1.4 Factores que afectan la producción y composición de exudados radiculares

Factor	Efecto	Referencia
pH del suelo	Acidificación de la rizósfera por cambios en la composición de exudados	Hinsinger <i>et al.</i> 2003
Textura del suelo	Las raíces de las plantas que crecen en arena producen mejores cantidades de exudados que aquellas que crecen en arcilla o solución nutritiva debido a la impedancia mecánica producida por las partículas de arena. La impedancia mecánica puede incrementar la producción de exudados radiculares.	Groleau-Renaud <i>et al.</i> 1998
Reducción de potencial	Las plantas producen diferente composición de exudados bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas.	Hinsinger <i>et al.</i> 2003; Legnani <i>et al.</i> 2010
Intensidad de luz	La intensidad de la luz afecta los tiempos de fotosíntesis de las plantas, por lo tanto afecta la translocación de nutrientes a la rizósfera y la secreción de exudados. Alta exposición a la luz incrementa la producción de exudados.	Rinnan <i>et al.</i> 2006
Temperatura del suelo	Afecta la fotosíntesis, la translocación de las fotosintasas a la raíz y las reacciones enzimáticas. Elevadas temperaturas incrementan la exudación.	Neumann, 2007
Contenido de humedad en el suelo	Cuando el sistema radicular experimenta estrés de falta de agua incrementa la exudación.	Neumann y Römheld 2000
Disponibilidad de nutrientes	Deficiencia de Fe, P, Zn y/o Cu incrementan la secreción de exudados radiculares.	Abadía <i>et al.</i> 2002; Feng <i>et al.</i> 2003; Hoffland <i>et al.</i> 2006
Especies de plantas y cultivos	Las distintas especies de plantas y/o plantas cultivadas en diversos medios difieren en la composición química de sus exudados radiculares.	Lui <i>et al.</i> 2007; Hoffland <i>et al.</i> 2006
Propiedades físicas de la rizósfera	Diferente estructura física de la rizósfera puede tener diferente microhábitat para diferentes microorganismos e induce la exudación con una	Shane <i>et al.</i> 2008; Bacilio <i>et al.</i> 2003.

	composición química específica. Las raíces en "racimo" se han asociado con un incremento localizado de exudados radiculares.	
Edad de las raíces	Los exudados son secretados más frecuentemente por las raíces en estados iniciales de crecimiento.	Hodge <i>et al.</i> 2009; Neumann, 2007
Microorganismos	La presencia de microorganismos incrementa la producción de exudados, además de que los utilizan como sustrato de crecimiento.	Bacilio <i>et al.</i> 2003; Dakora y Phillips, 2002
Condiciones de estrés	Estrés por deficiencia de nutrientes, fitotoxicidad, estrés por falta de agua, concentración de O ₂ y CO ₂ , temperaturas extremas, pH y concentración de sales pueden cambiar la composición de exudados radiculares.	Pál <i>et al.</i> 2006; Tu <i>et al.</i> 2004; Legnani <i>et al.</i> 2010; Greger y Landberg, 2008
Relación NH₄⁺/NO₃⁻	Las plantas que crecen bajo la presencia de NH ₄ ⁺ tienen bajas concentraciones de ácidos orgánicos en sus exudados.	Neumann y Römheld, 2000

Dentro de las especies reportadas con capacidad de liberar exudados radiculares, se encuentran el trigo (*Triticum spp*), mijo (*Pennisetum americanum*), cebada (*Hordeum vulgare*), arroz (*Oryza sativa*) y avena (*Avena sativa*) (Wang *et al.*, 2007; Tabla 1.2 y 1.3).

1.3.1. Exudación de AOBPM por plantas

Los exudados radiculares se pueden clasificar en dos grupos: exudados radiculares de bajo peso molecular y exudados radiculares de elevado peso molecular. Los ácidos orgánicos presentes en los exudados radiculares, son generalmente del tipo AOBPM y éstos son liberados hacia la solución de suelo mediante difusión pasiva a través de la bicapa lipídica y mediante canales de proteínas presentes en la membrana plasmática (Jones, 1998). Éstos ácidos orgánicos han sido involucrados en diversos procesos del suelo, que incluyen la movilización y absorción de nutrientes por las plantas (e.g. P y Fe) y microorganismos (Hoffland *et al.* 2006), detoxificación de

metales por plantas (e.g. Al) (Gaume *et al.* 2001), proliferación microbiana en la rizósfera (Bacilio *et al.* 2003), entre otros procesos.

Existe evidencia en la literatura de la separación de éstos AOBPM liberados en los exudados radiculares de las plantas en ácido pirúvico, fumárico, málico, oxálico, láctico, malónico, maléico, succínico, tartárico, aconítico, y cítrico por medio de técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Wang *et al.*, 2007; Chen *et al.* 2007) y por cromatografía de exclusión molecular con fuente de ionización por electrospray acoplado a un detector de espectrometría de masas (Chen *et al.* 2008; Erro *et al.* 2009).

Dada esta evidencia y tomando ventaja de la fisiología de producción de exudados por ciertas plantas, se podría sugerir su uso en conjunto con técnicas de fitoextracción. Esto sería posible mediante: 1) cultivos mixtos (plantas productoras de exudados radiculares junto con plantas acumuladoras de metales), o 2) adición al suelo de AOBPM que simulen la composición de los exudados radiculares en una planta productora de éstos a un sistema de FEAQ. Mediante éstas técnicas se podría hacer más eficiente la fitoextracción de metales pesados en sitios contaminados, minimizando costos y posibles daños ambientales.

Actualmente existen pocos estudios que evalúen dichas técnicas para hacer más eficiente los procesos de fitoextracción (Luo *et al.*, 2008), además existe poca información acerca de la caracterización y la importancia relativa de cada AOBPM presente en los exudados en la fitodisponibilidad de los

metales. De igual manera, la selectividad de cada uno de los ácidos orgánicos para solubilizar metales específicos ha sido poco estudiada (ver Tabla 1.2 y 1.3). Debido a esto, en el presente estudio se pretende: *(i)* desarrollar una metodología para la extracción y caracterización de los AOBPM presentes en los exudados de una planta productora, *(ii)* evaluar el efectos del o los AOBPM en la solubilidad de Pb en un suelo contaminado de la Zona Metropolitana de Monterrey (ZMM) y *(iii)* modelar la especiación química del Pb en la fracción soluble del suelo mediante el programa de especiación y saturación mineral VisualMINTEQ 3.0.

1.4 Justificación

Debido a la necesidad de desarrollar tecnologías sustentables y de bajo costo para la remediación de sitios contaminados, y sobre todo a la poca información que hay referente a la caracterización de exudados para su posible aplicación en programas de FEAQ, el presente trabajo se enfoca en la producción, extracción y caracterización de los Ácidos Orgánicos de Bajo Peso Molecular presentes en exudados radiculares de *Zea mays*, así como la evaluación de la solubilidad del plomo por el o los AOBPM encontrados en los exudados radiculares para proponer posibles usos de éstos en la remediación de suelos contaminados con plomo.

1.5 Hipótesis

Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular (AOBPM) caracterizados de los exudados radiculares del maíz (*Zea mays* var. Asgrow) aumentan la solubilidad de Pb en un suelo contaminado de la ZMM.

1.6 Objetivos

1.6.1. Objetivo general

Producir, extraer y caracterizar los exudados liberados por maíz (*Zea mays* var. Asgrow) y evaluar sus posibles aplicaciones para la remediación de sitios contaminados con plomo.

1.6.2. Objetivos específicos

- Identificar especies productoras de exudados radiculares nativas o adaptadas a las condiciones geoclimáticas de México.
- Implementar una metodología para la extracción y caracterización de los AOBPM presentes en los exudados de la planta seleccionada.
- Evaluar el efecto del o los AOBPM en la solubilidad de Pb en un suelo contaminado.
- Modelar la especiación química del Pb influenciada por los AOBPM en un suelo contaminado utilizando el modelo VisualMINTEQ 3.0 (2009).
- Discutir la aplicación de los resultados obtenidos para la remediación de suelos contaminados mediante técnicas de FEAQ o mediante el uso de cultivos mixtos.

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Equipos y materiales utilizados

Tabla 2.1 Material y equipos utilizados durante el desarrollo del proyecto y su localización.

Fase experimental y/o determinación	Material y Equipo	Ubicación	Sección
Selección de la especie vegetal y adaptabilidad a cultivo hidropónico	Recipientes de plástico de 3.0 L y 6.0 L, charolas de propagación de 200 pocillos, papel filtro, estufa aireada (Quincy Lab. Inc. 40GC), material de uso general.	LICAA	Sección 2.2
Producción de exudados en cultivo hidropónico	Recipientes de plástico de 3.0 L, charolas de propagación de 200 pocillos, Tubos Falcon de 50 mL, bombas de aireación, piedra de río, material de uso general.	LICAA	Sección 2.3
Determinación de exudados radiculares	Resina de intercambio catiónico Amberlita, resina de intercambio aniónico Dowex, jeringas no estériles de 10 mL, Tubos de ensaye 18x150, matraz kitazato 500 mL, bomba de vacío, filtros de membrana Millipore 0.22 µm, Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, marca Waters,	LICAA	Sección 2.4

	modelo 2996, detector con arreglo de diodos y fuente UV-Vis, columna de intercambio iónico PREVAIL organic acid™ (250 x 4.6 mm, 5 µm)		
Muestreo	Pala, pico, bolsas de plástico, tamíz de 4 mm y de 2 mm.	LICAA, IB	Sección 2.5.1
Secado	Estufa aireada (Quincy Lab. Inc. 40GC)	LICAA	Sección 2.5.1
Textura	Hidrómetro de Bouyoucos, probeta graduado a 1 L, batidora, termómetro (110 °C).	IB	Sección 2.5.1
pH	Potenciómetro (Bechman), Shaker (Lab-line 3527)	IB	Sección 2.5.1
Materia Orgánica	Material de uso general	LICAA, IB	Sección 2.5.1
Capacidad de Campo	Material de uso general	LICAA, IB	Sección 2.5.1
Humedad	Estufa aireada (Quincy Lab. Inc. 40GC)	LICAA	Sección 2.5.1
Extracción de Metales en suelo	Plancha de termoagitación (Thermolyne Cimarec 3), campana de extracción (Labconco Basic 47)	IB	Sección 2.5.1
Determinación de Metales en suelo y solución de suelo	Espectrofotómetro de absorción atómica (GBC 932).	LSO, LAI	Sección 2.5.1 y 2.5.2.3
Material de uso general	Pipetas serológicas de 1, 5 y 10 mL, pipetor automático de 1, 5 10 mL, vasos de precipitado, matraces volumétricos, probeta de 100 mL, tubos Falcon de 50 mL, balanza analítica (AND GF-200).	LICAA	

2.2 Selección de la especie vegetal

2.2.1. Plantas

Con la finalidad de seleccionar la especie vegetal para la producción de exudados radiculares, se realizó un experimento bajo condiciones semi-controladas a temperatura ambiente, con un ciclo de 16 h de luz/8 h de oscuridad para evaluar la adaptabilidad de 7 variedades de plantas (*Oryza sativa*, *Triticum spp*, *Zea mays*, *Linum usitatissimum*, *Glycine max*, *Pennisetum americanum* y *Panicum miliaceum*) bajo condiciones de deficiencia de micronutrientes en solución nutritiva. Como controles se incluyeron las mismas especies vegetales cultivadas en macetas conteniendo peat-moss (peat) y suelo agrícola (SA), además de un tratamiento en solución nutritiva completa (1X) con macro y micronutrientes. En primera estancia se germinaron en un recipiente de plástico de 3.0 L con papel filtro irrigado con agua desionizada, semillas de arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum spp*), maíz Asgrow (*Zea mays*), linaza (*Linum usitatissimum*), soya (*Glycine max*), mijo blanco (*Pennisetum americanum*) y mijo rojo (*Panicum miliaceum*). La germinación ocurrió a las 36-48 h. Posteriormente se realizó un transplante a peat, donde las plantas permanecieron de 48-76 h adicionales, la irrigación se realizó con agua desionizada. Una vez pasado este tiempo, 3 plantas de cada especie se trasplantaron a sus respectivos tratamientos: tratamiento 1 (T1), maceta con aproximadamente 3 kg de suelo agrícola (peso seco), tratamiento 2 (T2): maceta con aproximadamente 1 kg peat, tratamiento 3 (T3): recipiente de plástico con 6

litros de solución nutritiva completa (ver Tabla 2.2) y tratamiento 4 (T4): recipiente de plástico con 6 litros de solución nutritiva incompleta (deficiente en micronutrientes). Los tratamientos en solución nutritiva (T3 y T4) se efectuaron con aireación constante. Mientras que los tratamientos T1 y T2 se irrigaron con agua desionizada.

2.2.2. Solución nutritiva

Con el fin de evaluar la adaptabilidad al cultivo hidropónico se utilizaron 2 soluciones nutritivas denominadas:

- Solución nutritiva completa (Stock A, B, C, D; Tabla 2.2) (e.g. HD M (+)) y
- Solución nutritiva deficiente en micronutrientes (Stock A y B; Tabla 2.2) (e.g. HD M (-)).

La composición de las soluciones nutritivas se presenta en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Composición química de la solución nutritiva (López-Chuken y Young, 2010).

	Fórmula química	Nombre químico	Masa	g L ⁻¹	(M)	Para solución (1x)	preparar completa	Concen-tración final (mM)
Stock A	KNO ₃	Nitrato potasio	de 101.11	101.11	1			5
	KH ₂ PO ₄	Difosfato potasio	de 136.09	27.22	0.2	5		1
	MgSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	de 246.48	98.6	0.4			2
Stock B	Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	Nitrato de calcio	de 236.15	295.18	1.25	5		6.25
Stock C	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	61.83	2.86	46 (mM)			46 (μM)
	MnCl ₂ 4H ₂ O	Cloruro de magnesio	197.91	1.81	9.15 (mM)			9.15 (μM)
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato de zinc	287.54	0.22	765 (μM)	1		765 (nM)
	CuSO ₄ 5H ₂ O	Sulfato de cobre	249.69	0.08	320 (μM)			320 (nM)
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	Molibdato de amonio	1235.9	0.0019	15 (μM)			15 (nM)
Stock D	FeSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato de hierro	de 278.01	1.388	5 (mM)			20 (μM)
	Na ₂ EDTA	Ácido etilen diaminotetraacético	372.24	1.833	4.9 (mM)	4		20 (μM)

Solución 1x: Solución nutritiva completa (stock A, B, C, D)

2.2.3. Determinación de biomasa fresca y seca

Pasados 20 días de cada tratamiento (T1, T2, T3 y T4), las plantas se cosecharon y se determinó el peso fresco de cada planta (tallo y raíz por separado) en una balanza analítica. Los tallos y raíces se colocaron en sobres de papel por separado y se secaron en estufa aireada a 60-70°C por

24 h, para luego determinar el peso seco de las plantas (tallo y raíz) en balanza analítica.

2.3 Inducción de la producción de exudados radiculares en cultivo hidropónico

2.3.1. Diseño de solución nutritiva

La solución nutritiva empleada para la inducción de la producción de exudados se eligió en base a los requerimientos de las plantas y a la deficiencia de micronutrientes inductores de producción de exudados (Chaignon *et al.* 2002; Jones, 1998; Abadía *et al.* 2002). Con la finalidad de evaluar la producción de exudados radiculares, para este experimento se aplicaron un control y dos tratamientos. El control consistió en la producción de exudados radiculares en un recipiente de plástico con 1.5 L de solución nutritiva completa (Completo) (Stock A, B, C y D; Tabla 2.2) y los tratamientos fueron: un recipiente con 1.5 L de solución nutritiva deficiente en micronutrientes sin impedancia mecánica (HD I (-)) y un recipiente de plástico con 1 L solución nutritiva deficiente en micronutrientes con aproximadamente 1 kg de piedra de río (diámetro \cong 10 mm) como impedancia mecánica (HD I (+)) (Stock A y B; Tabla 2.2). Los tratamientos se realizaron bajo condiciones semi-controladas a temperatura ambiente, con un ciclo de 16 h de luz/8 h de oscuridad y con aireación constante.

2.3.2. Extracción de exudados radiculares

Para la extracción de exudados, semillas de maíz (*Zea mays* var. Asgrow) se colocaron en un recipiente plástico con papel filtro irrigado con agua desionizada. La germinación ocurrió a las 48 h. Posteriormente se realizó un trasplante en charolas de germinación con peat para su crecimiento durante 48 h adicionales, con la finalidad de permitir el crecimiento de la planta para una mejor manipulación durante el trasplante a cultivo hidropónico (sección 2.3.1). Finalizado este período de tiempo, las plantas se transfirieron a recipientes de plástico con los distintos tratamientos (Completo, HD I (+) y HD I (-)) para el crecimiento de las plantas previo a la extracción de exudados radiculares (sección 2.3.1). Las plantas se cultivaron bajo condiciones semi-controladas a temperatura ambiente, con un ciclo de 16 h de luz/8 h de oscuridad. Las soluciones nutritivas se mantuvieron con aireación y fueron reemplazadas cada tercer día.

Se tomaron 5 muestras de exudados de cada tratamiento (Imagen 2.1) correspondientes a los días 5, 10, 15, 21 y 23 post-germinación respectivamente en tubos de plástico con capacidad de 50 mL con 40 mL de CaCl_2 0.1 mM estéril durante 4 h. La toma de muestras se realizó en base a los días post-germinación (Hofflad *et al.* 2006; Luo *et al.* 2008) eligiéndose los primeros 23 días post-germinación para facilitar la manipulación de plantas y muestras de exudados (Chang *et al.* 2003).

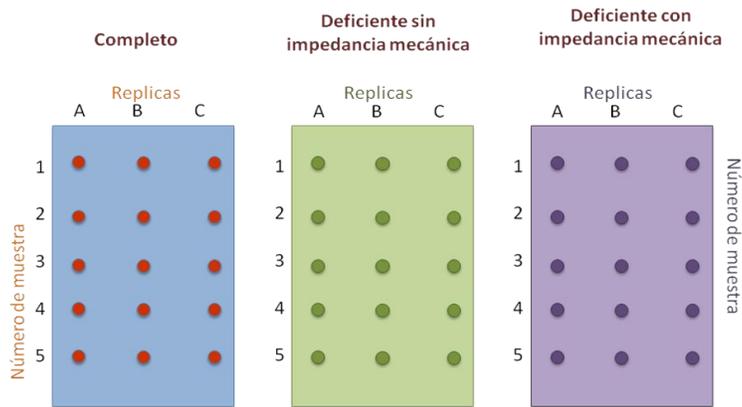


Imagen 2.1 Esquema general de la toma de muestras en los distintos tratamientos

La toma de muestras de plantas para la extracción de exudados se realizó por triplicado y mediante el procedimiento descrito en la Figura 2.1.

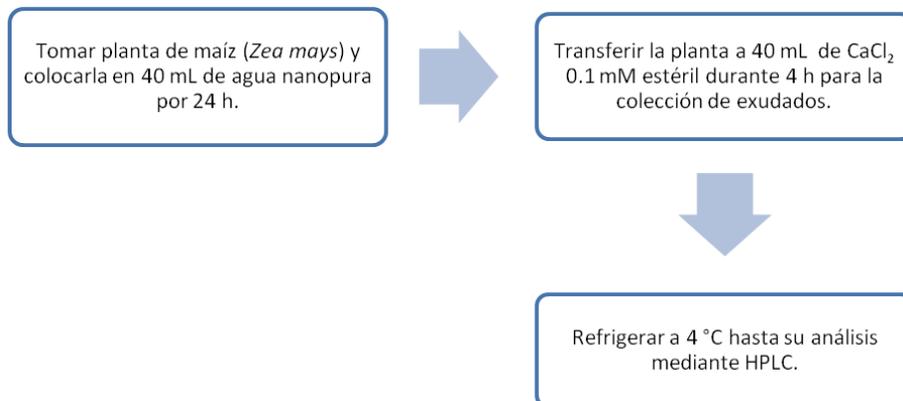


Figura 2.1 Esquema general de la toma de muestras de exudados radiculares producidos por maíz (*Zea mays* var. Asgrow).

Se realizaron 2 experimentos de extracción de exudados radiculares: (1) 30 de noviembre al 21 de diciembre del 2009 y (2) 6 de febrero al 1 marzo del 2010. El primer experimento de extracción de exudados radiculares, se realizó con la finalidad de identificar los AOBPM presentes en los exudados radiculares de maíz (*Zea mays* var. Asgrow) y evaluar la tendencia de exudación respecto al tiempo. El segundo experimento de extracción de exudados se efectuó para caracterizar y cuantificar los AOBPM presentes en los exudados radiculares de la planta de estudio.

2.4 Determinación de exudados radiculares

2.4.1. Purificación y pre-concentración de exudados radiculares

La amplia variedad de compuestos orgánicos exudados por las plantas (Tabla 1.2 y 1.3) aunado a las bajas concentraciones de ácidos orgánicos presentes en las rizodeposiciones, sugiere aplicar un método para la purificación y pre-concentración de muestras para una caracterización donde la matriz no interfiera de manera significativa en el análisis de AOBPM presentes en los exudados radiculares de *Zea mays* (var. Asgrow). La metodología para la purificación y pre-concentración de exudados radiculares se muestra en la Figura 2.2.

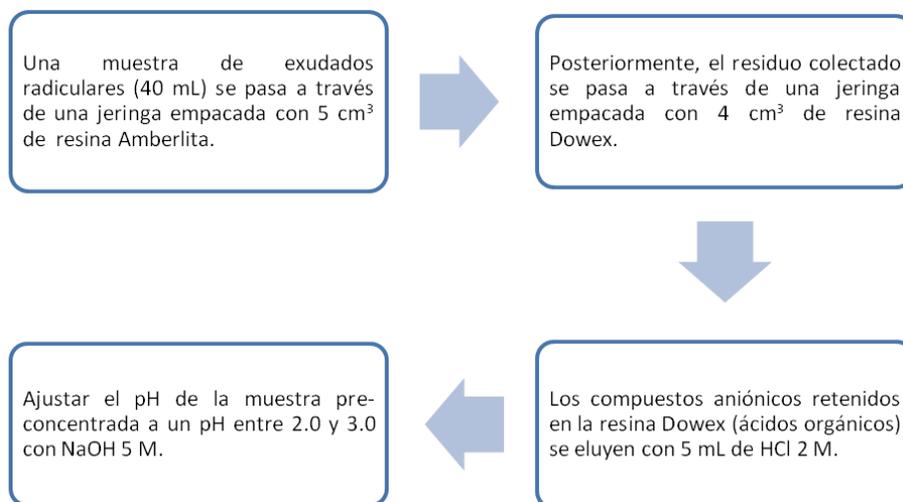


Figura 2.2 Esquema general de la purificación y pre-concentración de muestras exudados radiculares producidos por maíz (*Zea mays* var. Asgrow).

La purificación de las muestras de exudados radiculares se realizó mediante la resina de intercambio catiónico Amberlita con la finalidad de eliminar componentes catiónicos en las muestras de exudados radiculares y facilitar su caracterización. La pre-concentración de los exudados se llevó a cabo mediante una resina de intercambio aniónico Dowex. Finalmente la elución de los ácidos orgánicos retenidos se realizó mediante HCl 2M (Legnani, *et al.* 2010; Moreno, *et al.* 2007; Zheng, *et al.* 2005). Para el análisis de las muestras purificadas y pre-concentradas en HPLC, se realizó una división de fracciones para evaluar el efecto del proceso de purificación y pre-concentración. En la Figura 2.3 y la Tabla 2.3 se presentan las fracciones provenientes del proceso de purificación y pre-concentración.

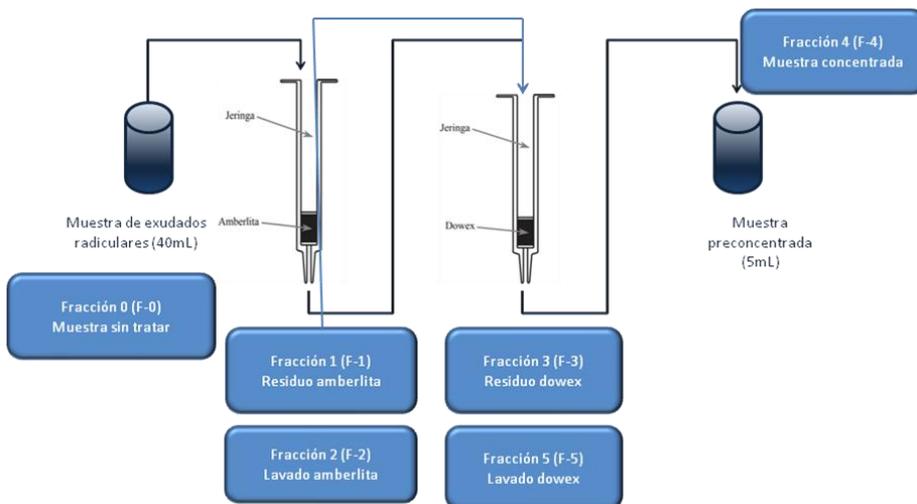


Figura 2.3 División de fracciones en el proceso de purificación y pre-concentración de exudados radiculares de maíz (*Zea mays* var. Asgrow).

Tabla 2.3 Descripción de las fracciones provenientes del proceso de purificación y pre-concentración.

Fracción	Descripción
Fracción 0. Muestra sin tratar	Fracción de muestra sin tratamiento de purificación y pre-concentración
Fracción 1. Residuo Amberlita	Residuo proveniente de pasar la muestra a través de la resina Amberlita.
Fracción 2. Lavado Amberlita	Fracción proveniente del lavado de la resina Amberlita con 5 mL de agua nanopura.
Fracción 3. Residuo Dowex	Residuo proveniente de pasar la muestra (que previamente pasó por la resina Dowex) a través de la resina Dowex.
Fracción 4. Muestra concentrada	Fracción proveniente de la elución con 5 mL de HCl 1M de los componentes retenidos en la resina Dowex.
Fracción 5. Lavado Dowex	Fracción proveniente del lavado de la resina Dowex con 5 mL de agua nanopura posterior a la elución de los componentes retenidos en la resina.

2.4.2. Caracterización y cuantificación de AOBPM presentes en los exudados radiculares

Dado que los ácidos orgánicos liberados por las plantas tienen propiedades de intercambio aniónico, la separación y análisis de los exudados se realizó mediante un análisis de HPLC con detector de arreglo de diodos y una fuente UV-Vis a 210nm y una columna de intercambio iónico (Prevail® organic acid, 250 x 4.6 mm, 5µm). Los parámetros cromatográficos se presentan en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4 Condiciones cromatográficas para la caracterización de ácidos orgánicos presentes en los exudados radiculares de *Zea mays*.

Columna	Columna Prevail™ Organic Acid (250 x 4.6 mm, 5µm)
Temperatura de la columna	Ambiente (≈ 25°C)
Fase móvil	Buffer de fosfatos (25mM KH ₂ PO ₄ : 15mM H ₃ PO ₄ , pH: 1.5)
Elución	Isocrática
Velocidad de flujo	1.0 mL min ⁻¹
Volumen de inyección	100 µL
Detector	UV a 210 nm

Para determinar la concentración del o los AOBPM presentes en los exudados radiculares de *Zea mays* se utilizaron las ecuaciones 1, 2 y 3:

$$\text{Volumen muestreado} = 40 \text{ mL}$$

$$\text{Tiempo de exudación} = 4 \text{ h}$$

$$\text{mg ácido orgánico total h}^{-1} = \frac{A \times B}{1000} \quad (1)$$

Dónde:

A = Concentración de ácido oxálico en muestras de exudados (mg L⁻¹)

B = Volumen muestreado de exudados (0.4 L)

$$\text{mmoles de ácido orgánico h}^{-1} = \frac{(\text{mg ácido orgánico total h}^{-1}) \times (1000)}{MM} \quad (2)$$

Dónde:

mg ácido orgánico total h⁻¹: mg totales de ácido oxálico por hora de exudación

MM: masa molar del ácido oxálico (90030 mg mol⁻¹)

$$\text{Unidades de exudación} = \frac{(\text{mmoles ácido orgánico h}^{-1}) \times 24}{\text{Peso fresco raíz (kg)}} \quad (3)$$

Unidades de exudación = mmol ácido orgánico kg peso fresco raíz⁻¹ día⁻¹

2.5 Modelación de la especiación química de metales en la fracción soluble del suelo

Para evaluar el efecto de los AOBPM caracterizados en los exudados radiculares de maíz (*Zea mays* var. Asgrow) sobre la especiación química de metales en la fracción soluble del suelo es necesario contar con un sitio de muestreo contaminado por metales pesados. Para ello se identificó un sitio contaminado) donde se tomaron muestras de suelo (sección 2.5.1) para caracterizar y establecer sus propiedades fisicoquímicas y contenido de metales. El contenido de metales se comparó con los LMP de metales pesados en suelo establecidos en normas nacionales (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004) e internacionales (EPA; directiva 86/278/CEE) para establecer el o los metales contaminantes que sobrepasan los LMP y finalmente se realizaron las pruebas de solubilidad en muestras de suelo para evaluar el efecto del o los AOBPM presentes en los exudados de la planta *Zea mays* var. Asgrow en la distribución del o los metales contaminantes en el suelo de estudio mediante una modelación con el programa de especiación y saturación mineral Visual MINTEQ 3.0.

2.5.1. Muestreo y caracterización del suelo contaminado por metales pesados

Muestreo de suelo en el sitio de estudio

El suelo fue colectado de un terreno ubicado en Ave. Guerrero y Progreso en Monterrey, Nuevo León, México a una latitud de $25^{\circ}41'35.03''\text{N}$ y una longitud de $100^{\circ}18'33.88''\text{O}$ (Imagen 2.2). Este sitio se localiza al noroeste del municipio de Monterrey, y comprende cerca de 1 hectárea. El sitio fue utilizado a principios del siglo XX por una empresa dedicada al refinamiento y fundición de metales, principalmente As, Ca, Bi, Pb, Co, Zn y Cd (La Jornada, 2006).

El muestreo se realizó mediante el método de triángulo-diamante-hexágono diseñado por Reetz (2001) (Imagen 2.3) con el fin de asegurar un muestreo representativo del sitio.



Imagen 2.2 Sitio de muestreo de suelo

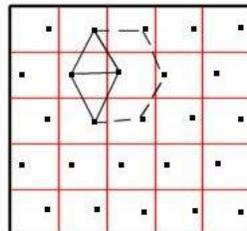


Imagen 2.3 Muestreo del Triangulo-diamante-hexágono según Reetz (2001).

Se tomaron 30 sub-muestras (200 g de suelo cada una) de los primeros 30 cm de profundidad en áreas expuestas del sitio de muestreo para posteriormente transferir las sub-muestras a un balde de plástico con la finalidad de mezclar perfectamente las sub-muestras y formar una muestra compuesta homogénea (aproximadamente 6 kg).

La muestra de suelo se cribó mediante un tamiz de 4 mm con la finalidad de eliminar residuos de plantas, piedras y palos. Posteriormente se pasó por un tamiz de 2 mm para finalmente llevar a la estufa aireada en vasos de precipitados de 1000 mL para el secado de la muestra de suelo a una temperatura de 75 °C por 48 horas.

Caracterización del suelo de estudio

Los parámetros fisicoquímicos determinados en las muestras de suelo se presentan en la Tabla 2.5. Los análisis correspondientes se realizaron por triplicado.

Tabla 2.5 Métodos utilizados para la determinación de los parámetros fisicoquímicos analizados en el suelo de estudio.

Parámetros Analizados	Método Utilizado
Textura	AS-09 NOM-021-RECNAT-2000
pH	AS-02 NOM-021-RECNAT-2000
Materia Orgánica	AS-02 NOM-021-RECNAT-2000
Capacidad de Campo	Rodríguez y Rodríguez, 2002
Humedad	AS-02 NOM-021-RECNAT-2000
Extracción de Metales Totales	ISO 11466
Cuantificación de Metales	ISO 11466

a) Humedad (H)

El método se basa en la determinación del contenido de humedad de la muestra de manera indirecta. Para dicha determinación se tararon crisoles a 100 °C y se pesaron 10 g de suelo cribado en los crisoles y se llevaron a la estufa a 100 °C por espacio de 24 horas. Se dejaron enfriar en un

deseCADador con CaCO₃ por 30 minutos y se llevaron a peso constante. Se registraron los pesos. Se utilizó la ecuación (4) para la determinación del porcentaje de humedad.

$$\% \text{ de humedad} = \frac{(M1 - M2) \times 100}{M} \quad (4)$$

Donde

M1: Peso del crisol más muestra húmeda (g)

M2: Peso del crisol más muestra seca (g)

M: Peso de la muestra sola (g)

b) Capacidad de campo (CC)

El método consiste en determinar la cantidad de agua que puede retener un suelo en saturación. Para esta determinación, se obtuvo el peso del agua pesando un vaso de precipitado y añadiéndole 100 mL de agua destilada. Se pesaron 100 g de suelo seco en vasos de unicel de 500 mL horadados en el fondo para permitir el flujo del agua. Estos se colocaron sobre un recipiente para colectar el agua filtrada a través del suelo. Se agregaron 100 mL de agua a cada uno, recirculándose tres veces el agua colectada, los vasos fueron tapados con una película plástica para evitar la pérdida de agua por evaporación, se dejaron durante 24 horas para posteriormente ser pesados.

Por diferencia de peso se determinó la capacidad de campo de cada una de las muestras analizadas con la ecuación 5:

$$\% \text{ Capacidad de campo} = P3 - P2 - P1 \quad (5)$$

Dónde:

P3: Peso drenado tras 24 horas (g)

P2: Peso de la muestra seca (g)

P1: Peso del vaso solo (g)

c) pH

La determinación del pH del suelo en estudio consistió en solubilizar los componentes principales del suelo que proveen su acidez o alcalinidad. Para ello se pesaron por separado 10 g de suelo seco de cada una de las muestras, en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Se agregaron 10 mL de agua desionizada y se colocaron en un mezclador a temperatura ambiente a 50 rpm durante 30 minutos. Se calibró el potenciómetro con las soluciones reguladoras de pH 4, 7 y 10, posteriormente se tomaron las lecturas de pH de la solución de suelo.

d) Textura

El método consiste en determinar el contenido de arcilla, arena y limo en la muestra de suelo. Una vez obtenido el porcentaje de cada componente se trazan líneas rectas a lo largo del gráfico de Clases Texturales de suelo como se muestra en la Imagen 2.4. La textura está representada en el punto donde las tres líneas trazadas convergen.

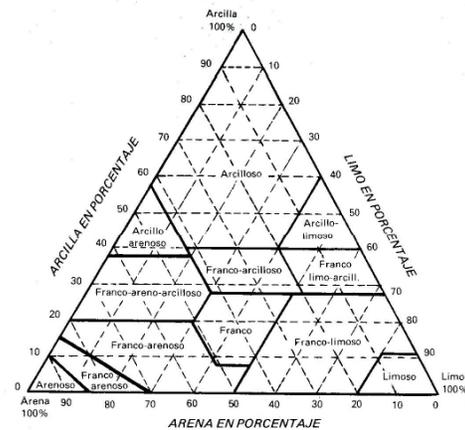


Imagen 2.4 Clases texturales de suelo.

Para llevar a cabo este método se transfirieron 40 g de suelo seco a un recipiente para la homogeneización de la muestra. Se agregaron 100 mL de agua destilada y 10 mL de agente dispersante (hexametáfosfato de sodio 1N). Se dejó reposar durante cinco minutos y después se homogeneizó con la ayuda de una batidora casera por un lapso de 25 minutos.

La mezcla fue transferida a una probeta de 1000 mL, tomándose la temperatura de la suspensión. Se introdujo el hidrómetro de Bouyoucos a los 40 segundos y se tomó la primera lectura. Dos horas después se tomó la segunda lectura del hidrómetro y de la temperatura. Una vez tomadas las dos lecturas se utilizó la Tabla 2.6 para corrección de las lecturas en función de la temperatura, se calculó el porcentaje de arena, arcilla y limo utilizando la siguiente la ecuación (6):

$$\% \text{ de Arena} = 100 - (2 \times 1^{\text{a}} \text{ lectura corregida})$$

$$\% \text{ de Arcilla} = 2 \times 2^{\text{a}} \text{ lectura corregida} \quad (6)$$

$$\% \text{ de Limo} = 100 - (\% \text{ Arena} + \% \text{ Arcilla})$$

Tabla 2.6 Corrección de lecturas respecto a la temperatura en la determinación de textura del suelo.

Temperatura °C	Factor de Conversión
14	- 1.46
16	- 0.98
18	- 0.44
19.5	0.00
20	0.18
22	0.89
24	1.16
26	2.41
28	4.1

Posteriormente se trazaron las líneas en la gráfica de clases texturales para la clasificación de las muestras de suelo colectadas (Imagen 2.4).

e) Materia orgánica (MO)

El método se basa en la ignición de la materia orgánica y su determinación de manera indirecta por diferencia de peso.

Primeramente se llevó a cabo la tara de crisoles a una temperatura de 360°C. En cada crisol se pesaron 5 g de suelo seco por duplicado. Posteriormente se calcinaron las muestras utilizando un mechero Bunsen y se dejaron enfriar a temperatura ambiente por 30 minutos en un desecador con CaCO₃. Se introdujeron las muestras en una mufla a 360°C por 2 horas, se dejaron enfriar en desecador y se registraron los pesos. La ecuación (7) se utilizó para determinar el porcentaje de materia orgánica presente en el suelo analizado.

$$\% \text{ Materia orgánica} = \frac{100 - (W_1 - W_2) \times 100}{W} \quad (7)$$

Donde

W1: Peso del crisol más muestra (después de ignición)

W2: Peso del crisol tarado

W: Peso de la muestra seca

f) Digestión ácida del suelo

Para determinar la concentración total de los metales presentes en el suelo, se realizó el proceso de digestión ácida a las muestras de suelo. Las muestras se colocaron dentro de la estufa para su secado durante 72 h a 65°C. Posteriormente se tararon matraces de 250 mL en balanza analítica y se colocaron 4.0 g de suelo (peso seco), se adicionaron 15 mL de agua regia [HCl + HNO₃ (3:1)] y se calentaron en plancha de calentamiento a 250 °C durante 30 min. A los matraces con digestión incompleta se les adicionaron 10 mL extras de agua regia y se prosiguió con la digestión. Después de dejar enfriar a temperatura ambiente se adicionaron 10 mL de agua destilada a cada matraz.

Posteriormente las muestras se filtraron en tubos Corning de 50 mL y los filtrados se aforaron a 50 mL con agua destilada, para luego determinar la concentración de los metales por EAA.

g) Determinación de metales en suelo y solución de suelo por EAA

Para el análisis de metales se empleó un Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca GBC, modelo 932 AA, con flama de aire-acetileno y corrección de fondo con lámpara de deuterio. Los parámetros que fueron utilizados para las determinaciones de metales en las muestras de suelo se presentan en la Tabla 2.7.

Los metales en solución se determinaron por espectroscopia de absorción atómica.

Tabla 2.7 Parámetros para la determinación de metales por EAA.

Metal	Longitud de onda (nm)	Rango de trabajo óptimo (mg L⁻¹)	Slit (nm)
Cadmio	228.8	0.2 – 1.8	0.5
Plomo	217.0	2.5 – 20	1.0
Zinc	213.9	0.4 – 1.5	1.0
Calcio	422.7	1.0 – 4.0	0.5
Magnesio	285.2	0.1 – 0.4	0.5
Sodio	589.0	0.18 – 0.7	0.5
Potasio	766.5	0.4 – 1.5	1.0
Hierro	248.3	0.06 - 15	0.2

2.5.2. Modelo de especiación

La fracción soluble de metales pesados en la solución de suelo puede representarse por diversos equilibrios químicos con las demás especies presentes en la solución de suelo. El modelo Visual MINTEQ 3.0 (Gustafsson, 2010) es un modelo geoquímico de equilibrio termodinámico, el cual es capaz de calcular el equilibrio de especiación química en medios acuosos, particionamiento de la fase gaseosa, estados de saturación de la fase sólida, precipitación y disolución de metales. El programa cuenta con una base de

datos, la cual contiene un conjunto de componentes predefinidos que van desde iones libres, neutros y complejos cargados. Las reacciones para determinar la especiación se basan en las constantes de equilibrio K de la base de datos del programa para de esta manera calcula la especiación de iones, solubilidad y sólidos precipitados. Mayores detalles en la teoría del método y el procedimiento de modelación se pueden encontrar en el manual de usuario del programa (Allison *et al.* 1999; Gustafsson, 2010).

2.5.2.1 Primera modelación: condiciones iniciales del suelo.

En el presente trabajo, se realizaron 2 modelaciones, la primera tuvo la finalidad de establecer las condiciones iniciales del suelo, es decir, modelar la especiación química del Pb en la fracción soluble del suelo, previa a la aplicación de los ácidos orgánicos. Para ello se realizó la extracción de solución de suelo y posteriormente se realizó su caracterización, determinando parámetros fisicoquímicos, tales como el pH y los componentes representativos de la fracción soluble del suelo (cationes: Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} ; aniones: Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , PO_4^{3-}) (Tabla 2.9). Las metodologías para la extracción y caracterización de la solución de suelo se describen en el apartado 2.5.2.3. Finalmente, los resultados obtenidos de análisis de solución de suelo se introdujeron en el modelo de especiación y saturación mineral visual MINTEQ 3.0 para obtener la especiación química de los componentes de la solución de suelo.

2.5.2.2 Segunda modelación: efecto de los AOBPM en la especiación química de Pb en la fracción soluble del suelo.

Una vez determinada la primera modelación de la fracción soluble del suelo y conociendo la exudación de ácidos orgánicos por las plantas, se realizó una prueba de solubilidad para evaluar el efectos del o los AOBPM en la especiación de los metales presentes en la solución de suelo. Esto se realizó mediante la extrapolación de los resultados obtenidos en la caracterización y cuantificación de AOBPM exudados por *Zea mays* var. *Asgrow* (ver sección 2.4.2) al crecimiento por hectárea en campo, para esto se utilizaron las siguientes ecuaciones:

Primero es necesario obtener la exudación de ácido orgánico por peso fresco de tallo (ecuaciones 8-10).

Volumen muestreado de exudados = 0.04 L

Tiempo de exudación = 4 h

$$\text{mg ácido oxálico total h}^{-1} = \frac{A \times B}{4} \quad (8)$$

$$\text{mmoles ácido oxálico h}^{-1} = \frac{(\text{mg ácido oxálico total h}^{-1})}{MM} \times 1000 \quad (9)$$

Dónde:

mg ácido oxálico total h⁻¹: mg totales de ácido oxálico por hora de exudación

MM: masa molecular del ácido oxálico (90.03g mol⁻¹ ó 90030 mg mol⁻¹)

$$\text{Unidades de exudación (tallo)} = \frac{(\text{mmoles ácido oxálico h}^{-1})}{\text{Peso fresco (PF) tallo (kg)}} \times 24 \quad (10)$$

Unidades de exudación = mmol ácido oxálico kg PF tallo⁻¹ día⁻¹

Posteriormente se determinó la concentración de ácido oxálico para su aplicación en suelo (ecuaciones 11-13), tomando en cuenta los distintos parámetros agronómicos (Tabla 2.8).

Tabla 2.8 Parámetros agronómicos para la determinación de la concentración de ácido oxálico y su aplicación en suelo

Datos	Unidad	Referencia
	44.8 ton ha ⁻¹	Ríos <i>et al.</i> 2010
Productividad de maíz forrajero (tallos)	49.3 ton ha ⁻¹ (densidad de plantas de 90 000)	Elizondo y Boschini, 2002
	42.4 ton ha ⁻¹ (densidad de plantas de 56 000)	
Densidad de plantas por hectárea	90 000 58 000	Elizondo y Boschini, 2002
	80 000 a 90 000	Núñez <i>et al.</i> 2001
Días de cosecha	119 días	Elizondo y Boschini, 2002
	110 a 130 días	SIAP, 2008
	110 a 130 días	Gaytán <i>et al.</i> 2009
Densidad del suelo	1.20 g cm ⁻³	Rodríguez y Rodríguez, 2002
1 ha	10 000m ²	
1 tonelada	1000 kg	

$$\frac{\text{mmol ácido oxálico}}{\text{hectárea de suelo}} = \text{mmoles ácido oxálico kg PF tallo}^{-1} \text{ día}^{-1} \times a \times b \times 1000 \quad (11)$$

Dónde:

a = días de cosecha (120 días en promedio)

b = productividad de maíz forrajero (tallos) (40 ton ha⁻¹ en promedio)

$$\text{Peso de ha de suelo} = 1000 \text{ m}^2 \times \text{profundidad del suelo (m}^2) \times \text{densidad del suelo (kg m}^{-3}) \quad (12)$$

Dónde:

Profundidad de suelo: capa arable (30cm o 0.03m)

Densidad de suelo: 1.2 g cm⁻³ o 1200 kg m⁻³.

$$\frac{\text{mmoles ácido oxálico}}{\text{ton suelo}} = \frac{\text{mmoles ácido oxálico}}{\text{hectárea de suelo}} \times \frac{1 \text{ ha con 30cm profundidad}}{3600 \text{ toneladas de suelo}} \quad (13)$$

Una vez que se determinó la exudación de maíz (*Zea mays* var Asgrow) por tonelada de suelo, se aplicaron los AOBPM comerciales a muestras de suelo (30 g). Para la extracción de solución de suelo en las pruebas de solubilidad, se siguió siguiendo la metodología para la extracción y caracterización de solución de suelo (sección 2.5.2.3).

Finalmente los resultados obtenidos se introdujeron en el programa de especiación y saturación mineral visual MINTEQ 3.0 para evaluar en efecto del o los AOBPM encontrados en los exudados radiculares de maíz (*Zea mays* var. Asgrow) en la distribución de metales en la fracción soluble del suelo.

2.5.2.3 Extracción y caracterización de la solución de suelo

a) Extracción de la solución de suelo

Para la obtención de la solución de suelo, se tomaron 30 g de suelo seco (72 h, 65 °C) y se colocaron en tubos Corning de 50 mL, agregando 30 mL de agua destilada. Posteriormente se instalaron en una mezcladora de giro vertical, especialmente diseñada y construida para este propósito (25 rpm, 24 h). Después del proceso de mezclado, la solución de suelo se extrajo por medio de centrifugación utilizando una centrífuga (Marca IEC CS

CENTRIFUGE, Modelo Damon TEC) durante un período de 20 min a 4000 rpm.

Al término de la centrifugación, las muestras se decantaron y se filtraron, obteniéndose aproximadamente 15 mL de solución de suelo. Enseguida se midió el pH de la solución, y posteriormente se realizó la determinación de los correspondientes cationes y aniones (Tabla 2.9).

La solución de suelo se separó en dos partes, la primera parte se acidificó con 5% de HNO₃ para el análisis de metales y demás cationes, la segunda parte no se acidificó para el análisis de aniones y COT, ambas partes se almacenaron a < 4°C. La Tabla 2.9 muestra las determinaciones realizadas a la solución de suelo y la normatividad aplicada. Los resultados se presentan corregidos a un 100% de capacidad de campo (CC).

Tabla 2.9 Métodos utilizados para la determinación de los parámetros químicos en la fracción soluble del suelo

Determinación en solución de suelo	Normatividad	Método
pH	NMX-AA-008-SCFI-2000	Potenciometría
Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺	NMX-AA-051-SCFI-2001	Espectroscopía de Absorción Atómica
Cl ⁻	NMX-AA-073-SCFI-2001	Titulación con AgNO ₃
SO ₄ ²⁻	USEPA Método SulfaVer 4 Método 8051	Método SulfaVer 4 Método 8051
NO ₃ ⁻	USEPA Método NitraVer 5	Reducción con cobre
PO ₄ ³⁻	Determinación de fósforo. Método del molibdovanadato. HACH (1999)	Método molibdovanadato. Método 8114

b) pH

El método se fundamenta en la existencia de una diferencia de potencial entre las dos caras de una membrana de vidrio, expuestas a disoluciones acuosas que difieren en su valor de pH.

Para la determinación de pH, una muestra de solución de suelo (50 mL) se colocó en un recipiente limpio de tamaño apropiado. Se enjuagaron cuidadosamente los electrodos con agua y se sumergieron en la muestra problema. Una vez que se estabilizó la lectura se tomó el pH que arroja el equipo (variación de lectura menor que 0.02 unidad de pH en un lapso no mayor de 1 min). Las determinaciones se realizaron por triplicado.

c) Determinación de cationes

Para el análisis de cationes se empleó Espectrofotometría de Absorción Atómica –de acuerdo al método descrito en la sección 2.5.1g (NMX-AA-051-SCFI-2001).

d) Determinación de aniones

Los aniones se analizaron mediante el método colorimétrico HACH, utilizando el Espectrofotómetro DR/2010 ABRIDGED. Los aniones analizados fueron: 1) Sulfatos, empleando el reactivo SulfaVer 4 (cloruro de bario y ácido cítrico) este método colorimétrico consiste en que los iones SO_4^{2-} contenidos en la muestra reaccionan con Ba^{2+} contenido en el SulfaVer 4 formando un precipitado de sulfato de bario, la turbidez formada es proporcional a la concentración de sulfato. Los resultados se miden a 450 nm; 2) Fosfatos, utilizando el método de Molibdovanadato. Los iones

fosfato reaccionan en solución ácida con iones molibdato y antimonio formando un complejo antimonilfosfomolibdato que, mediante ácido ascórbico, se reduce a azul de fosfomolibdeno. 3) Nitratos, con el método de reducción de cadmio empleando el reactivo NitraVer 5 (ácido sulfanílico, potasio dihidrogenofosfato, magnesio sulfato heptahidratado). El cadmio metálico reduce los nitratos de la muestra a nitritos. El ion de nitrito reacciona en un medio ácido con el ácido sulfanílico para formar una sal intermedia de diazonio. Esta sal se une al ácido gentísico para formar un producto de color ámbar. 4) Cloruros, mediante titulación volumétrica con Nitrato de plata utilizando como indicador cromato de potasio.

e) Determinación de Carbono Orgánico Total (COT)

El análisis de Carbono orgánico total, se determinó utilizando un analizador de carbono orgánico total TOC-V CSH SHIMADZU con detector Infrarrojo Dispersivo.

Se añadieron 15 mL de muestra a viales, la muestra se inyectó en una cámara de reacción a 680 °C, rellena con un catalizador oxidante. El agua se vaporiza y el carbono (orgánico e inorgánico) se oxida a CO₂. Este CO₂ se transporta, en corriente de aire, y se mide en un detector infrarrojo no dispersivo. Este método solo determina carbono total (TC), se debe determinar también el carbono inorgánico (IC) y posteriormente por diferencia se obtiene el carbono orgánico total (COT).

El IC se determina inyectando la muestra en una cámara de reacción que contiene ácido fosfórico. Bajo condiciones ácidas todo el IC se convierte en CO₂, que se mide en el detector infrarrojo. Bajo estas condiciones el carbono orgánico no se oxida, por lo que sólo se determina el IC.

2.6 Aseguramiento de la calidad de resultados

Para asegurar la calidad de los datos experimentales, los análisis se llevaron a cabo utilizando réplicas (2 a 6 réplicas), utilizando estándares de concentración conocida provenientes de estándares de referencia certificados y blancos para asegurar el control analítico de los experimentos.

2.7 Análisis estadístico

Los datos experimentales obtenidos según su caso, fueron analizados con las pruebas de normalidad de Kolgomorov-Smirnov o Anderson-Darling de acuerdo al número de réplicas experimentales utilizando el programa Sigma Plot (versión 11.0, 2008). Posteriormente los datos se analizaron usando un análisis de varianza ANOVA (ó Tukey) ó la prueba de Kruskal-Wallis (en el caso de que la distribución de los datos no sea normal). Los análisis estadísticos fueron realizados en el programa Sigma Plot (versión 11.0, 2008).

2.8 Disposición de residuos

Los residuos generados durante la realización del presente proyecto se dispusieron en conjunto con el Departamento de Seguridad y Medioambiente de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Selección de la especie vegetal

Con la finalidad de elegir la especie vegetal más apropiada para los fines del estudio, se evaluaron algunas características de las especies vegetales descritas en la sección 2.2.1 y la más adecuada para el presente estudio fue seleccionada. En las Tablas 3.1 y 3.2 se muestran los resultados obtenidos en las pruebas de adaptabilidad a cultivo hidropónico deficiente en micronutrientes.

Los resultados de esta prueba preliminar indican la variabilidad en el crecimiento de las plantas inducida por el sustrato (peat-moss, suelo agrícola o cultivo hidropónico). De las 7 variedades de plantas estudiadas, el maíz (*Zea mays*) var. Asgrow y la soya (*Glycine max*) presentaron una mayor producción de biomasa tanto de tallo como radicular. Este criterio fue de importancia en la elección de la planta a estudiar puesto que la producción de exudados radiculares podría estar relacionada con la producción de biomasa radicular. (Hodge *et al.* 2009)

Por lo anterior, el maíz (*Zea mays* var. Asgrow) fue la planta seleccionada para la producción de exudados radiculares, debido a que

además de presentar adaptabilidad al crecimiento en cultivo hidropónico y al estrés de nutrientes (Tabla 3.1 y 3.2), también presenta adaptabilidad a las condiciones geoclimáticas, es nativa, tiene rápido crecimiento y una alta producción de biomasa radicular (Núñez *et al.* 2005).

El estrés de nutrientes puede ocasionar la presencia de algunos síntomas típicos de deficiencia de nutrientes en las plantas como lo es la clorosis (Botha, 2007), por tal motivo se utilizó una solución nutritiva (López-Chuken y Young 2010) a la cual se eliminaron micronutrientes esenciales para las plantas (*e.g.* Fe, Cu y Zn) (Tratamiento HD M (-), sección 2.2.2, Tabla 2.2).

De las 7 variedades de plantas estudiadas, el maíz manifestó claros síntomas de deficiencia de nutrientes (clorosis) (Imagen 3.1 y 3.2), opuesto a lo encontrado en las otras variedades de plantas, esto es de suma importancia ya que estos síntomas pueden ser un indicador indirecto de la producción de exudados radiculares debido al estrés de nutrientes (Abadía *et al.* 2002; Botha, 2007).



Imagen 3.1 Foto de una planta de maíz (*Zea mays* var. Asgrow) clorótica (derecha) del tratamiento deficiente en micronutrientes sin impedancia mecánica y una planta control (izquierda) del tratamiento completo a los 23 días post-germinación.



Imagen 3.2 Foto de una planta de maíz (*Zea mays* var. Asgrow) clorótica del tratamiento deficiente con impedancia mecánica a los 23 días post-germinación.

Tabla 3.1 Productividad de tallo y raíz (peso fresco) de distintas variedades de plantas bajo diferentes medios de cultivo

Variedad de planta	Biomasa fresca (mg)									
	Tallo					Raíz				
	Peat	SA	HD M (+)	HD M (-)		Peat	SA	HD M (+)	HD M (-)	
<i>Zea mays</i>	1031 ±4.80 c	2590 ±454 a	1270 ±122 bc	2246 ±277 ab	*	915 ±93.8 b	850 ±78.3 b	686 ±127 b	1383 ±46.5 a	**
<i>Glycine max</i>	1325 ±27.6	1592 ±141	1957 ±87.2	1771 ±253	NS	193 ±27.0	262 ±62.7	173 ±35.8	462 ±122	NS
<i>Triticum spp</i>	171 ±9.60	283 ±39.8	81.0 ±34.7	147 ±36.9	NS	35.7 ±1.80	63.0 ±11.7	58.3 ±22.8	75.3 ±20.4	NS
<i>Linum usitatissimum</i>	79.0 ±18.7	66.7 ±8.80	108 ±10.8	66.0 ±10.7	NS	7.00 ±2.00 b	11.0 ±1.20 b	8.67 ±1.80 b	22.0 ±3.60 a	**
<i>Pennisetum americanum</i>	53.0 ±3.50 c	72.0 ±4.00 a	71.0 ±20.6 bc	78.3 ±6.60 ab	***	7.67 ±2.20 b	15.7 ±6.10 b	6.67 ±0.90 b	17.3 ±5.90 a	***
<i>Oryza sativa</i>	20.3 ±1.90	60.7 ±14.8	SC	SC	NS	20.0 ±5.80	43.3 ±10.9	SC	SC	NS
<i>Panicum miliaceum</i>	40.7 ±5.80	SC	SC	SC	ND	8.33 ±1.70	SC	SC	SC	ND
	***	***	***	***		***	***	***	***	

Valores promedio de $n = 3 \pm$ error estándar; SA: Suelo agrícola; HD M (+): Solución nutritiva completa (stock A, B, C, D); HD M (-): Solución nutritiva incompleta (stock A y B) deficiente en micronutrientes; Datos a los 10-15 días de cultivo (dependiendo de la especie vegetal) bajo luz artificial; SC: Sin crecimiento; NS: no significativo; * significativo ($p < 0.05$, ANOVA); ** significativo ($p < 0.01$, ANOVA); *** muy significativo ($p < 0.001$, ANOVA) ND: no determinado; Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$, Prueba Tukey) (leer horizontalmente).

Tabla 3.2 Productividad de tallo y raíz (peso seco) de distintas variedades de plantas bajo diferentes medios de cultivo.

Variedad de planta	Biomasa seca (mg)											
	Tallo						Raíz					
	Peat	SA	HD M (+)	HD M (-)			Peat	SA	HD M (+)	HD M (-)		
<i>Zea mays híbrido</i>	98.0 ±5.86 a	190 ±35.2 a	94.3 ±8.35 a	153 ±15.2 a	*		103 ±13.6	73.3 ±9.70	49.7 ±21.7	97.3 ±2.67	NS	
<i>Glycine max</i>	133 ±1.00 c	241 ±19.3 ab	326 ±6.66 a	210 ±41.2 bc	**		19.0 ±1.15 a	27.0 ±2.65 a	43.7 ±2.60 a	44.3 ±11.3 a	*	
<i>Triticum spp</i>	14.3 ±6.50	42.0 ±7.09	25.7 ±6.06	19.0 ±404	NS		15.7 ±3.71	11.3 ±2.60	19.7 ±4.91	16.0 ±1.53	NS	
<i>Linum usitatissimum</i>	9.33 ±2.03 a	7.67 ±1.76 a	19.7 ±1.20 a	10.3 ±0.67 a	**		2.00 ±0.58 a	3.67 ±0.88 ab	7.00 ±1.00 b	3.33 ±0.33 a	**	
<i>Pennisetum americanum</i>	5.00 ±1.00	8.33 ±2.60	7.70 ±1.33	7.33 ±0.67	NS		2.33 ±0.88	1.33 ±0.33	1.67 ±0.33	2.67 ±0.33	NS	
<i>Oryza sativa</i>	4.33 ±0.88	5.33 ±0.88	SC	SC	NS		1.67 ±0.67	1.67 ±0.33	SC	SC	NS	
<i>Panicum miliaceum</i>	3.33 ±0.88	SC	SC	SC	ND		1.33 ±0.33	SC	SC	SC	ND	
	**	**	**	**			**	**	**	**		

Valores promedio de $n = 3 \pm$ error estándar; SA: Suelo agrícola; HD M (+): Solución nutritiva completa (stock A, B, C, D); HD M (-): Solución nutritiva incompleta (stock A y B) deficiente en micronutrientes; Datos a los 10-15 días de cultivo (dependiendo de la especie vegetal) bajo luz artificial; SC: Sin crecimiento; NS: no significativo; * significativo ($p < 0.05$, ANOVA); ** significativo ($p < 0.001$, ANOVA); *** muy significativo ($p < 0.001$, ANOVA) ND: no determinado; Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$, Prueba Tukey) (leer horizontalmente).

3.2 Inducción de la producción de exudados radiculares en cultivo hidropónico

3.2.1. Solución nutritiva

Con base en los resultados obtenidos en la selección de la especie vegetal y en la evidencia de que la deficiencia de macronutrientes y micronutrientes, tales como el Fe (Abadía *et al.* 2002; Luo *et al.* 2008; Chaignon *et al.* 2002), P (Yu *et al.* 2008; Hoffland *et al.* 2006; Neumann *et al.* 2000) e incluso en niveles tóxicos de Al (Gaume *et al.* 2001) pueden incrementar la producción de exudados radiculares, se eliminaron los micronutrientes de la solución nutritiva diseñada por López-Chuken y Young (2010).

3.2.2. Extracción de exudados radiculares

Durante el experimento de inducción de la producción de exudados se lograron provocar síntomas de deficiencia de micronutrientes (clorosis) en los tratamientos HD I (+) y HD I (-) (Imagen 3.1 y 3.2), no observándose así en el control con solución nutritiva completa (tratamiento completo) (Imagen 3.1). Las muestras de exudados colectadas se analizaron posteriormente mediante HPLC.

3.3 Determinación de exudados radiculares

Para realizar la determinación de ácidos orgánicos en las muestras de exudados radiculares mediante HPLC, fue necesario primero establecer las

condiciones cromatográficas para el análisis. La Tabla 3.3 presenta las condiciones cromatográficas para la determinación de AOBPM mediante HPLC.

Tabla 3.3 Condiciones cromatográficas para la determinación de AOBPM mediante HPLC

Columna	Columna Prevail™ Organic Acid (250 x 4.6 mm, 5µm)
Temperatura de la columna	Ambiente (≈ 25 °C)
Fase móvil	Buffer de fosfatos (25mM KH ₂ PO ₄ : 15mM, H ₃ PO ₄ , pH: 1.5)
Elución	Isocrática
Velocidad de flujo	1.0 mL min ⁻¹
Volumen de inyección	100 µL
Detector	UV-Vis a 210 nm

La elección de las condiciones cromatográficas fue en base a los estudios previos de caracterización de exudados radiculares (Wang *et al.* 2007) y a especificaciones establecidas por el proveedor de la columna de intercambio iónico (Grace Davison Sciences Regional Headquarters; Alltech® Prevail™ Organic Acid Column).

Una vez que se establecieron las condiciones cromatográficas adecuadas, se realizó la determinación de los tiempos de retención de una mezcla de los ácidos orgánicos (Figura 3.1, Tabla 3.4) que posiblemente podrían encontrarse en los exudados radiculares de la planta de estudio (Tabla 1.2

y 1.3). Los ácidos orgánicos que se evaluaron en el presente estudio fueron: ácido oxálico, málico, cítrico, fumárico, maléico, succínico, tartárico y acético.

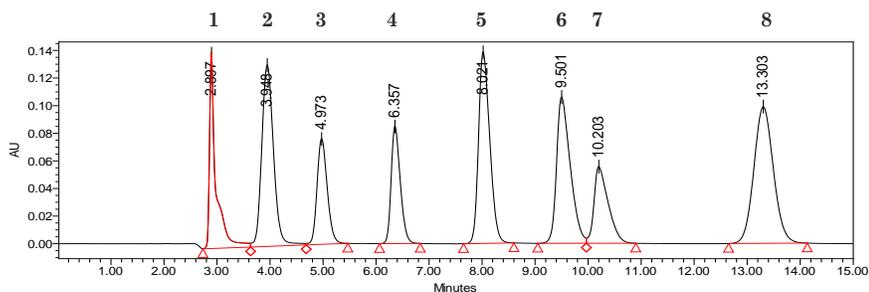


Figura 3.1 Cromatograma una mezcla de los ocho AOBPM en estudio y su correspondiente tiempo de retención (t_R). 1: Oxálico 10 mg L^{-1} ; 2: Tartárico 200 mg L^{-1} ; 3: Málico 200 mg L^{-1} ; 4. Acético 300 mg L^{-1} ; 5. Maléico 2 mg L^{-1} ; 6. Cítrico 300 mg L^{-1} ; 7: Succínico 300 mg L^{-1} ; 8: Fumárico 2.5 mg L^{-1} .

Tabla 3.4 Tiempo de retención (t_R) de los AOBPM de estudio presentes en la Figura 3.1

Pico	AOBPM	t_R (min)
1	Oxálico	2.89
2	Tartárico	3.94
3	Málico	4.97
4	Acético	6.35
5	Maléico	8.02
6	Cítrico	9.50
7	Succínico	10.2
8	Fumárico	13.3

3.3.1. Purificación y pre-concentración de exudados radiculares

La finalidad de la purificación y pre-concentración de las muestras de exudados radiculares es: (1) eliminar posibles interferentes en la matriz de la muestra para facilitar el análisis mediante HPLC y (2) disminuir el volumen de muestra para la pre-concentración de las mismas y lograr la detección de ácidos orgánicos presentes en la muestra a bajas concentraciones. Para dicho proceso se utilizaron 2 resinas de intercambio iónico, una catiónica (Amberlita) y una aniónica (Dowex). Sin embargo, durante la etapa de purificación y pre-concentración se presentaron dos inconvenientes.

El primero de ellos fue la escasa efectividad de la resina Dowex para retener a los ocho AOBPM estudiados (oxálico, tartárico, málico, acético, cítrico, maléico, succínico, fumárico). En el análisis por HPLC se encontraron únicamente señales en la fracción 4 (muestra pre-concentrada) correspondientes a los ácidos acético, succínico y málico y con porcentajes (%) de recuperación menores al 15% utilizando para éstas pruebas estándares de concentración conocida (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Porcentajes (%) de recuperación del proceso de purificación y pre-concentración de muestras en estándares de concentración conocida.

AOBPM	Conc. Teórica (mg L⁻¹)	Conc. Real (mg L⁻¹)	% recuperación
Acético	100	11.6 ±1.09	11.6
Succínico	100	13.5 ±1.30	13.5
Málico*	100	8.19* ±1.69	8.19

Concentración real: valores promedio ± error estándar con n = 3; *: n = 2.

Tomando en cuenta los resultados anteriores, y para tratar de incrementar el porcentaje de recuperación, se realizó la activación de la resina Dowex mediante una modificación del procedimiento descrito por Moreno *et al.* (2007). La activación se efectuó mediante la mezcla de la resina con HCl 1M durante 24h y su posterior lavado con H₂O nanopura. Este proceso de activación pretendió dejar los sitios de unión a los ácidos orgánicos de la resina Dowex activos y mejorar la retención de los mismos. Realizando este proceso de activación se logró mejorar la recuperación de los estándares de los ácidos orgánicos estudiados (Tabla 3.6).

Tabla 3.6 Porcentajes (%) de recuperación de los estándares de concentración conocida con el proceso de activación de la resina Dowex.

AOBPM	Conc. Teórica (mg L ⁻¹)	Conc. Real (mg L ⁻¹)	% recuperación
Tartárico	50	8.30 ±0.99	16.6
Málico	50	48.5 ±6.11	97.1
Acético*	50	6.17* ±1.82	12.3
Maléico*	0.6	0.09* ±0.05	14.3
Cítrico	50	20.7 ±4.70	41.5
Succínico	50	12.8 ±1.94	25.7

Concentración real: valores promedio ± error estándar con n = 5; *: n = 4.

En la Tabla 3.6 se observa un aumento del porcentaje (%) de recuperación de los estándares de los ácidos acético, succínico y málico mediante la activación de la resina. En el caso del ácido málico se logró casi un 100% de recuperación (97.1%). Además, se lograron eluir otros ácidos orgánicos que no lograban eluirse sin la activación de la resina Dowex, como en el caso de los ácidos tartárico, maléico y succínico, sin embargo, sus

porcentajes de recuperación fueron bajos (16.6, 14.3 y 41.5% respectivamente).

El segundo inconveniente se presentó durante el proceso de purificación y pre-concentración debido a la fuerte interferencia de los componentes traza (Bromuro 0.003%, Sulfatos, Sulfitos y Cloro libre 0.6 ppm, respectivamente) presentes en el HCl utilizado para la activación de la resina Dowex y la elución de los componentes retenidos en la misma, así como el NaOH utilizado en el ajuste de pH de las muestras. Estos componentes traza posiblemente afectaron la determinación de ácido oxálico tanto en estándares de concentración conocida como en muestras durante el análisis por HPLC (Figura 3.1 y 3.2; Tabla 3.4 y 3.7). La Figura 3.2 y Tabla 3.7 muestran el cromatograma de un estándar de los ocho AOBPM con el tratamiento de purificación y pre-concentración en la fracción 4 (muestra concentrada) y sus correspondientes tiempos de retención. La Figura 3.3 y Tabla 3.8 muestra el cromatograma de la purificación y pre-concentración de un blanco (agua nanopura).

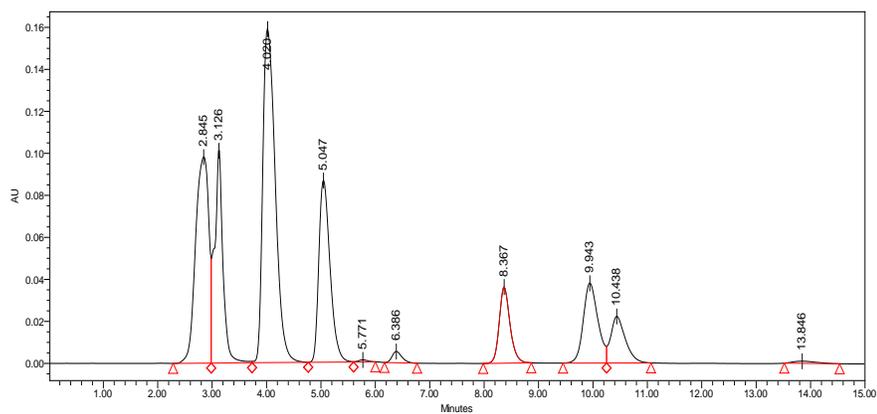


Figura 3.2 Fracción 4 de un estándar de los ocho AOBPM de estudio.

Tabla 3.7 Tiempo de retención (t_R) de los picos de interés en la Figura 3.2

Pico	t_R (min)
1	2.84
2	3.12
3	4.02
4	5.04
5	5.77
6	6.38
7	8.36
8	9.94
9	10.4
10	13.8

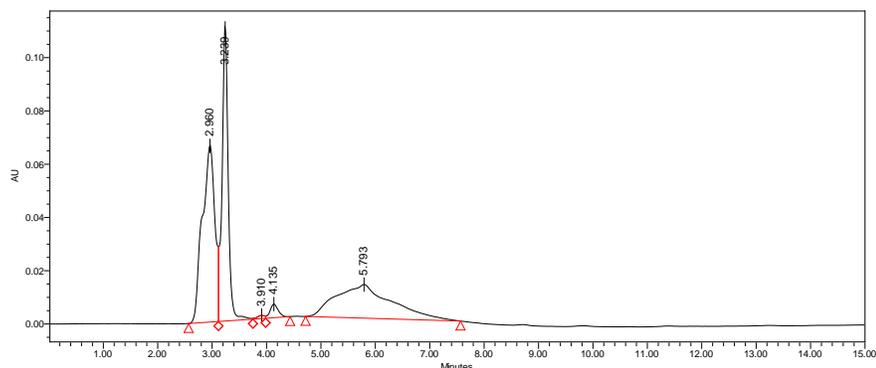


Figura 3.3 Fracción 4 de blanco (agua nanopura) con el tratamiento de purificación y pre-concentración.

Tabla 3.8 t_R de los picos de interés en la Figura 3.3.

Número de pico	t_R (min)	Área
1	2.96	1060439
2	3.23	870451
3	3.91	10946
4	4.13	53201
5	5.79	900797

El t_R del ácido oxálico en los estándares coincide con los picos provenientes de los reactivos utilizados (HCl y NaOH) en la purificación y pre-concentración (Figura 3.1 y Tabla 3.4; Figura 3.3 y Tabla 3.8), principalmente los picos que se presentaban a un t_R de 2.96 y 3.239min. Además, durante el análisis de las muestras (Figura 3.4, Tabla 3.9; Figura 3.5, Tabla 3.10; Figura 3.6, Tabla 3.11) se observó una ausencia de picos provenientes de otros ácidos orgánicos aún con el tratamiento de

purificación y pre-concentración, encontrándose únicamente la presencia de ácido oxálico (ver punto 3.3.2).

Analizando los resultados obtenidos en la purificación y pre-concentración de muestras, se concluye que bajo las condiciones experimentales descritas (sección 2.4.1), dicho proceso no resultó eficiente para el análisis de muestras de exudados. Debido a que en las muestras de estudio solo se observó la presencia de ácido oxálico y el tratamiento de purificación y pre-concentración de muestras interfiere en la determinación del ácido en cuestión, para el segundo experimento de extracción y caracterización de exudados radiculares se decidió realizar el análisis directo de las muestras, omitiendo la pre-concentración y purificación.

3.3.2. Caracterización de AOBPM presentes en los exudados radiculares

El primer experimento de extracción y caracterización de exudados (del 30 de noviembre al 21 de diciembre del 2009) se realizó con la finalidad de identificar los AOBPM presentes en los exudados radiculares de la planta de estudio (*Zea mays* var. Asgrow) y evaluar la tendencia de exudación con respecto al tiempo. El análisis de AOBPM mediante HPLC mostró únicamente la presencia de un pico de interés ($t_R \cong 3.0$ min); el cual, comparándolo con los tiempos de retención de los estándares de AOBPM, correspondía al t_R del ácido oxálico.

Las Figuras 3.4, 3.5 y 3.6 corresponden a muestras de exudados de los distintos tratamientos (Tratamiento completo, HD I(+) y HD I (-)) y en ellas se observa la presencia de un pico a $\cong 3.0$ min el cual comparándolo con el tiempo de retención de los estándares de concentración conocida (Figura 3.1, Tabla 3.4) corresponde al ácido oxálico (Tabla 3.4, Tabla 3.9, Tabla 3.10, Tabla 3.11).

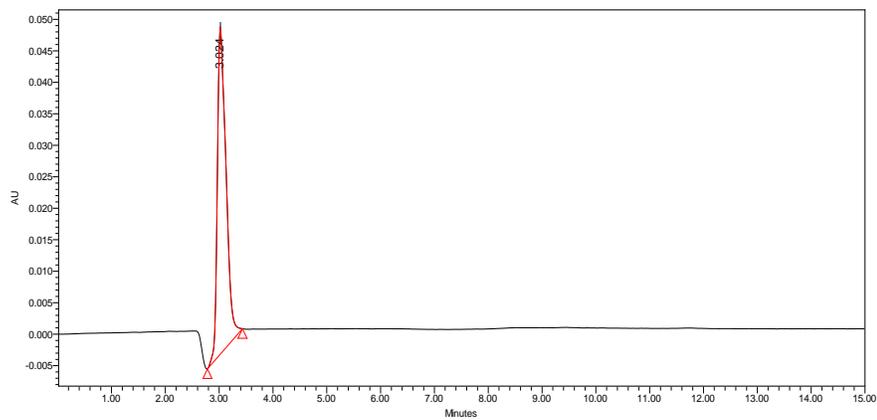


Figura 3.4 Cromatograma de la muestra 3 del tratamiento deficiente con impedancia mecánica (15 días post-germinación) sin tratamiento de purificación y pre-concentración (F-0). Se observa el pico correspondiente al ácido oxálico a un $t_R \cong 3$ min

Tabla 3.9 t_R de los picos de interés en la Figura 3.4

Número de pico	t_R (min)	Área
1	3.02	578739

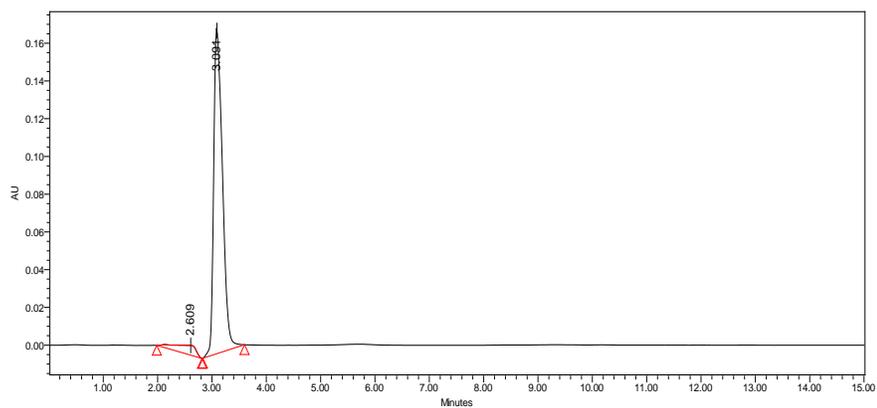


Figura 3.5 Cromatograma de la muestra 3 del tratamiento deficiente sin impedancia mecánica (15 días post-germinación) sin tratamiento de purificación y pre-concentración (F-0). Se observa el pico correspondiente al ácido oxálico a un $t_R \cong 3$ min.

Tabla 3.10 t_R de los picos de interés en la figura 3.5

Número de pico	t_R (min)	Área
1	2.60	139042
2	3.09	1927638

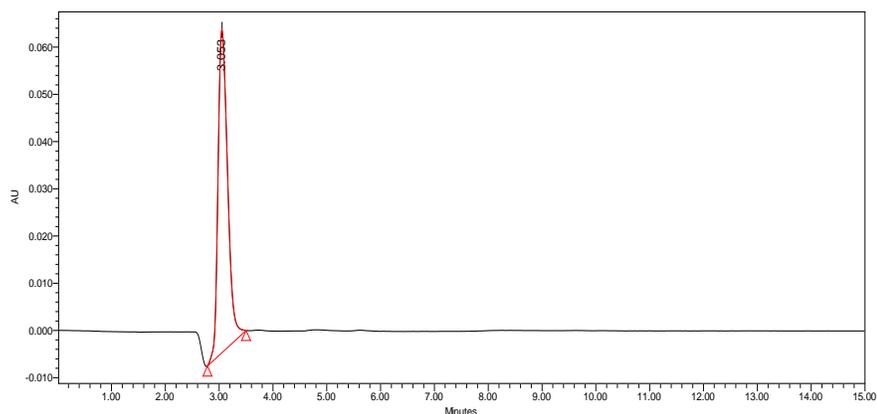


Figura 3.6 Cromatograma de la muestra 3 del tratamiento completo (15 días post-germinación) sin tratamiento de purificación y pre-concentración (F-0). Se observa el pico correspondiente al ácido oxálico a un $t_R \cong 3$ min.

Tabla 3.11 t_R de los picos de interés en la Figura 3.6

Número de pico	t_R (min)	Área
1	3.05	847215

La Tabla 3.12 presenta los resultados obtenidos de la caracterización de exudados radiculares de maíz (*Zea mays* var. Asgrow) en el experimento 1.

Tabla 3.12 Exudación de ácido oxálico por maíz (*Zea mays* var. Asgrow).

Días post-germinación	Fracción 0. Ácido oxálico (mg L^{-1})			
	Completo		HD I (-)	
5	7.41	± 5.27	5.13	± 3.63
10	6.11	± 5.88	2.77	± 1.67
15	33.0	± 17.2	15.1	± 4.98
21	20.3	± 9.91	13.5	± 7.18
23	11.0	± 8.73	1.38	± 1.25

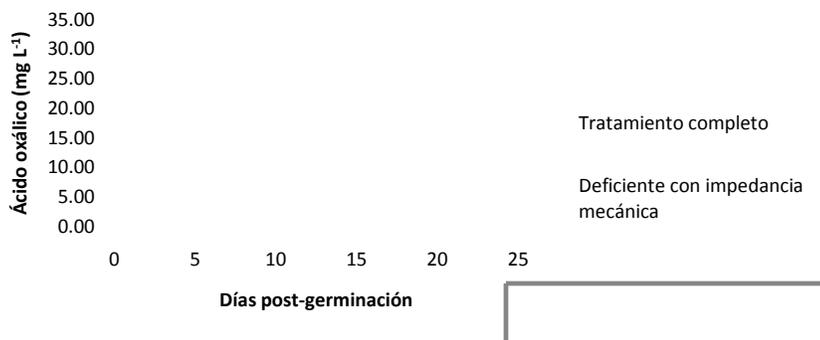


Figura 3.7 Exudación de ácido oxálico por maíz (*Zea mays* var. Asgrow).

La determinación de AOBPM mediante HPLC mostró la presencia de ácido oxálico en muestras de exudados de maíz (*Zea mays* var. Asgrow) en concentraciones de 1.38 a 15.1 mg L⁻¹ y de 6.11 a 33.0 mg L⁻¹ en los tratamientos deficiente en HD I (-) y completo respectivamente (Tabla 3.12), observándose una mayor exudación a los 15 días post-germinación para ambos tratamientos.

Diversos autores mencionan que los AOBPM comúnmente exudados por las raíces de las plantas son el ácido cítrico, málico, fumárico, oxálico, malónico, y aconítico (Neumann, 2007). Sin embargo, también es conocido que la composición de exudados radiculares se ve afectada por factores físicos, químicos y biológicos (Tabla 1.5), por lo que incluso entre genotipos de una misma especie puede haber diferente composición de los exudados y por ende de los AOBPM presentes en ellos (Alves *et al.* 2001; Gaume *et*

al. 2001a; Gaume *et al.* 2001b; Lui *et al.* 2007). Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos se puede concluir que en los exudados radiculares de la variedad estudiada (*Zea mays* var. Asgrow) y bajo las condiciones experimentales, el AOBPM predominante es el ácido oxálico, sin embargo no se descarta la presencia de otros AOBPM a nivel de traza.

El segundo experimento de inducción y extracción de exudados radiculares (6 de febrero al 1 marzo del 2010) se efectuó con el fin de caracterizar y cuantificar, utilizando unidades de exudación (mmol ácido orgánico kg peso fresco raíz⁻¹ día⁻¹), los AOBPM presentes en los exudados radiculares de la planta de estudio y estimar la concentración del o los AOBPM presentes para discutir sobre su posible aplicación en programas de FEAQ en suelos contaminados reales.

Al igual que en el experimento anterior, se identificó fuertemente la presencia de ácido oxálico, en las muestras de exudados radiculares. La Tabla 3.13 presenta los resultados de la biomasa fresca de raíz producida por maíz (*Zea mays* var. Asgrow) en el segundo experimento de extracción y caracterización de exudados.

Tabla 3.13 Biomasa fresca de raíz producida por maíz (*Zea mays* var. Asgrow) bajo distintos tratamientos.

Días post-germinación	Biomasa fresca raíz (mg)		
	Completo	HD I (-)	HD I (+)
5	557.6 ±49.6 b	720.7 ±8.08 b	512.7 ±20.7 NS
10	1058 ±99.3 b A	1027 ±34.8 a A	535.0 ±144 * B
15	989.0 ±32.0 b	1340 ±156 ab	976.3 ±83.1 NS
21	1524 ±125 a	1207 ±64.2 ab	1576 ±160 NS
23	1119 ±181 a	1281 ±103 a	1531 ±54.3 NS
		*	NS

Valores promedio de $n = 3 \pm$ error estándar; Completo: cultivo hidropónico con macro y micronutrientes; HD I (-): cultivo hidropónico deficiente en Fe, Cu y Zn sin impedancia mecánica; HD I (+): cultivo hidropónico deficiente en Fe, Cu y Zn con impedancia mecánica; *: diferencia significativa ($p < 0.05$) (ANOVA); NS: No significativo ($p > 0.05$, ANOVA); Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$, Tukey) (leer verticalmente); Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$, Tukey) (leer horizontalmente).

La biomasa fresca de raíz de la planta de estudio se incrementó conforme a los días post-germinación, sin embargo no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la productividad de raíz comparando los distintos tratamientos; excepto en la biomasa producida a los 10 días post-germinación. Esto podría ser de interés debido a que bajo las condiciones de estudio se encontró que el maíz (*Zea mays* var. Asgrow) puede ser cultivado en medios deficientes en micronutrientes sin que se vea afectado el crecimiento de su raíz.

Aplicando las ecuaciones 1, 2 y 3 (sección 2.4.2) se cuantificó el ácido oxálico en las muestras de exudados radiculares (Tabla 3.14), encontrándose concentraciones máximas de: $113 \text{ mmol kg raíz}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para el tratamiento completo, $65.7 \text{ mmol kg raíz}^{-1} \text{ día}^{-1}$ para el tratamiento

deficiente sin impedancia mecánica y 69.2 mmol kg raíz⁻¹ día⁻¹ para el tratamiento deficiente con impedancia mecánica.

Tabla 3.14 Exudación de ácido oxálico en muestras de exudados radiculares de *Zea mays* var Asgrow.

Días post-germinación	Completo	HD I (-)	HD I (+)	
	Exudación (mmol kg PF raíz ⁻¹ día ⁻¹)			
5	ND	ND	2.56 ±0.22	NC
10	ND	ND	1.49 ±0.27	NC
15	113 ±13.8	21.8 ±9.34	69.2 ±39.7	NS
21	20.1 ±12.6	32.7 ±23.6	10.5 ±1.7	NS
23	109 ±37.2	65.7 ±14.2	29.7 ±10.6	NS
	NS	NS	*	

Valores promedio de n = 3 ± error estándar; PF: Peso fresco; ND: No detectado; Completo: cultivo hidropónico completo; HD I (-): cultivo hidropónico deficiente en micronutrientes sin impedancia mecánica; HD I (+): cultivo hidropónico deficiente en micronutrientes con impedancia mecánica; Unidades de exudación: mmoles de ácido oxálico por día por kg de peso fresco de raíz; NC: No calculado; NS: No significativo (p > 0.05) (ANOVA); *: significativo (p < 0.05) (Kruskal-Wallis).

A pesar de la evidencia reportada de una mayor exudación de AOBPM en los tratamientos deficientes en micronutrientes (Neumann, 2007; Gaume *et al.* 2001b), no existió diferencia significativa en los diferentes tratamientos (Tabla 3.14). Incluso en el tratamiento HD I (+), la impedancia mecánica la cual se utilizó con la finalidad de simular el crecimiento radicular en suelo sin la complicación de pérdidas en el sistema radicular, no afectó significativamente la exudación por maíz (*Zea mays*) Esto se puede explicar debido a los distintos mecanismos de tolerancia o sobrevivencia de las plantas ante la deficiencia de nutrientes.

Por ejemplo ante la deficiencia de Fe, las plantas pueden implementar 2 estrategias, denominadas estrategias I y II. La estrategia I, incluye la activación de una bomba de protones en conjunto de una enzima reductora de Fe para tratar de solubilizar Fe en el medio (Walker y Connolly, 2008); mientras que la estrategia II, la cual es característica de las gramíneas como el maíz, incluye la liberación de AOBPM (Imagen 3.4) y de fitosiderosporas (PS) (Imagen 3.5). La liberación de PS se ve potenciada no solo por la deficiencia de Fe, sino también por el Cu y Zn (Neumman y Römheld, 2000; Jones, 1998).

Diversos autores reportan que los AOBPM no son los únicos responsables en la movilización de nutrientes o micronutrientes, sino también otros compuestos orgánicos (PS) o aromáticos (ácidos aromáticos, fenoles) (Feng *et al.* 2003; Chang *et al.* 2003). Además, dependiendo de factores físicos, químicos y/o biológicos presentes en la planta o su entorno (Tabla 1.5), podría potenciarse la liberación de AOBPM o PS; por lo que posiblemente bajo las condiciones de estudio, en la especie vegetal estudiada (*Zea mays*) se vió potenciada la liberación de fitosiderosporas u otros compuestos (Feng *et al.* 2003; Degryse *et al.* 2008).

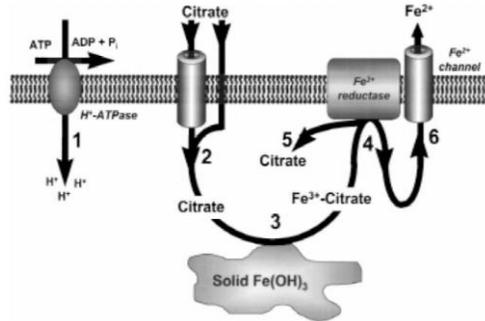


Imagen 3.3 Representación esquemática del papel de los AOBPM en la movilización y absorción de Fe por plantas monocotiledóneas. (Jones, 1998).

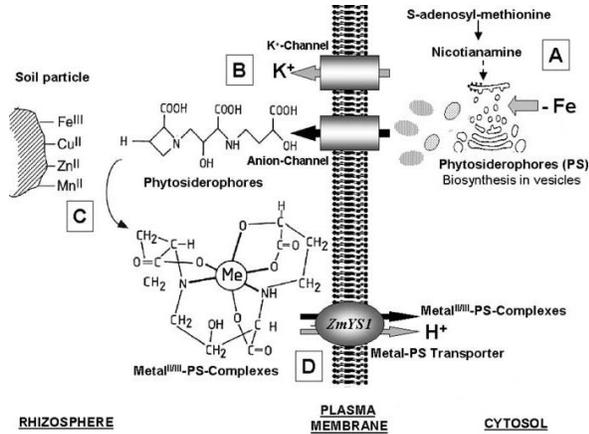


Imagen 3.4 Representación esquemática de la liberación de PS y su papel en la movilización y absorción de micronutrientes por plantas. (Neumann 2007; Walker y Connolly, 2008).

Por otro lado diversos autores han encontrado diferencias en la composición de exudados radiculares entre los exudados de las especies vegetales y entre los distintos genotipos dentro de una misma especie de vegetal (Neumann y Römheld, 2000) (Tabla 3.15).

Tabla 3.15 Evidencia de la relación entre la composición de exudados radiculares en distintas especies vegetales y/o genotipos de una misma especie.

Autor	Medio	Especie vegetal y/o genotipo	Aportación
Gaume et al. 2001a	Cultivo hidropónico con estrés por Al.	<i>Zea mays</i> var. Sikuaní: tolerante Al. <i>Zea mays</i> var. Corso: susceptible al Al	Diferencias en la exudación de AOBPM entre variedades de maíz. Elevada exudación de ácido cítrico, málico y succínico en el maíz var. Sikuaní (tolerante al Al).
Gaume et al. 2001b	Cultivo hidropónico deficiente en P.	NST90201 (S) CO-422-2-3-1-7: tolerante a bajas concentraciones de P SA3-C4HC (16_25)-2-4-9-7-B-B-B-B-1: susceptible a la deficiencia de P. ICA V-110 Sikuaní: tolerante a suelos ácidos. Corso: presenta rápido crecimiento y alta producción de biomasa seca de raíz.	Se observaron diferencias en la exudación de AOBPM entre genotipos de maíz.
Lui et al. 2007	Suelo contaminado artificialmente con Cd	Arroz Shan you 63: elevada absorción de Cd. Arroz Wu yun jing 7: baja absorción de Cd.	Diferencia en la exudación de AOBPM entre cultivos de arroz. El cultivo Shan you 63 presentó una mayor exudación de AOBPM, principalmente ácido acético y fórmico.
Hoffland et al. 2006	Cultivo hidropónico deficiente en P y Zn.	Arroz Dular, clasificado como susceptible a la deficiencia de Zn. Arroz M79, clasificado como tolerante a la deficiencia de Zn. Arroz IR74 Arroz 614 Arroz 474 Arroz Jalmagna Arroz 507	Diferencias en la exudación de AOBPM entre genotipos de arroz, encontrándose una baja exudación de AOBPM (ácido oxálico y cítrico) en los genotipos susceptibles a la deficiencia de Zn (IR74 y Dular)

Incluso esta respuesta puede variar a nivel de factores transcripcionales, en donde dependiendo de la sobreexpresión de uno u otro factor transcripcional puede haber distintos efectos en la tolerancia a la deficiencia nutricional y por ende en la composición de exudados. Por ejemplo, Walker y Connolly (2008) encontraron en arroz, que la sobreexpresión de OsIRO2 (IRO2-OX) produce una mejora en el crecimiento ante la deficiencia de Fe, mientras que la sobreexpresión del factor transcripcional OsIRO2 RNAi conduce a una disminución en la biomasa de la planta y contenido de clorofila además de una menor acumulación de micronutrientes (Fe, Cu y Zn).

Otro punto importante es que en los estudios de extracción de exudados a nivel laboratorio, los investigadores trabajan con plantas en etapas tempranas de desarrollo, que va de 2 a 4 semanas (Tabla 3.16), con el fin de facilitar y acelerar la manipulación de muestras y plantas, sin embargo es conocido que el volumen y la naturaleza química de los exudados puede variar con el desarrollo de la planta (Chang *et al.* 2003).

Tabla 3.16 Toma de muestras de exudados radiculares en diversas especies vegetales.

Autor	Especie vegetal	Tiempo de toma de muestra (días post-germinación)
Gaume <i>et al.</i> 2001a	Maíz	21
Gaume <i>et al.</i> 2001b	Maíz	18
Lui <i>et al.</i> 2007	Arroz	44
Luo <i>et al.</i> 2008	Cebada	21

Por lo anterior es evidente que bajo las condiciones de estudio, los exudados radiculares del maíz (*Zea mays* var. Asgrow) mostraron como predominante al ácido oxálico, cuya exudación no mostró diferencia significativa entre los distintos tratamientos indicando una buena tolerancia al estrés de nutrientes, sin embargo no se descarta la presencia de otros AOBPM a nivel traza.

3.4 Modelación de la especiación química de metales en la fracción soluble del suelo

3.4.1. Muestreo y caracterización del suelo contaminado por metales pesados

Se realizó el muestreo en un sitio con antecedentes de contaminación debido a procesos de fundición de metales (Imagen 2.2). Algunos parámetros fisicoquímicos del suelo de estudio se presentan en la Tabla 3.17.

Tabla 3.17 Algunos parámetros fisicoquímicos realizados al suelo de estudio.

	Textura	pH	%MO	%CC	%H	Densidad
Muestra suelo	FA	8.13 ±0.01	8.10 ±0.30	50.2 ±0.30	42.9 ±0.60	1.2 g cm ⁻³

Valores promedio de n = 3±error estándar; MO: Materia orgánica; CC: Capacidad de campo; H: Humedad; FA: Franco-arcilloso

La textura del suelo está relacionada con la aireación, movimiento del agua, retención de humedad, retención de cationes, aniones y la disponibilidad de nutrimentos, lo que determina en gran parte la productividad, uso y manejo de suelos (Rodríguez y Rodríguez, 2002). El suelo de estudio mostró una textura franco arcillosa (Tabla 3.17) la cual puede permitir un sistema radicular profundo y por ende mayor disponibilidad de agua y nutrientes para las plantas (Keller, 2006).

De manera general, el pH del suelo que se considera ideal para la mayoría de los cultivos es de 5.8 a 7.5. Por debajo de 5.5 es probable que existan problemas de toxicidad de aluminio y/o manganeso en algunos cultivos, mientras que por encima de 7.5 generalmente se reduce la disponibilidad de fósforo y todos los micronutrientes a excepción del molibdeno (Imagen 3.5) (Rodríguez y Rodríguez, 2002). En el caso del suelo de estudio se encontró un pH de 8.1, el cual es considerado como medianamente alcalino (NOM-021-SEMARNAT-2000) y puede limitar la disponibilidad de macro y micronutrientes para las plantas (P, Fe, Mn, Cu y Zn).

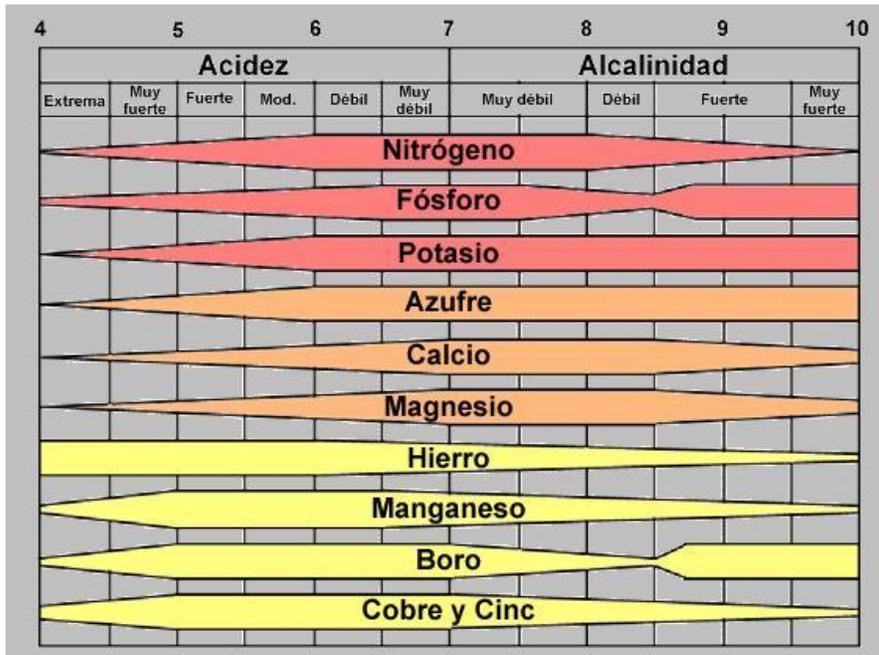


Imagen 3.5 Influencia del pH del suelo (Tomado de Rodríguez y Rodríguez, 2002). El ancho de banda que se muestra indica el mayor o menor grado en que cada elemento es asimilable, según el valor de pH del suelo.

Por otro lado, el análisis de metales totales en suelo sólo mostró una concentración considerablemente alta de plomo ($948 \text{ mg kg}^{-1} \pm 158$, $n = 3$), con respecto a lo establecido por la normatividad tanto nacional como extranjera (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004; EPA; directiva 86/278/CEE) (Tabla 3.18 y 3.19). Tales resultados indican un suelo contaminado con plomo, por lo que fue el elegido para evaluar la solubilidad del Pb en muestras del suelo de estudio por el ácido oxálico presente en los exudados radiculares del maíz (*Zea mays* var. Asgrow). Los demás metales

analizados no sobrepasaron los LMP establecidos por la normatividad nacional y extranjera, por lo que no fueron considerados para evaluar el efecto de los AOBPM en la solubilización de metales.

Tabla 3.18 Concentración de metales totales en el suelo de estudio.

Concentración de metales totales en suelo				
Metal	Cd	Ni	Pb	Zn
mg kg ⁻¹	6.71 ±0.40	14.7 ±3.77	948 ±158	906 ±54.9

Media ±error estándar n=3

Tabla 3.19 Valores límite de concentración de metales pesados en suelo

Contaminante (mg kg ⁻¹)	Normatividad	Uso agrícola	Uso industrial
Plomo 948±158	NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004	400	750
	EPA ¹	400*	1200**
	86/278/CEE ²	50-300	

1. Environmental Protection Agency; Identification of Dangerous Levels of Lead; Final Rule; 40 CFR Part 745;
 2. Límites establecidos por el consejo de las comunidades europeas (86/278/CEE); * Límites de plomo en suelo en áreas recreativas; ** Límites de plomo en suelo en áreas no recreativas.

3.4.2. Primera modelación: condiciones iniciales del suelo.

Con el fin de evaluar la especiación química del Pb en el suelo de estudio bajo condiciones normales, previo a la aplicación de los AOBPM encontrados en los exudados radiculares del maíz (*Zea mays* var. Asgrow) (ver punto 3.3.2) se realizó una caracterización de la solución de suelo. Las Tablas 3.20, 3.21 y 3.22 presentan los resultados obtenidos de dicha caracterización.

Tabla 3.20 Concentración de cationes en la fracción soluble del suelo de estudio.

Cationes solubles en H₂O	
Cationes	Concentración (mg L⁻¹)
Pb ²⁺	0.50±0.02
Zn ²⁺	0.75±0.08
Ca ²⁺	168±3.53
Mg ²⁺	15.7±0.43
Na ⁺	642±9.17
K ⁺	50.8±2.59
Fe total soluble*	5.66±0.23

Media ± error estándar, n = 6; * n = 3; Concentración a 100% CC.

Tabla 3.21 Concentración de aniones solubles en la fracción soluble del suelo de estudio.

Aniones solubles en H₂O	
Aniones	Concentración (mg L⁻¹)
Cl ⁻	77.4±1.65
SO ₄ ²⁻	577± 0.00
NO ₃ ⁻	11.6± 1.66
PO ₄ ³⁻	27.9± 1.99

Media ± error estándar; n = 3; Concentración a 100% CC.

Tabla 3.22 Determinación de pH y COT en solución de suelo

pH	8.40 ±0.02
COT (mg L⁻¹)	346 ±0.60
Cl (mg L⁻¹)	356 ±0.70

Valores promedio (n = 3) ± error estándar; Concentración a 100%

CC.

Tales resultados se introdujeron en el programa de especiación y saturación mineral Visual MINTEQ 3.0 para determinar la especiación química del Pb soluble en el suelo de estudio. Las Tablas 3.23 y 3.24 presentan la distribución química del Pb soluble calculado mediante Visual MINTEQ 3.0.

Tabla 3.23 Especiación química del plomo soluble en el suelo de estudio

(Visual MINTEQ 3.0)

Fuerza iónica	[Pb_{total}]	[Pb_{org}]	[Pb_{inorg}]	[Pb²⁺]
0.03	2.41	2.41	6.44E-04	5.09E-06

Pb_{total}: Pb total soluble en la solución de suelo; Pb_{org}: Complejos orgánicos de Pb; Pb_{inorg}: complejos inorgánicos de Pb; μM: concentración micromolar.

Tabla 3.24 Porcentajes (%) de complejos inorgánicos de Pb
(VisualMINTEQ 3.0).

Porcentajes (%) de complejos inorgánicos de Pb [Pb_{inorg}]						
Libre ⁽²⁺⁾	Cl ⁻	SO ₄ ⁻²	CO ₃ ⁻²	OH ⁻	PO ₄ ⁻³	NO ₃ ⁻
0.79	0.03	0.49	95.4	3.21	0.04	< 0.01

Pb_{inorg} : complejos inorgánicos de Pb; μ M: concentración micromolar.

La especiación química del plomo soluble (solución de suelo) en el suelo de estudio mostró concentraciones bajas de plomo soluble ($<1.0 \text{ mg L}^{-1}$) (Tabla 3.20 y 3.23); esto podría deberse a que dicho metal podría encontrarse en otras fracciones del suelo (unido a carbonatos, materia orgánica u óxidos de hierro y/o manganeso) (Tessier, *et al.* 1979; Cabral y Lefebvre, 1998) no solamente en la fracción intercambiable o como metal libre. Esto fue encontrado en la especiación química del Pb (primera modelación de la especiación química del suelo. Condiciones iniciales del suelo) (Tabla 3.23 y 3.24), la cual mostró que cerca del 100% del Pb en la solución de suelo se encontraba formando compuestos orgánicos con la materia orgánica del suelo (Pb_{org}), posiblemente con los ácidos húmicos y fúlvicos presentes en ella (Tabatabai y Sparks, 2005), mientras que $\leq 0.01\%$ se encontraba como complejos de Pb inorgánicos (Pb_{inorg}).

3.4.3. Segunda modelación: efecto de los AOBPM en la especiación química de Pb en la fracción soluble del suelo

Aplicando las ecuaciones 8-10 (sección 2.5.2.2) se estimó la exudación de ácido oxálico por las plantas de maíz en suelo (Tabla 3.25) con el fin de determinar la concentración de ácido oxálico para su aplicación en el suelo de estudio.

Tabla 3.25 Exudación radicular de ácido oxálico en muestras de maíz (*Zea mays* var. Asgrow) cultivadas bajo diferentes soluciones de cultivo

Días post-germinación	Completo	HD I (-)	HD I (+)	
	Exudación (mmol kg PF tallo ⁻¹ día ⁻¹)			
5	BLD	BLD	6.83 ±1.16	NC
10	BLD	BLD	3.49 ±0.75	NC
15	83.5 ±12.9	16.8 ±6.91b	75.0 ±45.1	NS
21	11.9 ±7.68	20.0 ±16.1	10.5 ±2.74	NS
23	59.5 ±20.6	32.8 ±2.03	20.7 ±9.93	NS
	NS	*	*	

Valores promedio de $n = 3 \pm$ error estándar; PF: Peso fresco; BLD: Bajo el Límite de Detección; Completo: solución nutritiva con macro y micronutrientes; HD I (-): sol. nutritiva deficiente en micronutrientes sin impedancia mecánica; HD I (+): sol. nutritiva deficiente en micronutrientes con impedancia mecánica; NC: No calculado; NS: No significativo ($p > 0.05$) (ANOVA); *: significativo ($p < 0.05$) (Kruskal-Wallis).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la caracterización y cuantificación de exudados radiculares en unidades de mmol kg peso fresco tallo⁻¹ día⁻¹ (Tabla 3.25) se eligieron 5 tratamientos para obtener los extractos de suelo para la modelación de la especiación del Pb influenciada por el ácido oxálico. (Tabla 3.26).

Tabla 3.26 Tratamientos de ácido oxálico aplicados al suelo de estudio.

Exudación medida (mmol oxálico kg PF tallo⁻¹ día⁻¹)	Ácido oxálico aplicado mmol oxálico kg suelo⁻¹*
22.5	30.0
45.0	60.0
67.5	90.0
90.0	120
112.5	150

*: mmol oxálico kg suelo⁻¹ calculados a partir de las ecuaciones 10-12 (sección 2.5.2.2)

La Tabla 3.27 muestra la concentración de Pb total soluble encontrado en las muestras bajo distintos tratamientos de ácido oxálico, así mismo podemos observar un aumento de hasta 2.5 veces en la concentración de Pb total soluble en el tratamiento de suelo tratado con 150 mmol oxálico con respecto al control, este incremento fue proporcional al aumento en la concentración de ácido oxálico aplicado al suelo. Este efecto se puede explicar debido a la formación de complejos solubles de Pb tal como describen Wang *et al.*(2007) y Wu *et al.*(2007).

Tabla 3.27 Concentración de Pb en la fracción soluble del suelo bajo distintos tratamientos de ácido oxálico.

Tratamiento (mmol ácido oxálico)	Pb (mg L⁻¹)
0	0.87 ±0.10 b
30	1.12 ±0.17 b
60	1.22 ±0.07 b
90	1.79 ±0.02 a
120	1.90 ±0.11 a
150	2.16 ±0.09 a

Valores promedio de n = 3 ± error estándar; ***: muy significativo (p<0.001, ANOVA); Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05, prueba Tukey).

Los resultados de la Tabla 3.28 indican que el ácido oxálico tiene la capacidad de solubilizar Pb de fracciones no disponibles en el suelo; lo que concuerda con estudios de diversos autores, quienes han encontrado que otros ácidos orgánicos, tales como el tartárico (Ke *et al.*, 2006), cítrico (Evangelou *et al.* 2006b), málico (Wang *et al.* 2007), oxálico (Liu *et al.* 2008) tienen potencial de solubilizar metales pesados en el suelo.

Tabla 3.28 Especiación química de Pb bajo distintos tratamientos de ácido oxálico (Visual MINTEQ 3.0)

Tratamientos (mmol ácido oxálico)	Pb nM	Pb ²⁺ nM	Pb-MO nM	Pb-oxalato nM
0	4199 b	0.54479 a	4196 ac	0
30	5410 b	0.23757 b	4440 a	979 d
60	5890 b	0.16792 b	3729 acd	2141 d
90	8640 a	0.16481 b	4080 ab	4558 c
120	9170 a	0.12005 b	2782 bc	6371 b
150	10430 a	0.089405 b	2437 bd	7971 a

Valores promedio de $n=3 \pm$ error estándar; Pb: Plomo total soluble; Pb²⁺: Plomo libre; Pb-MO: Complejos plomo-materia orgánica; Pb-oxalato: Complejos plomo-oxalato, incluye complejos mono y bidentados; *** Muy significativo ($p<0.001$) ANOVA; Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$, Tukey) (leer verticalmente).

Así mismo, bajo los tratamientos aplicados, la especiación química del Pb en el suelo de estudio se vio modificada por la aplicación de ácido oxálico mostrando un incremento significativo ($p<0.05$) en los complejos Pb-oxalato (Figura 3.9) mientras que los complejos Pb-MO disminuyeron al incrementar la concentración de ácido oxálico aplicada (Tabla 3.28; Figura 3.8). Entre la totalidad de los complejos orgánicos Pb-oxalato, las especies predominantes fueron los complejos bidentados con el oxalato (>99%).

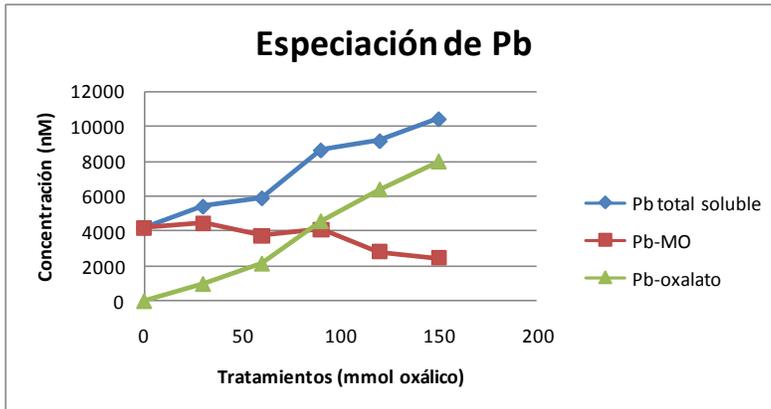


Figura 3.8 Especiación química de plomo bajo los distintos tratamientos de ácido oxálico. Pb-MO: complejos plomo-materia orgánica; Pb-oxalato: complejos plomo-oxalato; Pb: plomo total soluble. Las especies mostradas corresponden a >99% del Pb total soluble en el suelo.

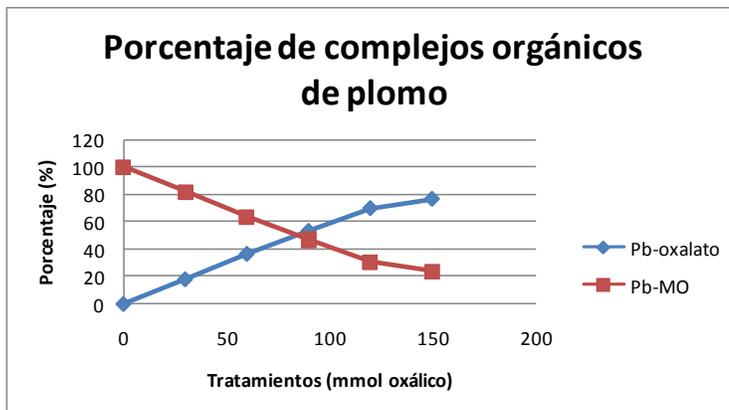


Figura 3.9 Porcentaje de complejos orgánicos de plomo bajo los distintos tratamientos de ácido oxálico. Las especies mostradas corresponden a >99% del Pb total soluble en el suelo.

Estos resultados (Tabla 3.28; Figura 3.8) son de interés debido al potencial que pudieran tener para movilizar metales en suelos contaminados y sus posibles aplicaciones para remediación. En primera instancia, la aplicación de AOBPM al

suelo representa un bajo riesgo ambiental debido a que presentan bajos efectos fitotóxicos y son fácilmente biodegradables comparados con agentes como el EDTA, NTA y DPTA (Chaves de Melo *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2006b), compuestos que han sido ampliamente reportados como agentes químicos en tecnologías de remediación de suelos contaminados por metales pesados (Wu *et al.* 2007), además los AOBPM son de relativamente bajo costo y causan pocos disturbios en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo.

Las posibilidades de uso de los AOBPM para la remediación son diversas. Se ha demostrado que el lavado de suelos con AOBPM ha logrado resultados favorables, por ejemplo, Ke *et al.* (2006) utilizando la técnica de lavado de suelos, lograron una remoción de hasta un 50% de Pb empleando diferentes concentraciones de ácido tartárico (0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 mol L⁻¹) mezclado en suelo por 24 h.

Zhang *et al.* (2005) estudiaron el efecto en la solubilidad de As por los ácidos cítrico, oxálico y málico en concentraciones de 1-10mM en una relación 1:10 suelo:solución extractante (1, 2, 4, 6, 8 y 10mM) encontrando que los AOBPM pueden incrementar la solubilidad de As con un orden de disolución de: cítrico> oxálico > málico. Wuana *et al.* (2010), en un estudio similar de lavado de suelos encontraron que los AOBPM (cítrico y tartárico) pueden incrementar la solubilidad Pb en un 31.0 y 16.7% respectivamente, cuando son aplicados al suelo en concentraciones de 0.05M en una relación 1:25 suelo:agua.

Es importante considerar que pese a la información previamente mostrada del uso de AOBPM para lavado de suelos, existen otras variantes menos

estudiadas de remediación asistida por AOBPM. Un ejemplo es la fitoextracción asistida por AOBPM.

Liu *et al.* (2008), en un estudio de fitoextracción asistida por ácido oxálico encontraron que concentraciones de 5.5 y 10 mmol kg suelo⁻¹ incrementaron la acumulación de Pb en tallo de *Sedum alfredii* Hance en un 33.2% comparado con el control, incluso siendo mejor que los resultados obtenidos por la aplicación de DPTA y EDDS. Así mismo, Wang *et al.* (2007) encontraron que los ácidos cítrico y málico en una relación 1:10 Pb:AOBPM intensificaron la remoción de Pb por *Triticum aestivum* L. en suelo.

Evangelou *et al.* (2006b) estudiaron la fitoextracción asistida por AOBPM (ácido cítrico, oxálico y tartárico) y EDTA, encontrando que solamente el EDTA mostró un incremento significativo en la absorción de Pb por *Nicotiana tabacum*, sin embargo, el EDTA presentó severos efectos fitotóxicos (disminución en el peso seco de tallo y raíz, lesiones necróticas) a muy bajas concentraciones (0.25 mmol kg⁻¹) comparadas con las concentraciones empleadas de AOBPM (62.5, 125 y 250 mmol kg suelo⁻¹). De igual manera, Kim y Lee (2010) concluyen que el EDTA incrementó la concentración de Pb al doble en tallo y 10 veces más en raíz de *Echinochloa crus galli* comparado con el control, sin embargo el EDTA incrementó la capacidad de lixiviado de metales que podría ser perjudicial para las plantas y el suelo, además podría alcanzar cuerpos de agua subterráneos. En contraste, en el mismo estudio, el ácido oxálico incrementó 3 y 2.3 veces más la concentración de Pb en tallo y raíz respectivamente sin presentar problemas de lixiviado debido a que los AOBPM son fácilmente biodegradables (Evangelou *et al.* 2006b).

Por otro lado, Haoliang *et al.* (2007) concluyen que los AOBPM presentes en los exudados (fórmico, acético, láctico, butírico, propiónico, maléico, fumárico, cítrico y tartárico) de *Kandelia candel* L. juegan un papel importante en la disponibilidad de Cd para las plantas y que los AOBPM pueden modificar la distribución de Cd en el suelo y aumentaron la fracción intercambiable de Cd.

Otra de las aplicaciones del presente estudio puede ser asumida utilizando técnicas de fitoextracción en un cultivo mixto de una planta acumuladora de metales y una planta productora de exudados radiculares. Actualmente, existe muy poca información de estudios de este tipo, por ejemplo, Luo *et al.* (2008) trabajando con *Hordeum vulgare* (productora de exudados) y *Pisum sativum* (acumuladora de metales) encontraron que la acumulación de Pb en el chícharo cultivado en cultivo mixto con la cebada aumentó 1.7 veces comparado con el crecimiento del mismo de manera individual, concluyendo que los exudados radiculares de la cebada juegan un papel importante en la solubilización de metales en suelos.

Considerando que los exudados radiculares están compuestos en gran proporción por AOBPM (incluyendo ácido oxálico) la aplicación de fitotecnologías de cultivos mixtos para la remediación de suelos contaminados con Pb podría ser muy prometedora debido a la extracción de metales pesados sin la aplicación de AOBPM comerciales, lo que reduce considerablemente los costos de operación de una tecnología de por sí económica, sustentable y no destructiva.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el presente proyecto se puede establecer que se logró inducir la producción de ácido oxálico por las raíces de *Zea mays* var. Asgrow cuando fue cultivada en un medio deficiente en Fe, Cu y Zn. De igual manera se evaluó el efecto en la solubilización de Pb en suelo por el AOBPM dominante en los exudados (i.e. ácido oxálico), encontrando que este podría ser eficiente como movilizador de Pb en suelos contaminados. Estos resultados sugieren varios posibles usos del ácido oxálico para la remediación de suelos contaminados por Pb, que incluyen tecnologías de lavado de suelos, fitoextracción asistida químicamente y la utilización de cultivos mixtos. Probar las tecnologías anteriormente descritas en campo no fue un objetivo de la presente investigación, sin embargo, futuros estudios pueden enfocarse a estudiar el alcance de estos resultados en estudios *in situ* con la finalidad de considerar las propiedades del suelo (pH, microorganismos, metabolitos producidos por microorganismos, capacidad de intercambio de cationes, penetrabilidad), metal contaminante (especies metálicas, distribución) especie vegetal (especie vegetal, estado de crecimiento, condiciones ambientales) y del agente químico utilizado (biodegradabilidad en suelo, concentración, múltiples aplicaciones ó liberación continua de éste, entre otros).

4. CONCLUSIONES

Basados en los resultados de la presente investigación y bajo las condiciones experimentales descritas en el presente estudio, se concluye que:

- El maíz (*Zea mays* var. Asgrow) mostró buena adaptación al cultivo hidropónico bajo condiciones de deficiencia de micronutrientes, además mostró como AOBPM predominante en sus exudados radiculares al ácido oxálico, sin embargo no se descarta la presencia de otros ácidos orgánicos a nivel de traza.
- Se identificó y caracterizó un suelo históricamente contaminado encontrando la presencia de Pb y que superan los LMP de la normatividad nacional (400 mg kg⁻¹ uso agrícola y 750 mg kg⁻¹ uso industrial) y extranjera (EUA: 400 mg kg⁻¹ áreas recreativas; UE: 50-300 mg kg⁻¹).
- La modelación de la especiación química de Pb en la solución de suelo sin tratar mostró que cerca del 100% del Pb soluble se encontraba en forma de complejos orgánicos con la materia orgánica del suelo (posiblemente ácidos húmicos y fúlvicos).
- La aplicación de ácido oxálico al suelo de estudio incrementó en un 148% (2.5 veces más) la concentración de Pb en la fracción soluble del suelo respecto al blanco. Este aumento se debió a la formación de complejos orgánicos del Pb con el ácido oxálico, mostrando como

complejo predominante en la solución de suelo los complejos bidentados con el oxalato ($\text{Pb}(\text{oxalato})_2^{-2}$).

- La presente investigación aporta datos relevantes del uso del ácido oxálico para la solubilización de Pb en el suelo contaminado de estudio. Esto puede ser considerado como una alternativa viable para la remediación de suelos contaminados por metales pesados mediante lavado de suelos, fitoextracción asistida por AOBPM o mediante la utilización de cultivos mixtos de especies vegetales acumuladoras de metales y especies vegetales productoras de exudados.

BIBLIOGRAFÍA

- Abadía, J., López-Millán, A.F., Rombolà, A., Abadía, A. **(2002)** Organic acids and Fe deficiency: a review. *Plant and Soil*, 241: 75-86.
- Allison Geoscience Consultan, Inc. and HydroGeologic, Inc. **(1999)** MINTEQA2/PRODEFA2, A geochemical Assessmente model for environment systems: User manual supplement for version 4.0. U.S. Environment Protection Agency, National Exposure Research Laboratory, Ecosystem Research Division.
- Alves, V.M.C., Parentoni, S.N., Vasconcellos, C.A., Bahia, A.F.C., Pitta, G.V.E., Shaffert, R.E. **(2001)** Mechanisms of phosphorus efficiency in maize. *Plant nutrition- Food security and sustainability of agro-ecosystems*. 566-567.
- Bacilio, M.J., Aguilar, S., Ventura, E., Pérez, E., Bouquelet, S., Zenteno, E. **(2003)** Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant and Soil*, 249: 271-277.
- Botha, M. **(2007)** Typical nutrient deficiency symptoms seen on plant foliage (27-septiembre-2007) (online) Disponible en: <http://nutrico.org/newsletter/?p=12> (17-septiembre-2009).
- Cabral, A. and Lefebvre, G. **(1998)** Use of sequential extraction in the study of heavy metal retention by silty soils. *Water, Air and Soil pollution*, 102: 329-344.

- Chaignon, V., Di Malta, D., Hinsinger, P. **(2002)** Fe-deficiency increases Cu acquisition by wheat cropped in a Cu-contaminated vineyard soil. *New Phytologist*, 154: 121-130.
- Chang, A.C., Crowley, D.E., Page, A.L. **(2003)** Assessing bioavailability of metals in biosolids treated soils. Water and environment research foundation. IWAP ISBN: 1-84339-679-3.
- Chaves de Melo, E.E., Nascimento, C.W.A., Aguiar, A.M., Queiroz, A.C. **(2008)** Phytoextraction and fractionation of heavy metals in soil after multiple applications of natural chelants. *Scientia Agricola*, 65: 61-68.
- Chen, Z., Kim, K.R., Owens, G., Naidu, R. **(2008)** Determination of carboxylic acids from plant root exudates by ion exclusion chromatography with ESI-MS. *Chromatographia*, 67: 117-117.
- Chen, Z., Jin, X., Wang, Q., Lin, Y., Gan, L., Tang, C. **(2007)** Confirmation and determination of carboxylic acids in root exudates using LC-ESI-MS. *Journal of Separation Science*, 30:2440-2446.
- Chen, Y-L., Guo, Y., Han, S., Zou, C., Zhou, Y., Cheng, G. **(2002)** Effect of root derived organic acids on the activation of nutrients in the rhizosphere soil. *Journal of Forestry Research*, 13(2): 115-118.
- Chen, H.M., Zheng, C.R., Tu, C., Shen, Z.G. **(2000)** Chemical methods and phytoremediation of soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere*, 41: 229-234.
- Dakora, F.D., and Phillips, D.A. **(2002)** Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-environments. *Plant and Soil*, 245: 35-47.

- Degryse, F., Verma, V.K., Smolders, E. **(2008)** Mobilization of Cu and Zn by root exudates of dicotyledonous plants in resin-buffered solution and in soil. *Plant and Soil* 306: 69-84.
- Elizondo, J., Boschini, C. **(2002)** Producción de forraje con maíz criollo y maíz híbrido. *Agronomía mesoamericana*, 13(1): 13-17.
- Environmental Protection Agency, 40 CFR Part 745 Lead; Identification of dangerous levels of lead; Final rule.
- Evangelou, M.W.H., Ebel, M., Schaeffer, A. **(2006a)** Evaluation of the effect of small organic acids on phytoextraction of Cu and Pb from soil with tobacco *Nicotiana tabacum*. *Chemosphere*, 63: 996-1004.
- Evangelou, M.W.H. **(2006b)** Organic acids effects on desorption of heavy metals from a contaminated soil. *Scientia Agricola* 63(3): 276-280.
- Erro, J.; Zamarreño, A.M., Yvin, J-C, García, J.M. **(2009)** Determination of organic acids in tissues and exudates of maize, lupin and chickpea by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural, Food and Chemistry*, 57: 4004-4010.
- Feng, J.M., Ueno, H., Ueno, D., Domenico, A.R., Iwashita, T. **(2003)** Characterization of phytosiderophore secretion under Fe deficiency stress in *Festuca rubra*. *Plant and Soil*, 256: 137-137.
- Gaume, A., Mächler, F., Frossard, E. **(2001a)** Aluminum resistance in two cultivars of *Zea mays* L.: Root exudation of organic acids and influence of phosphorus nutrition. *Plant and Soil*, 234: 73-81.

- Gaume, A., Mächler, F., De León, C., Narro, L., Frossard, E. **(2001b)** Low-P tolerance by maize (*Zea mays* L.) genotypes: Significance of root growth, and organic acids and phosphatase root exudation. *Plant and Soil*, 228: 253-264.
- Gaytán, B., Martínez, G., Mayek, P. **(2009)** Rendimiento de grano y forraje en híbridos de maíz y su generación avanzada F₂. *Agricultura Técnica en México*, 35(3): 295-304.
- Greger, M., and Landberg, T. **(2008)** Role of rhizosphere mechanisms in Cd uptake by various wheat cultivars. *Plant and Soil*, 312: 195-205.
- Groleau-Renaud, V., Plantureux, S., Guckert, A. **(1998)** Influence of plant morphology on root exudation of maize subject to mechanical impedance in hydroponic conditions. *Plant and Soil*, 201: 231-239.
- Gustafsson, J.P. **(2010)** Visual MINTEQ. A free equilibrium speciation model. Beta version now released (on-line). Disponible en: <http://www.lwr.kth.se/English/OurSoftware/vminteq/beta.html>.
- Han, F., Shan, X., Zhang, S., Wen, B., Owens, G. **(2006)** Enhanced cadmium accumulation in maize roots: The impact of organic acids. *Plant and Soil*, 289: 355-368.
- Haoliang, L., Chongling, Y., Jingchun, L. **(2007)** Low molecular-weight organic acids exuded by Mangrove (*Kandelia candel* L.) roots and their effect on cadmium species change in the rhizosphere, 61:159-166.

- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., Jaillard, B. **(2003)** Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil*, 248: 43-59.
- Hodge, A., Berta, G., Doussan, C., Merchan, F., Crespi, M. **(2009)** Plant root growth, architecture and function. *Plant and Soil*, 321: 153-187.
- Hoffland, E., Wei, C., Wissuwa, M. **(2006)** Organic anion exudation by lowland rice (*Oryza sativa* L.) at zinc and phosphorus deficiency. *Plant and Soil*, 283: 155-162.
- Ke, X., Li, P.J., Zhou, Q.X., Zhang, Y., Sun, T.H. **(2006)** Removal of heavy metals from a contaminated soil using tartaric acid. *Journal of Environmental Sciences*, 18(4): 727-733.
- Keller C. **(2006)** Chapter 8 Factors limiting efficiency of phytoextraction at multi-metal contaminated sites, *Phytoremediation of Metal Contaminated Soils*. Springer, 241-266.
- Keller, C., Hammer, D., Kayser, A., Richner, W., Brodbeck, M., Sennhauser, M. **(2003)** Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field. *Plant and Soil*, 249: 67-81.
- Kim, S.H., Lee, I.S. **(2010)** Comparison of the ability of organic acids and EDTA to enhance the phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil, 84:255-259.
- Jones, D.L. **(1998)** Organic acids in the rhizosphere- a critical review. *Plant and Soil*, 25: 25-44.

- La Jornada **(2006)** Crean residencial para ricos sobre basurero de residuos tóxicos (4/agosto/2006) (on-line). Disponible en: <http://www.jornada.unam.mx/2006/08/04/index.php?section=estados&article=035n1est>. (30/enero/2009).
- Lesage E., Meers E., Vervaeke E., Lamsal S., Hopgood M., Tack F.M.G., Verloo M.G. **(2005)**, Enhanced phytoextraction: II. Efecto of EDTA and citric acid on heavy metal uptake by *Helianthus Annuus* from a calcareous soil. International Journal of phytoremediation, 7: 143-152.
- Legnani, G., Watkins, C. B., Miller, W.B. **(2010)** Effects of hypoxic and anoxic controlled atmospheres on carbohydrates, organic acids, and fermentation products in Asiatic hybrid lily bulbs. Postharvest Biology and Technology, 56: 85-94.
- Lesage, E., Meers E., Vervaeke, E., Lamsal S., Hopgood, M., Tack, F.M.G., Verloo, M.G. **(2005)** Enhanced phytoextraction: II. Effect of EDTA and citric acid on heavy metal uptake by *Helianthus annuus* from a calcareous soil. International Journal of phytoremediation, 7: 143-152.
- Liu, D., Islam, E., Li, T., Yang, X., Jin, X., Mahmood, Q. **(2008)** Comparison of synthetic chelators and low molecular weight organic acids in enhancing phytoextraction of heavy metals by two ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. Journal of Hazardous Materials, 153: 114-122.
- Liu, J., Quian, M., Cai, G., Zhu, Q., Wong, M.H. **(2007)** Variations between rice cultivars in root secretion of organic acids and the relationship with plant cadmium uptake. Environmental Geochemistry and Health, 29: 189-195.

- López-Chuken U.J. and Young, S.D. **(2010)**. Modelling sulphate-enhanced cadmium uptake by *Zea mays* from nutrient solution under conditions of constant free Cd^{2+} ion activity. *Journal of Environmental Sciences*. 22(7): 1-6.
- Luo, C.L., Shen, Z.G., Li, X.D. **(2008)** Root exudates increase metal accumulation in mixed cultures: Implications for naturally enhanced phytoextraction. *Water, Air and Soil Pollution*, 193: 147-154.
- Marchi, G., Guimaraes, L.R., Chang, A.C., Araújo, C.W. **(2009)** Heavy metals extractability in a soil amended with sewage sludge. *Scientia Agricola*, 66(5): 643-649.
- Moreno, A.M., Marchi, G., Mattiazzo, M.A., Guimaraes, L.R. **(2007)** Organic acids in the rhizosphere and phytoavailability of sewage sludge-borne trace elements. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 42: 917-924.
- Nascimento, C.W.A., Amarasiriwardena, D., Xing, B. **(2006a)** Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. *Environmental Pollution*, 140: 114-123.
- Nascimento, C.W.A., **(2006b)** Organic acids effects on desorption of heavy metals from a contaminated soil. *Scientia Agricola* 63(3): 276-280.
- Neumann, G. and Römheld, V. **(2000)** The release of root exudates as affected by the plant's physiological status. In *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances in the soil-plant interface*. Eds. R Pinton, Z Varanini and P Nannipieri. pp. 41– 93. Marcel Dekker, Inc., New York.

- Neumann, G. **(2007)** Root exudates and nutrient cycling. (Book chapter) Soil biology. Nutrient cycling in terrestrial ecosystem, Marschner, P., Rengel, Z. (eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 10: 123- ISBN 978-3-540-68026-0.
- Nigam, R., Srivastava, S., Prakash, S., Srivastava, M.M. **(2001)** Cadmium mobilisation and plant availability – the impact of organic acids commonly exuded from roots. Plant and Soil, 230: 107-113.
- Diario Oficial de la Federación, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Norma Oficial Mexicana NMX-AA-008-SCFI-2000 Análisis de agua. Determinación del pH. Método de prueba. <http://www.semarnat.gob.mx/leyesynormas/normas/Normas%20Mexicanas%20Vigentes/NMX-AA-008-SCFI-2000.pdf>
- Diario Oficial de la Federación, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Norma Oficial Mexicana NMX-AA-029-SCFI-2001 Análisis de agua. Determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas- Método de prueba. <http://www.semarnat.gob.mx/leyesynormas/normas/Normas%20Mexicanas%20Vigentes/NMX-AA-029-SCFI-2001.pdf>
- Diario Oficial de la Federación, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Norma Oficial Mexicana NMX-AA-051-SCFI-2001. Análisis de agua. Determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.

<http://www.semarnat.gob.mx/leyesynormas/normas/Normas%20Mexicanas%20Vigentes/NMX-AA-051-SCFI-2001.pdf>

- Diario Oficial de la Federación, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Norma Oficial Mexicana NMX-AA-073-SCFI-2001 Análisis de agua- Determinación de cloruros totales en aguas naturales, residuales y residuales tratadas- Método de prueba.
<http://www.semarnat.gob.mx/leyesynormas/normas/Normas%20Mexicanas%20Vigentes/NMX-AA-073-SCFI-2001.pdf>
- Diario Oficial de la Federación, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Norma Oficial Mexicana NMX-AA-074-1981 Análisis de agua- Determinación del ión sulfato.
<http://www.semarnat.gob.mx/leyesynormas/normas/Normas%20Mexicanas%20Vigentes/NMX-AA-074-1981.pdf>
- Diario Oficial de la Federación, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Norma Oficial Mexicana NMX-AA-079-SCFI-2001 Análisis de aguas- Determinación de nitratos en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas- Método de prueba.
<http://www.semarnat.gob.mx/leyesynormas/normas/Normas%20Mexicanas%20Vigentes/NMX-AA-079-SCFI-2001.pdf>
- Diario Oficial de la Federación, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.

<http://www.semarnat.gob.mx/leyesynormas/normas/Normas%20Oficiales%20Mexicanas%20vigentes/NOM-021-RECNAT-2000.pdf>

- Diario Oficial de la Federación, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. <http://www.ingenieroambiental.com/?pagina=3648>
- Diario Oficial de la Federación, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Norma Oficial Mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/1392/1/NOM-147-SEMARNAT_SSA1-2004.pdf
- Núñez, G., Faz, C., González, F., Peña, A. **(2005)** Madurez de híbridos de maíz a la cosecha para mejorar la producción y calidad del forraje. Técnica Pecuaria en México, 43(1): 69-78.
- Núñez, H.G., Faz, C., Tovar, G., Zavala, G. **(2001)** Híbridos de maíz para la producción de forraje con alta digestibilidad en el norte de México. Técnica Pecuaria en México, 41: 63-74.
- Pál, M., Horváth, E., Janda, T., Páldi, E., Szalai, G. **(2006)** Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 169: 239-246.

Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm, Sangría francesa: 0.75 cm

- Peer, A.W., Baxter, I.R., Richards, E.L., Freeman, J.L., Murphy, A.S. **(2005)** Phytoremediation and hyperaccumulator plants. Book: Topics in Current Genetics, Editorial Springer Berlin Heidelberg, Vol. 14, 299-340.
- Pierzynski, G.M., Sims, J.T., Vance, G.F. **(2005)** Soils and Environmental Quality, Taylor & Francis Group, USA. pp. 11-17, 332-333, 338-342, 346-348, 453-454, 456-463.
- Reetz, H. **(2001)**. Efficient fertilizer use soil sampling for high yield agriculture, *URL:* www.rainbowplantfood.com/agronomics/efu/sampling.pdf, 17/oct/2008.
- Rinnan, R., Gehrke, C., Michelsen, A. **(2006)** Two mire species respond differently to enhanced ultraviolet-B radiation: effects on biomass allocation and root exudation. *New Phytologist*, 169: 809-818.
- Ríos, F., Espinosa, E., Vergara, S., Torres, M., Hernández, M., Sánchez, H. **(2010)** Producción, productividad y rentabilidad de maíz forrajero (*Zea mays*) regado por gravedad en la laguna, México de 1990 a 2005. *Revista Chapingo. Serie Zonas áridas*, 9:5-10.
- Rodríguez, H., Rodríguez, J. **(2002)** Métodos de análisis de suelo y plantas. Criterios de interpretación. Editorial Trillas, 1ª edición. ISBN 968-24-6596-6.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) **(2008)** Breves monografías agrícolas. Maíz forrajero (on-line) (25-septiembre-2010). Disponible en: <http://w4.siap.gob.mx/AppEstado/Monografias/agricola.html>.
- Shane, M.W., Lambers, G.R., Cawthray, G.R., Kuhn, A.J., Schurr, U. **(2008)** Impact of phosphorus mineral source (Al-P or Fe-P) and pH on cluster root

formation and carboxylate exudation in *Lupinus albus* L. *Plant and Soil*, 304: 169-178.

- Srivastava, S., Prakash, S., Srivastava, M.M. **(1999)** Studies on mobilization of chromium with reference to its plant availability – Role of organic acids. *BioMetals*, 12: 201-207.
- Sterckeman, T., Duquene, L., Jérôme, P., Morel, J.L. **(2005)** Quantifying the effect of rhizosphere process on the availability of soil cadmium and zinc. *Plant and Soil*, 276: 335-345.
- Sun, B., Zhao, F.J., Lombi, E., McGrath, S.P. **(2001)** Leaching of heavy metals from contaminated soils using EDTA: *Environmental Pollution*, 113: 11-120.
- Tabatabai, M.A. and Sparks, D.L. **(2005)** *Chemical Processes in soils*. Soil Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Blsson, M. **(1979)** Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry*, Vol. 51(7): 844-851.
- Todd, A.M., Ruby, M.V. **(2004)** Review of in situ remediation technologies for lead, zinc and cadmium in soil. Wiley Interscience DOI: 10.1002/rem.20011, <http://www.interscience.wiley.com>.
- Tu, S., Ma, L., Luongo, T. **(2004)** Root exudates and arsenic accumulation in arsenic hyperaccumulating *Pteris vittata* and non-hyperaccumulating *Nephrolepis exaltata*. *Plant and Soil*, 258: 9-19.

- Volke, S.T. y Velasco T.J.A. **(2002)** Tecnologías de remediación de suelos contaminados. INE-SEMARNAT, México. ISBN: 958-817-557-9. pp. 9, 20-24.
- Walker, E.L., Connolly, E.L. **(2008)** Time to pump iron: iron-deficiency-signaling mechanisms of higher plants. *Plant biology*, 11: 530-535.
- Wei, Z.G., Wong, J.W.C., Zhao, H.Y., Zhan, H.J., Li, H.X., Hu, F. **(2007)** Separation and determination of heavy metals associated with low molecular weight chelators in xylem saps of Indian Mustard (*Brassica juncea*) by size exclusion chromatography and atomic absorption spectrometry. *Biological Trace Element Research*, 118: 146-158.
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E., Imborvungu, J.A. **(2010)** Removal of heavy metals from a contaminated soil using organic chelating acids. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 7(3): 485-496.
- Wang, P., Zhou, R., Cheng, J., Bi, S. **(2007)** LC determination of trace short-chain organic acids in wheat root exudates under aluminum stress. *Chromatographia*, 66: 867-872.
- Wu, L.; Luo, Y., Song, J **(2007)** Manipulating soil metal availability using EDTA and low molecular weight organic acids. *Methods in Biotechnology, Phytoremediation: Methods and reviews*, 21: 291-303.
- Yu, Y., Yu, J., Shan, Q., Fang, L., Jiang, D. **(2008)** Organic acid exudation from the roots of *Cunninghamia lanceolata* and *Pinus massoniana* seedlings under low phosphorus stress. *Frontiers of Forestry in China*, 3(1): 117-120.

- Zhang, S., Li, W., Shan, X.Q., Lu, A., Zhou, P. **(2005)** Effects of low molecular weight organic anions on the release of arsenite and arsenate from a contaminated soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 167: 111-122.
- Zheng, S.J., Yang, J.L., Feng, Y., Hui Yu, X., Zhang, L., Feng, J., Fang, R., Matsumoto, H. **(2005)** Immobilization of Aluminum with phosphorus in roots is associated with high aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiology*, 138: 297-303.

5. ANEXOS

Tabla 5.1 Datos de entrada para el modelo de especiación y saturación mineral Visual MINTEQ 3.0

Tratamiento	pH	Na (mg L ⁻¹)	K (mg L ⁻¹)	Ca (mg L ⁻¹)	Mg (mg L ⁻¹)	Fe (mg L ⁻¹)	Pb (mg L ⁻¹)	Zn (mg L ⁻¹)
T-0mM A	7.84	604	44.0	155	19.4	1.19	0.79	0.33
T-0mM B	7.88	546	35.0	185	20.2	0.73	0.78	0.30
T-0mM C	7.86	611	31.2	197	16.0	0.72	1.04	0.30
T-30mM A	7.51	697	52.4	398	35.5	2.55	1.20	0.16
T-30mM B	7.54	583	52.0	407	40.7	3.41	0.80	0.19
T-30mM C	7.55	605	46.0	400	43.2	5.22	1.37	0.16
T-60mM A	7.55	787	55.1	484	41.7	4.13	1.20	0.19
T-60mM B	7.56	600	50.7	426	37.3	1.82	1.10	0.17
T-60mM C	7.58	666	57.6	646	38.1	7.67	1.35	0.16
T-90mM A	7.58	750	59.8	505	43.1	4.06	1.76	0.18
T-90mM B	7.54	572	52.8	415	39.0	2.58	1.82	0.17
T-90mM C	7.6	660	54.8	536	39.3	2.03	1.79	0.15
T-120mM A	7.33	548	56.7	390	37.1	1.98	1.70	0.24
T-120mM B	7.29	680	59.0	281	43.6	2.15	1.91	0.28
T-120mM C	7.3	552	70.9	336	41.1	2.10	2.08	0.24
T-150mM A	7.28	686	58.2	322	42.9	3.47	2.01	0.37
T-150mM B	7.31	660	62.5	414	36.4	2.12	2.15	0.28
T-150mM C	7.35	592	56.1	324	36.1	3.31	2.31	0.43

Tabla 5.2 Datos de entrada para el modelo de especiación y saturación mineral Visual MINTEQ 3.0 (Continuación)

Tratamiento	NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	PO ₄ ³⁻ (mg L ⁻¹)	Cl ⁻ (mg L ⁻¹)	CO ₃ ²⁻	Materia orgánica (mg L ⁻¹)	Ácido oxálico (mg L ⁻¹)
T-0mM A	29.9	637	59.7	74.1	356	346	0
T-0mM B	24.9	756	59.7	74.1	356	346	0
T-0mM C	29.9	736	63.7	79.0	356	346	0
T-30mM A	19.9	657	35.8	59.3	356	346	5132
T-30mM B	39.8	577	31.8	64.2	356	346	5132
T-30mM C	19.9	577	29.9	69.1	356	346	5132
T-60mM A	34.8	637	31.8	74.1	356	346	10263
T-60mM B	34.8	597	41.8	83.9	356	346	10263
T-60mM C	24.9	597	31.8	83.9	356	346	10263
T-90mM A	14.9	597	39.8	64.2	356	346	15395
T-90mM B	29.9	557	37.8	59.3	356	346	15395
T-90mM C	14.9	677	27.9	69.1	356	346	15395
T-120mM A	49.8	557	35.8	59.3	356	346	20527
T-120mM B	59.7	557	27.9	59.3	356	346	20527
T-120mM C	69.7	677	33.8	64.2	356	346	20527
T-150mM A	59.7	597	33.8	74.1	356	346	25659
T-150mM B	69.7	597	23.9	79.0	356	346	25659
T-150mM C	59.7	577	23.9	74.1	356	346	25659

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Adriana Ibarra Rubio

Candidata para obtener el Grado de

M. C. con Especialidad en Química Analítica Ambiental

Tesis: CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS DE BAJO PESO MOLECULAR PRESENTES EN EXUDADOS RADICULARES DE *Zea mays*: APLICACIONES PARA LA REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR METALES PESADOS.

Campo de Estudio: Química Analítica Ambiental

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 29 de Febrero de 1988, hija de Mario Ibarra Gutiérrez y Martha Alicia Rubio Ibarra.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo, 2008.