

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL



DOCTORADO EN INGENIERÍA

# **APLICACIÓN DE UNA TECNOLOGÍA SUSTENTABLE PARA LA BIOPURIFICACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE NUTRIENTES DE EFLUENTES DE ALTO IMPACTO AMBIENTAL**

Mariana Guadalupe Abrile

**FICH**

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS HÍDRICAS

**INTEC**

INSTITUTO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO PARA LA INDUSTRIA QUÍMICA

**CIMEC**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE MÉTODOS COMPUTACIONALES

**sinc(*i*)**

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN SEÑALES, SISTEMAS E INTELIGENCIA  
COMPUTACIONAL



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas  
Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química  
Centro de Investigación de Métodos Computacionales  
Instituto de Investigación en Señales, Sistemas e Inteligencia Computacional

**APLICACIÓN DE UNA TECNOLOGÍA SUSTENTABLE  
PARA LA BIOPURIFICACIÓN Y APROVECHAMIENTO  
DE NUTRIENTES DE EFLUENTES DE ALTO IMPACTO  
AMBIENTAL**

**Mariana Guadalupe Abrile**

Tesis remitida al Comité Académico del Doctorado  
como parte de los requisitos para la obtención  
del grado de  
DOCTOR EN INGENIERIA  
Mención Ambiental  
de la  
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

**2023**

Secretaría de Posgrado, Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas, Ciudad Universitaria, Paraje "El  
Pozo",  
S3000, Santa Fe, Argentina



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas  
Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química  
Centro de Investigación de Métodos Computacionales  
Instituto de Investigaciones en Señales, Sistemas e Inteligencia Computacional

## **APLICACIÓN DE UNA TECNOLOGÍA SUSTENTABLE PARA LA BIOPURIFICACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE NUTRIENTES DE EFLUENTES DE ALTO IMPACTO AMBIENTAL**

**Mariana Guadalupe Abrile**

**Lugar de Trabajo:**

INTEC

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria  
Química

Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas

Universidad Nacional del Litoral

**Directora:**

Dra. María Eugenia Lovato INTEC (CONICET-UNL)

**Co-directora:**

Dra. Maria Laura Fiasconaro INTEC (CONICET-UNL)

**Jurado Evaluador:**

Dr. Leonardo Pérez UPC-BarcelonaTech; FQIR-UCA; FCBF-UNR

Dra. María de las Mercedes Mufarrege IQAL (UNL-CONICET)

Dr. Gustavo Ribero FCA-UNL

**2023**



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL  
Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas

Santa Fe, 8 de agosto de 2023.

Como miembros del Jurado Evaluador de la Tesis de Doctorado en Ingeniería titulada **“Aplicación de una tecnología sustentable para la biopurificación y aprovechamiento de nutrientes de efluentes de alto impacto ambiental”**, desarrollada por la Ing. Mariana Guadalupe ABRILE, en el marco de la Mención “Ambiental”, certificamos que hemos evaluado la Tesis y recomendamos que sea aceptada como parte de los requisitos para la obtención del título de Doctor en Ingeniería.

La aprobación final de esta disertación estará condicionada a la presentación de dos copias encuadradas de la versión final de la Tesis ante el Comité Académico del Doctorado en Ingeniería.

-----  
Dr. Leonardo Pérez

-----  
Dra. Ma. De las Mercedes  
Mufarrege

-----  
Dr. Gustavo Ribero

Santa Fe, 8 de agosto de 2023.

Certifico haber leído la Tesis, preparada bajo mi dirección en el marco de la Mención “Ambiental” y recomiendo que sea aceptada como parte de los requisitos para la obtención del título de Doctor en Ingeniería.

-----  
Dra. Ma. Laura Fiasconaro  
Co-directora de Tesis

-----  
Dra. María Eugenia Lovato  
Directora de Tesis



Dr. JOSÉ LUIS MACOR  
SECRETARIO DE POSGRADO  
Facultad de Ingeniería y Cs. Hídricas

Universidad Nacional del Litoral  
Facultad de Ingeniería y  
Ciencias Hídricas

Secretaría de Posgrado

Ciudad Universitaria  
C.C. 217

Ruta Nacional N° 168 - Km. 472,4  
(3000) Santa Fe

Tel: (54) (0342) 4575 229

Fax: (54) (0342) 4575 224

E-mail: posgrado@fich.unl.edu.ar

## **DECLARACION DEL AUTOR**

Esta Tesis ha sido remitida como parte de los requisitos para la obtención del grado académico Doctorado en Ingeniería, Mención Ambiental, ante la Universidad Nacional del Litoral y ha sido depositada en la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas para que esté a disposición de sus lectores bajo las condiciones estipuladas por el reglamento de la mencionada Biblioteca.

Citaciones breves de esta Tesis son permitidas sin la necesidad de un permiso especial, en la suposición de que la fuente sea correctamente citada. Solicitudes de permiso para la citación extendida o para la reproducción parcial o total de ese manuscrito serán concebidos por el portador legal del derecho de propiedad intelectual de la obra.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, deseo expresar mi profundo agradecimiento al Estado Argentino, por la Educación Pública y el apoyo al Desarrollo de Ciencia y Tecnología en los diferentes ámbitos, sin los cuales este proyecto de investigación y de vida, no hubieran existido. En especial al CONICET por la beca otorgada en estos años de estudio e investigación.

A la Facultad de Ingeniería y Ciencias Hídricas, en la que sigo caminando desde mis primeros pasos como estudiante de Ingeniería Ambiental, y al INTEC por brindarme el espacio para desarrollar mis tareas de investigación.

A Laura y Eugenia, mis directoras que me acompañaron en este camino, orientándome en este proceso y brindándome su apoyo.

A los miembros del Jurado, por su interés y dedicación en la evaluación de esta tesis.

A Daiana, Julia, Belén, Luis, Gustavo y Ricardo que colaboraron de distintas formas en este proyecto.

Finalmente, a quienes me acompañaron en todo momento: Santi, mi familia y mis amigas (y amigos), las de la facultad, las de toda la vida, y las nuevas que llegaron y me acompañaron en este recorrido.

---

**INDICE GENERAL**

<b>RESUMEN .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1. Presentación de la problemática .....	1
1.2. Objetivos.....	4
1.3. Aspectos originales de la propuesta.....	7
<b>Capítulo 2. Estado del arte .....</b>	<b>9</b>
2.1. Caracterización de los efluentes .....	10
2.2. Importancia de la cobertura vegetal en rellenos sanitarios.....	16
2.3. Proceso de fitorremediación .....	17
2.4. Utilización de lodos como enmienda orgánica.....	27
2.5. Modelado de los procesos de fitorremediación .....	33
2.6. El después en la fitorremediación.....	44
2.7. Costos asociados a la fitorremediación .....	45
2.8. Descripción del área de estudio .....	47
<b>Capítulo 3. Materiales y métodos.....</b>	<b>51</b>
3.1. Configuración experimental .....	51
3.2. Determinaciones analíticas .....	55
3.3. Preparación del lodo .....	73
3.4. Contaminación artificial del sustrato .....	74
3.5. Cosecha y preparación de muestras.....	75
<b>Capítulo 4. Evaluación de la utilización del lodo como enmienda orgánica para el crecimiento de <i>Nicotiana glauca</i> L.....</b>	<b>77</b>
4.1. Introducción.....	77
4.2. Objetivos.....	78
4.3. Metodología experimental.....	78
4.4. Resultados y discusión .....	80
4.5. Conclusiones.....	96
<b>Capítulo 5. Experimento de fitorremediación de lodos bajo distintas cargas contaminantes de metales pesados .....</b>	<b>98</b>
5.1. Introducción.....	98
5.2. Objetivos.....	100
5.3. Metodología experimental.....	100
5.4. Resultados y discusión .....	107
5.5. Conclusiones.....	160
<b>Capítulo 6. Análisis del proceso de fitoextracción de Pb, Cr y Ni de <i>Nicotiana glauca</i> L. en suelos enmendados .....</b>	<b>162</b>

---

6.1. Introducción.....	162
6.2. Objetivos.....	164
6.3. Metodología experimental.....	165
6.4. Resultados y discusión .....	170
6.5. Estimación de la extracción de MP bajo un escenario de Co-plantación con <i>Lolium perenne</i> L. ....	192
6.6. Conclusiones.....	197
<b>Capítulo 7. Conclusiones y/o recomendaciones .....</b>	<b>199</b>
<b>Anexo I. Datos complementarios.....</b>	<b>204</b>
<b>Anexo II. Publicaciones en revistas científicas.....</b>	<b>206</b>
<b>Anexo III. Participación en congresos y eventos científicos-tecnológicos .....</b>	<b>207</b>
Trabajos publicados en libros de resúmenes .....	207
Trabajo en congresos y eventos científicos-tecnológicos.....	208
<b>Anexo IV. Informes Técnicos .....</b>	<b>211</b>
<b>GLOSARIO Y LISTADO DE SÍMBOLOS.....</b>	<b>212</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>214</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Mecanismos de fitorremediación .....	18
Figura 2.2. Imágenes del Relleno Sanitario de la ciudad de Santa Fe.....	48
Figura 2.3. Geotubo de deshidratación de lodos (a) en escala piloto (b) en funcionamiento a escala real.....	49
Figura 3.1. <i>Nicotiana alata</i> L. post trasplante al medio de crecimiento.....	51
Figura 3.2. Sedimentador y sistemas de geotubos de deshidratación de lodo.....	73
Figura 3.3. (a) Lodo deshidratado por geotubos (b) mezclado de suelo y lodo deshidratado y secado al aire .....	74
Figura 3.4. Imágenes del momento de la cosecha final.....	76
Figura 4.1. Pigmentos fotosintéticos en hojas de <i>Nicotiana alata</i> L. bajo distintos niveles de enmienda con LR.....	85
Figura 4.2. Contenido de AST y PST en hojas bajo distintos niveles de enmienda con LR. ....	88
Figura 4.3. Gráficas de distribución normal de los residuos de las variables: a) MS planta, b) CH planta, c) CH suelo, d) Altura de tallo, e) AF Total, f) Clorofilas totales, g) PST y h) AST. ....	94
Figura 4.4. Modelos ajustados y puntos experimentales de las variables: a) MS Planta, b) CH Planta c) CH Suelo d) Altura de tallo e) AF Total f) Clorofilas Totales, g) PST y h) AST. ....	95
Figura 5.1. Diseño experimental Box-Behnken .....	101
Figura 5.2. Imágenes de diferentes instancias en el crecimiento de las plantas de <i>N. alata</i> .....	108
Figura 5.3. Imágenes de plantas de <i>N. alata</i> previo a la cosecha .....	109
Figura 5.4. Peso fresco de tejidos de la parte aérea de <i>Nicotiana alata</i> L. en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni .....	110
Figura 5.5. Índice de tolerancia en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni .....	112
Figura 5.6. Azúcares solubles totales en hojas en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni .....	114
Figura 5.7. Clorofilas totales en hojas en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni .....	115
Figura 5.8. Acumulación de Pb los tejidos aéreos de <i>Nicotiana alata</i> L. en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni .....	121
Figura 5.9. Acumulación de Cr en los tejidos aéreos de <i>Nicotiana alata</i> L. en los	

tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni .....	122
Figura 5.10. Acumulación de Ni en los tejidos aéreos de <i>Nicotiana alata</i> L. en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni .....	122
Figura 5.11. Acumulación de Pb en raíces de <i>Nicotiana alata</i> L. en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni .....	124
Figura 5.12. Acumulación de Cr en raíces de <i>Nicotiana alata</i> L. en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni .....	124
Figura 5.13. Acumulación de Ni en raíces de <i>Nicotiana alata</i> L. en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni .....	125
Figura 5.14. Factores de (a) Translocación y (b) Bioconcentración de Pb en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni .....	130
Figura 5.15. Factores de (a) Translocación y (b) Bioconcentración de Cr en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni .....	131
Figura 5.16. Factores de (a) Translocación y (b) Bioconcentración de Ni en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni .....	132
Figura 5.17. Pb extraído a través de los tejidos aéreos en función de la cantidad de (a) Pb y Cr, y (b) Pb y Ni agregados al medio. ....	137
Figura 5.18. Cr extraído a través de los tejidos aéreos en función de la cantidad de (a) Cr y Pb, y (b) Cr y Ni agregados al medio. ....	138
Figura 5.19. Ni extraído a través de los tejidos aéreos en función de la cantidad de (a) Ni y Cr, y (b) Ni y Pb agregados al medio. ....	140
Figura 5.20. Superficie de respuesta de la biomasa seca aérea de <i>Nicotiana alata</i> L. en función de Pb, Cr y Ni en suelo.....	142
Figura 5.21. Análisis de la separación de grupos en función de la cantidad total de metales agregados: negro 0, azul: 150, rojo: 450, verde 750 mg kg <sup>-1</sup> .....	147
Figura 5.22. Incidencia en las componentes principales de las variables relacionadas a la extracción de metales.....	148
Figura 5.23. Incidencia en las componentes principales de las variables bioquímicas y relacionadas al estrés en la planta.....	148
Figura 5.24. Comparación de variables de crecimiento en sustratos del punto central “A” contra los distintos controles.....	149
Figura 5.25. Comparación de los resultados de área foliar en plantas desarrolladas en sustratos del punto central “A” contra los distintos controles .....	151
Figura 5.26. Comparación de los resultados del contenido de MDA en plantas desarrolladas en sustratos del punto central “A” contra los distintos controles .....	152
Figura 5.27. Comparación de las actividades enzimáticas en plantas desarrolladas en sustratos del punto central “A” contra los distintos controles.....	153

---

Figura 5.28. Comparación del contenido de MP en tejidos aéreos de plantas del tratamiento “A” contra los distintos controles.....	154
Figura 5.29. Comparación del contenido de MP en raíces de plantas del tratamiento “A” contra los distintos controles .....	155
Figura 5.30. Comparación del FBC de plantas del tratamiento “A” contra los distintos controles .....	156
Figura 5.31. Evolución de la biomasa aérea en peso fresco de las plantas en los tratamientos A y P .....	157
Figura 5.32. Evolución de la biomasa total en peso fresco de las plantas en los tratamientos A y P .....	158
Figura 5.33. Evolución de los MP en los tejidos aéreos de las plantas bajo el tratamiento central A (agregado de Pb=150, Cr=150 y Ni=150 mg kg <sup>-1</sup> ).....	159
Figura 5.34. Evolución de los MP en las raíces de las plantas bajo el tratamiento central A (agregado de Pb=150, Cr=150 y Ni=150 mg kg <sup>-1</sup> ).....	159
Figura 6.1. Generación de biomasa aérea de <i>Nicotiana alata</i> L. en tratamiento central A y ajuste modelo sigmoide .....	171
Figura 6.2. Crecimiento de <i>Nicotiana alata</i> L. en tratamiento central A y ajuste modelo sigmoide .....	171
Figura 6.3. Pb en tejidos aéreos en el tiempo y modelos cinéticos de ajuste .....	173
Figura 6.4. Cr en tejidos aéreos en el tiempo y modelos cinéticos de ajuste .....	173
Figura 6.5. Ni en tejidos aéreos en el tiempo y modelos cinéticos de ajuste .....	174
Figura 6.6. Extracción de Pb en los tejidos aéreos en el tiempo .....	176
Figura 6.7. Extracción de Cr en los tejidos aéreos en el tiempo.....	176
Figura 6.8. Extracción de Ni en los tejidos aéreos en el tiempo.....	177
Figura 6.9. Pb en tejidos aéreos en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich.....	178
Figura 6.10. Cr en tejidos aéreos en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich.....	179
Figura 6.11. Ni en tejidos aéreos en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich.....	179
Figura 6.12. Pb en raíces en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich.....	180
Figura 6.13. Cr en raíces en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich.....	180
Figura 6.14. Ni en raíces en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich.....	181
Figura 6.15. Pb en planta total en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich.....	181
Figura 6.16. Cr en planta total en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich.....	182

---

Figura 6.17. Ni en planta total en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich.....	182
Figura 6.18. Modelo de extracción de Pb en función del contenido de Pb y Cr en suelo .....	189
Figura 6.19. Modelo de extracción de Pb en función del contenido de Pb y Ni en suelo .....	189
Figura 6.20. Modelo de extracción de Cr en función del contenido de Pb y Cr en suelo .....	190
Figura 6.21. Modelo de extracción de Cr en función del contenido de Ni y Cr en suelo .....	190
Figura 6.22. Modelo de extracción de Ni en función del contenido de Ni y Pb en suelo .....	191
Figura 6.23. Modelo de extracción de Ni en función del contenido de Ni y Cr en suelo .....	191
Figura 6.24. Imágenes experimentales de los sistemas en monocultivo y de co-plantación .....	195
Figura 6.25. Extracción de Pb, Cr y Ni por hectárea estimadas para las diferentes configuraciones de cultivo.....	196
Figura A.I.1. Imágenes de plantas iniciales de los tratamientos J (150, 300 y 0 mg kg <sup>-1</sup> de agregado Pb, Cr y Ni) y K (150, 300 y 300 mg kg <sup>-1</sup> de agregado Pb, Cr y Ni).....	205
Figura A.I.2. Imágenes de ejemplares de plantas finales de los tratamientos J (150, 300 y 0 mg kg <sup>-1</sup> de agregado Pb, Cr y Ni) y K (150, 300 y 300 mg kg <sup>-1</sup> de agregado Pb, Cr y Ni).....	205
Figura A.I.3. Imágenes de ejemplares de plantas finales de los tratamientos P (%LR=0) y A (%LR=20%) ambos con MP (150, 150 y 150 mg kg <sup>-1</sup> de agregado Pb, Cr y Ni, sin y con LR) y N (%LR=0) y O (%LR=20%), ambos sin agregado de MP.....	205

---

**INDICE DE TABLAS**

Tabla 2.1. Concentración de contaminantes en lodos de distintos orígenes.....	13
Tabla 2.2. Efectos toxicológicos de los metales pesados y metaloides.....	15
Tabla 2.3. Características del lixiviado del Relleno Sanitario de Santa Fe (Argentina)	50
Tabla 4.1. Caracterización del lodo .....	82
Tabla 4.2. Parámetros de crecimiento de <i>Nicotiana alata</i> L. cultivadas en los diferentes tratamientos con lodo .....	83
Tabla 4.3. Respuestas de <i>N. alata</i> al tratamiento T-SN.....	89
Tabla 4.4. Contenido de P y N en los tejidos vegetales y suelo .....	92
Tabla 4.5. Modelos estadísticos ajustados para las variables seleccionadas .....	93
Tabla 4.6. Resultados del análisis de optimización para la aplicación de lodo.....	96
Tabla 5.1. Descripción de los diferentes tratamientos.....	102
Tabla 5.2. Variables de crecimiento frente a los distintos tratamientos .....	118
Tabla 5.3. Efectos de los distintos tratamientos sobre las respuestas bioquímicas de <i>Nicotiana alata</i> L.....	119
Tabla 5.4. Coeficientes estimados y resultados de ANOVA para el ajuste de cada respuesta (extracción de MP en tejidos aéreos).....	134
Tabla 5.5. Coeficientes estimados y resultados de ANOVA para el ajuste de cada respuesta .....	143
Tabla 5.6. Matriz de correlaciones entre diferentes variables de la planta.....	145
Tabla 6.1. Parámetros de modelo sigmoide de crecimiento para <i>Nicotiana alata</i> L....	172
Tabla 6.2. Parámetros de los modelos cinéticos ajustados a los MP en tejidos aéreos	174
Tabla 6.3. Parámetros del modelo tipo Freundlich linealizado ajustados al contenido de MP en cada uno de los tratamientos .....	183
Tabla 6.4. Parámetros ajustados al contenido de MP en planta de tratamientos con y sin lodo .....	184
Tabla 6.5. Parámetros de los modelos de extracción de MP ajustados .....	188
Tabla A.I.1. Concentración inicial en los sustratos de los tratamientos contaminados	204
Tabla A.I.2. Caracterización promedio del suelo utilizado .....	204

## RESUMEN

El tratamiento y disposición de los residuos sólidos urbanos en rellenos sanitarios (RS) genera efluentes tales como lixiviados y lodos que pueden convertirse en fuentes de contaminación ambiental. Los lodos, productos del tratamiento de lixiviado, concentran gran parte de los compuestos presentes en el líquido, como materia orgánica (MO), macro y micronutrientes y otros contaminantes, como los metales pesados. Una de las prácticas más habituales en los RS es la recirculación de estos lodos en el propio relleno, generando diferentes efectos negativos sobre la operación de estos complejos.

A su vez, uno de los potenciales destinos de los lodos es su utilización como mejorador de suelos, debido a su aporte de materia orgánica, macro y micronutrientes, aumentando así su fertilidad y el rendimiento de cultivos. Sin embargo, los lodos pueden contener un alto contenido de contaminantes, como metales pesados, promoviéndose a través de esta práctica, su acumulación en los suelos en donde son aplicados. La implementación conjunta del agregado de enmiendas de lodo a suelos infértiles y bajos en MO, con técnicas de fitorremediación que promuevan su saneamiento, puede ser adecuada para la restauración integral de sitios altamente intervenidos y alterados como los RS, promoviendo la revegetación para su reutilización con los diferentes fines que sean propuestos.

La idoneidad de las especies vegetales para ser utilizadas en los procesos de fitorremediación se centra en su capacidad de tolerar, acumular, estabilizar y degradar los contaminantes de interés. *Nicotiana glauca* L. es una especie de tabaco utilizada con fines ornamentales, que en los últimos años ha sido estudiada por su potencial en la descontaminación de suelos y efluentes.

El objetivo general de esta tesis es evaluar la reutilización de lodos derivados del tratamiento de lixiviados (LR) obtenidos en un relleno sanitario de la región analizando, simultáneamente, su capacidad como enmienda orgánica para una posible restauración del complejo ambiental mediante la revegetación, y la descontaminación de este mediante los procesos de fitorremediación por *N. alata*.

A fin de estudiar la posibilidad de utilizar el lodo como enmienda, se aplicó un diseño experimental de un factor, que correspondía a la concentración de lodo. De esta forma se buscó evaluar los efectos de su agregado en los sustratos sobre la supervivencia y condiciones de crecimiento de las plantas.

El segundo bloque de esta investigación consistió en evaluar la descontaminación del complejo suelo-lodo por parte de *Nicotiana alata* L. bajo diferentes concentraciones de contaminación por metales pesados (MP). Para ello se consideró un suelo enmendado con una concentración constante de lodo, y se aplicó un diseño experimental tipo Box–Behnken, para evaluar los efectos sobre la especie seleccionada y la extracción de MP bajo distintas concentraciones de Pb, Cr y Ni. A la vez, se estudió la evolución temporal del proceso, mediante cosechas de *N. alata* a diferentes tiempos, en un mismo nivel de contaminación.

Con el objetivo de inferir sobre posibles aplicaciones, se estudió la coevolución del proceso de *N. alata* en co-plantación con *Lolium perenne* L., una gramínea frecuentemente encontrada como cobertura vegetal en suelos de RS.

El proceso de descontaminación y de crecimiento vegetal se estudió a través de diferentes herramientas y modelos, estadísticos, cinéticos y físicos, a fin de expresar matemáticamente la evolución del tratamiento de fitorremediación en el tiempo y bajo diferentes niveles de contaminación por metales pesados.

La aplicación del lodo como enmienda orgánica mejoró significativamente los parámetros de crecimiento evaluados como la masa seca total, el área foliar de la planta, y respuestas biológicas como el contenido de proteínas y de pigmentos fotosintéticos.

De las respuestas evaluadas en los experimentos bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni, se pudo observar que las variables relacionadas a la extracción de metales estuvieron íntimamente relacionadas a la concentración de metal en el suelo. Efectos de interacción se observaron entre estos distintos contaminantes, resaltando la importancia de su evaluación en conjunto y no mediante análisis unidimensionales, muy presentes en la gran mayoría de los trabajos de la bibliografía relevada. Por otra parte, también se puede resaltar la influencia de los distintos niveles de contaminación en el desarrollo vegetal, afectando principalmente a la biomasa generada, que influye en la eficiencia final de fitoextracción.

Además, los resultados expuestos respecto a la acumulación diferencial entre los suelos enmendados y los sin enmendar, junto con los mayores rendimientos en biomasa observados en los tratamientos con enmienda, muestran que el agregado de LR como enmienda permitiría una mayor extracción de los MP estudiados, no sólo por una concentración mejorada en sus tejidos (especialmente para el caso de Pb y Ni) sino también, por la promoción de un mayor crecimiento.

De los diferentes análisis llevados a cabo se podría indicar que, en general, *Nicotiana glauca* L. tuvo mayor afinidad para extraer y translocar Ni en sus tejidos, seguido por el Pb y por último Cr. Estas diferencias podrían estar relacionadas con determinadas funciones biológicas que efectivamente cumple el Ni en las plantas haciendo que exista cierta preferencia por su absorción. Esto podría estar también influenciado por la movilidad de cada uno de los metales en los suelos, reportándose en diferentes

publicaciones que dicho movimiento en sustratos generalmente es Ni>Pb>Cr. Además, se puede inferir sobre un importante efecto del agregado de materia orgánica, aportada a través del lodo, en la movilidad del Cr generando una disminución en su acumulación respecto al suelo sin lodo.

Un modelo integrado por expresiones de tipo sigmoide para el crecimiento vegetal, junto con expresiones físicas y cinéticas de extracción de MP, se pudo utilizar para representar la evolución de la biomasa y extracción de metales en el tiempo por parte de *Nicotiana alata* L. Los ajustes de modelos en el equilibrio, que consideraron los efectos individuales de cada metal en su extracción, se vieron limitados por la no incorporación de los efectos conjuntos del resto de los metales presentes. El desarrollo de las expresiones que incorporaron los efectos conjuntos fue un avance en este sentido, pudiendo formular matemáticamente la influencia del contenido de todos los metales estudiados en la expresión final de extracción de cada metal, tanto por su aporte a la variación de la biomasa generada, como por la influencia en la acumulación de cada uno de ellos.

Finalmente, la utilización de los modelos obtenidos junto con información relevada de la bibliografía permitió inferir sobre posibles escenarios de remediación en sistemas de co-plantación con *L. perenne*. En contraposición con lo sucedido en el monocultivo de *N. alata*, la práctica de cultivos mixtos ampliaría el espectro de MP que se extraen, a la vez que podría mejorar la extracción neta de Pb, Cr y Ni.

Los lodos estudiados resultan de interés por su importante contenido en nutrientes que, en presencia de metales pesados, podrían favorecer y mejorar su fitoextracción, considerando su aplicación dentro del RS como material de cobertura y en actividades de revegetación.

## Capítulo 1. Introducción

### 1.1. Presentación de la problemática

La gestión de los residuos sólidos urbanos (RSU) es una de las problemáticas ambientales que mayores desafíos impone a nivel mundial (Arunbabu et al., 2017). Globalmente se generan aproximadamente 2000 millones de toneladas de RSU (al 2016), y se estima que en el curso de 30 años podrían ascender a 3400 millones, dado el crecimiento poblacional y urbanístico (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible Argentina, 2019). Los volúmenes de desechos generalmente están correlacionados con los niveles de ingreso y las tasas de urbanización, siendo que a medida que los países evolucionan de ingresos bajos a medios y altos, las cantidades de desechos también aumentan, y con ello la necesidad de sistemas más complejos y costosos para mantener la salud del medio ambiente y la población. La gestión de residuos puede representar el gasto más elevado para muchas administraciones gubernamentales locales, llegando en algunos casos a significar aproximadamente el 20% de su presupuesto (Regaldo et al., 2020).

Los rellenos sanitarios (RS) han sido la forma más común y aceptada para tratar la basura en el mundo, y casi el 40% de los residuos se tratan en RS (Arunbabu et al., 2017; Elias et al., 2019; Regaldo et al., 2020; Wang et al., 2018). En Argentina, la Ley de Presupuestos Mínimos de Protección Ambiental para la Gestión Integral de los Residuos Domiciliarios (Ley 25916/04) propone el sistema de relleno sanitario como método principal para la disposición final de los residuos sólidos urbanos. El establecimiento a cargo de la Coordinación Ecológica Área Metropolitana Sociedad del Estado (CEAMSE), procesó en el año 2018 aproximadamente 7 millones de toneladas de RSU, cuando recibe

cerca del 40 % de los residuos a nivel nacional (Informe del estado del ambiente, 2019). En el año 2018, en la ciudad de Santa Fe, se generaron más de 190000 toneladas de residuos sólidos (Santa Fe y Bolsa de Comercio, 2019). En la planta del RS de la ciudad de Santa Fe, se tratan alrededor de 500 toneladas diarias de RSU (Banco Mundial, 2015).

El tratamiento de los residuos sólidos urbanos en rellenos sanitarios genera efluentes tales como lixiviados y lodos que pueden convertirse en fuentes de contaminación ambiental. El lixiviado producido es una mezcla compleja de varios contaminantes, como sales inorgánicas, compuestos orgánicos (en el que las sustancias húmicas constituyen un grupo importante), nutrientes y metales pesados (Arunbabu et al., 2017; Costa et al., 2019; Wang et al., 2018).

En el proceso de tratamiento de los efluentes se suelen generar otros subproductos, como los lodos de aguas residuales, cuya producción ha aumentado drásticamente en los últimos años y es un gran motivo de preocupación en muchos países (Eid et al., 2019; He et al., 2021). En el lixiviado, una parte importante de sus compuestos como los metales pesados, pueden estar presentes en el material coloidal (Jones et al., 2006), siendo luego acumulados en los lodos derivados de su tratamiento. Una de las prácticas más habituales en los rellenos sanitarios es la recirculación de estos lodos en el propio relleno, derivando en distintas problemáticas.

Algunos autores informan la utilización de lodos para material de cobertura temporal, como uno de los métodos más efectivos para su disposición (Fan et al., 2019; He et al., 2021). Sin embargo, de esta forma y mediante la recirculación de los lodos dentro del RS, la materia orgánica, nutrientes y posibles elementos valiosos presentes en el lodo quedan confinados en el relleno, imposibilitando que estos elementos puedan ser reconvertidos en materiales útiles para las actividades humanas.

A su vez, uno de los posibles destinos para los lodos de aguas residuales es su utilización como mejorador de suelos, debido a su aporte de materia orgánica, macro y micronutrientes (Eid et al., 2019), mejorando la fertilidad de los mismos y el rendimiento de cultivos. De hecho, la aplicación de lodos a la tierra se considera una de las formas más económicas y efectivas para su eliminación, a la vez que se suministran nutrientes para el desarrollo vegetal, razón por la cual su utilización en agricultura es una práctica que ha ido creciendo en el mundo (Duan y Feng, 2022; Ren et al., 2015). Sin embargo, como se vio anteriormente, los lodos pueden contener un alto contenido de contaminantes, como metales traza, promoviéndose a través de esta práctica, su acumulación en los suelos en donde son aplicados. La fitorremediación se plantea como una opción para el saneamiento de suelos contaminados y lodos generados en el tratamiento de aguas residuales, tales como los lixiviados (Almasi et al., 2019; Chávez Porras et al., 2017). La implementación conjunta del agregado de enmiendas de lodo, con técnicas de fitorremediación, puede ser adecuada para la restauración integral de sitios altamente intervenidos y alterados como los rellenos sanitarios.

Un programa de cierre de relleno sanitario incluye entre otras cuestiones, la recuperación del sitio, por un lado para proteger la cobertura final del RS y por otro, para mejorar el entorno posibilitando su utilización como área recreativa, espacio verde o el uso que se plantee como objetivo (Brutti et al., 2018). En ambos casos la revegetación del sitio resulta esencial. Sin embargo, la baja calidad y la falta de nutrientes de los suelos empleados como cobertura suelen ser una limitante en la instalación de la vegetación (Tchobanoglous et al., 1994), lo que conlleva a la demanda de fertilizantes químicos. Sin embargo, el crecimiento de la población junto con la demanda creciente de alimentos, el cambio climático, la escasez de recursos y la degradación de los ecosistemas, genera como un nuevo conflicto emergente la escasez de fertilizantes para la producción agrícola

(Kurniawan et al., 2023). Bajo este panorama, la necesidad de recuperar y reutilizar recursos como los nutrientes presentes en las corrientes residuales, es una parte importante de los modelos de producción sostenible y bajo el paradigma de economía circular que se irán imponiendo (Kurniawan et al., 2023). Los rellenos sanitarios comprenden áreas muy grandes, por lo que la aplicación de lodos al suelo de cobertura podría ser una opción efectiva y económica como fuente alternativa de materia orgánica (MO) y nutrientes, al tiempo que mejora sus propiedades físicas y disminuye la presión sobre recursos necesarios para la producción alimenticia (Kim y Owens, 2010; Kurniawan et al., 2023; Song y Lee, 2010).

## **1.2. Objetivos**

Como se describió anteriormente, la problemática planteada en el RS presenta diferentes aristas. Por un lado, se encuentra la necesidad de una estrategia para la recuperación de los sitios de recuperación final con un plan de revegetación, que permita mantener y mejorar propiedades físicas y químicas de la cobertura del relleno, paisajísticas y salud ambiental en general. Estas acciones requieren del suministro de las condiciones adecuadas para la revegetación, como ser el aporte de materia orgánica y de nutrientes a suelos frecuentemente infértiles, y con posible presencia de contaminantes como metales pesados. Por otro lado, la necesidad de gestión de un efluente semisólido, cuya recirculación trae diferentes problemas técnicos y económicos para la administración del complejo, mientras que podría representar una fuente alternativa de recursos como nutrientes y materia orgánica en los suelos de cobertura. Bajo este contexto macro, y teniendo en cuenta la posibilidad de aplicación de lodos como enmienda

orgánica para estos suelos de cobertura, es que se propuso llevar a cabo las distintas investigaciones que se describen en esta tesis.

Cabe destacar que la información sobre lodos derivados de estos efluentes fue escasa o no estuvo disponible, con lo cual el estado de arte (**Capítulo 2**), se centra en la revisión de la técnica de fitorremediación, modelado, etc., de suelos y lodos en un sentido amplio, siendo los mayormente estudiados, aquellos derivados del tratamiento de aguas residuales (cloacales-municipales). Por otro lado, se intenta describir en la medida de lo posible, el estado de arte del estudio de los lixiviados, efluente que da origen a estos lodos, y que presenta estrecha relación con sus características fisicoquímicas.

En el **Capítulo 3** se describen las técnicas utilizadas para la caracterización de los sustratos y del proceso a lo largo de todo el desarrollo experimental.

La investigación experimental puede subdividirse en dos grandes secciones. Por un lado, el estudio del uso de estos lodos como enmienda de suelos y su interacción con la planta seleccionada (**Capítulo 4**), y por otro, el de la descontaminación e interacción de la planta con los contaminantes principales en el sustrato (metales pesados) (**Capítulo 5**). En el **Capítulo 6** se analizan diferentes posibilidades para la expresión matemática del proceso de fitoextracción, tanto en el estado estacionario como para su evaluación en el tiempo. Se estudia, además, el desarrollo del cultivo de *N. alata* junto con *Lolium perenne* L. en un sistema de co-plantación. En el **Capítulo 7** se resumen e integran las conclusiones derivadas de los resultados obtenidos en las distintas experiencias.

A continuación, se describen los objetivos planteados al momento de dar inicio al desarrollo de esta tesis.

### **1.2.1. Objetivo general**

El objetivo general de esta tesis fue evaluar la reutilización de lodos derivados del tratamiento de lixiviados en un relleno sanitario de la región evaluando, simultáneamente, su capacidad como enmienda orgánica para la mejora del suelo del mismo complejo ambiental y su descontaminación mediante los procesos de fitorremediación.

### **1.2.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar los lodos en función de las variables de interés.
- Evaluar posibles especies vegetales para la reutilización de las corrientes residuales, y su fitorremediación.
- Evaluar la tolerancia del cultivo seleccionado y el aprovechamiento nutricional de los lodos a fin de utilizarse como enmienda orgánica, determinando las condiciones más convenientes para su aplicación y estudiando su influencia en las distintas variables de crecimiento y desarrollo vegetal.
- Estudiar la remoción de contaminantes como metales pesados del sustrato base utilizado para el crecimiento vegetal. Aplicación de balances de materia en el sistema.
- Evaluar las respuestas de remoción mediante modelos estadísticos de superficie de respuesta y determinar los parámetros cinéticos de remoción de metales pesados para la planta y sustrato estudiado.

### 1.3. Aspectos originales de la propuesta

Si bien los estudios particulares experimentales aquí desarrollados se enfocan en ensayos de laboratorio y de invernadero, en condiciones “semi reales”, dirigiendo las observaciones a análisis particulares de aprovechamiento de nutrientes, estados fisiológicos y eficiencias de remediación, y utilizando una especie vegetal particular, este trabajo de tesis se enmarca dentro de la búsqueda de una solución integral a un problema real. El objetivo macro es la restauración de un sitio altamente impactado, como un relleno sanitario, implementando soluciones que promuevan la reutilización de corrientes generadas en las propias instalaciones, en el marco de respuesta dentro de lo que se propende como economía circular.

Este contexto define los objetivos a corto y sobre todo a largo plazo de los planes de investigación propuestos, delimita las condiciones experimentales y los análisis sobre la aplicabilidad del proceso, entre otras cuestiones.

En cuanto a los avances particulares se realizó una investigación evaluando el uso de un sustrato “residuo” como enmienda para suelos infértiles, a la vez que se estudió cómo se llevaría a cabo el proceso de fitorremediación del sustrato conformado como resultado del agregado del lodo al suelo, por parte de una especie vegetal particular (*Nicotiana glauca* L.).

Finalmente, dado que uno de los mayores retos de la utilización de lodos como mejoradores de suelos es enfrentar la carga contaminante que traen consigo, así como la ya presente en los suelos degradados, se evaluó la evolución de estos contaminantes en el sistema vegetal implementado. Cabe aclarar que en gran parte de los trabajos relevados se realizan estudios de remoción de metales de forma individual sin contemplar la

contaminación conjunta de varios MP a la vez, sobre todo aquellos estudios donde ejercen un control sobre las concentraciones experimentales (estableciendo niveles de contaminación de manera artificial). Por otro lado, en gran parte de los estudios relevados cuando se evalúan experimentos donde están presente más de un metal, se aplican análisis de forma independiente, sin considerar la influencia de la contaminación o remoción conjunta. En este estudio se buscó evaluar la remoción de los principales contaminantes en forma conjunta, analizando las posibles interacciones mediante la utilización de herramientas estadísticas.

## Capítulo 2. Estado del arte

Gran parte de la variabilidad en las características de los lodos derivados del tratamiento de efluentes tiene relación con las características primarias de estos últimos. Por ello resulta indispensable conocer la naturaleza del efluente que da lugar a la producción de los lodos que fueron aplicados en los diferentes experimentos a lo largo de la presente investigación. Debido a esto, se hará una breve revisión sobre la generación y características de los lixiviados de rellenos sanitarios de los que derivan los lodos investigados en esta tesis.

El enfoque central del trabajo es el de evaluar la posibilidad de utilizar los lodos como enmienda orgánica para el crecimiento de *Nicotiana glauca* L., una especie de tabaco utilizada con fines ornamentales, a la vez que se evalúa el proceso de fitorremediación del suelo enmendado debido a la contaminación propia e inducida por el agregado del lodo, principalmente por metales pesados. La elección de una planta ornamental se debe a la necesidad de que las mismas no presenten atracción por los herbívoros, con el objetivo de evitar su ingreso en la cadena alimentaria. Por esto se dedican secciones a revisar el estado de arte de antecedentes e importancia de la utilización de lodo como enmiendas, la normativa aplicable en la jurisdicción competente, del proceso de fitorremediación, su modelado con el fin de generar herramientas operativas, costos, entre otras cuestiones. Finalmente, se incluye una descripción del sitio donde se trabaja con el fin de conocer las características propias de la situación problemática puntual.

## **2.1. Caracterización de los efluentes**

### **2.1.1. Lixiviados de Rellenos Sanitarios**

En los rellenos sanitarios (RS) los lixiviados se generan a partir del agua contenida en los residuos depositados, de la percolación del agua de lluvia a través del relleno y por los procesos bioquímicos que se dan en su interior, producto de la degradación de los residuos (Costa et al., 2019; Droppelmann y Oettinger, 2009; Salehi et al., 2020; Salem et al., 2008). El lixiviado producido es una mezcla compleja de varios contaminantes, como sales inorgánicas, compuestos orgánicos (en el que los compuestos húmicos constituyen un grupo importante), nutrientes y metales pesados (Arunbabu et al., 2017; Costa et al., 2019; Wang et al., 2018). Los residuos depositados están constituidos por una amplia gama de compuestos inorgánicos, naturales y xenobióticos cuya mezcla, a su vez, afecta la composición y el potencial contaminante del lixiviado (Jones et al., 2006). Pero la calidad del lixiviado no solo depende de factores como la composición de los desechos, sino también de los procesos biológicos y químicos que se producen durante su degradación, su contenido de humedad, las precipitaciones, el clima local, etc. (Arunbabu et al., 2017). Por lo tanto, la calidad del lixiviado es específica del sitio e incluso dentro de un mismo relleno sanitario la variabilidad es frecuentemente evidente (Arunbabu et al., 2017; Jones et al., 2006).

### **2.1.2. Generación de lodos**

Como se introdujo, durante el proceso de tratamiento de efluentes se suelen generar otros subproductos como los lodos de aguas residuales. El incremento de su generación es un gran motivo de preocupación en muchos países (Eid et al., 2019; He et al., 2021). Los lodos son soluciones acuosas, con un alto contenido de sólidos orgánicos e

inorgánicos, y en donde se pueden concentrar gran parte de los elementos presentes en el efluente. A escala global, se estima que diariamente se producen entre 35 a 85 g de lodo seco per cápita (Werle y Sobek, 2019). Considerando esta información y la población de la República Argentina según el último censo (INDEC, 2022), el país podría estar generando entre 1600 a 3900 t lodo seco d<sup>-1</sup>, aproximadamente.

En el lixiviado, una parte importante de sus compuestos como los metales pesados pueden estar presentes en el material coloidal (Jones et al., 2006), siendo luego acumulados en los lodos derivados de su tratamiento. Una de las prácticas más habituales en los rellenos sanitarios es la recirculación de estos lodos en el propio relleno, siendo enviados a disposición final junto con los RSU. Si bien se informa que esta práctica trae algunas ventajas como la distribución de nutrientes y enzimas (Elias et al., 2019), también se sabe que la recirculación de estas soluciones concentradas presenta algunos efectos negativos sobre la operación de estos complejos. Una posible consecuencia es la inhibición de la fase de degradación metanogénica debido a la alta concentración de ácidos orgánicos que son tóxicos para estos microorganismos y la alteración de la calidad del lixiviado generado, aumentando la concentración de compuestos inorgánicos y orgánicos, con consecuencias en los procesos de tratamiento posteriormente aplicados (Elias et al., 2019; Talalaj y Biedka, 2015).

En general, los métodos de tratamiento de lodos se dividen en tres grandes grupos: procesos físicos, químicos y biológicos (Almasi et al., 2019; Mousavi et al., 2015). En los últimos años, el uso de plantas para descontaminación, y en particular para el tratamiento de lodos, es de gran importancia debido a su bajo costo, simplicidad, uso de energía solar, aceptación universal, mantenimiento de propiedades físicas, químicas y biológicas del medio, y la prevención de la erosión del suelo y el control de fugas de contaminantes hacia zonas circundantes, como las aguas subterráneas (Naghipour et al.,

2017). La fitorremediación es efectiva al eliminar materiales orgánicos e inorgánicos, presentándose como una posible alternativa para la descontaminación de los lodos generados en el tratamiento de aguas residuales como la de los lixiviados (Almasi et al., 2019; Chávez Porras et al., 2017).

Respecto a los lodos derivados del tratamiento de lixiviados, no se encontró en la bibliografía relevada investigaciones de importancia que aborden su gestión, como así tampoco información respecto a los parámetros frecuentemente estudiados para este tipo de corriente residual. Sí se ha encontrado en la bibliografía un trabajo que estudió la fitorremediación de los lodos de esta actividad, aunque generado a partir de un tratamiento diferente del lixiviado. Chavez-Porra et al. (2017) estudiaron la fitorremediación de lodos derivados del tratamiento de lixiviados mediante el uso de rábano (*Raphanus sativus* L.), acelga (*Beta vulgaris* L.) y rúcula (*Eruca sativa* Mill.). En este estudio, se reportó la presencia de cadmio ( $\text{Cd } 0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ ), cromo ( $\text{Cr } 210 \text{ mg kg}^{-1}$ ), plomo ( $\text{Pb } 18,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y mercurio ( $\text{Hg } 690 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Las eficiencias de remoción variaron entre el 4 y el 42 % en función de la planta y el metal. No se informaron otras características del lodo analizado en el estudio.

### **2.1.3. Características de lodos derivados del tratamiento de aguas residuales**

En general, la composición de los lodos derivados del tratamiento de aguas residuales presenta características muy variables y dependen fuertemente del tipo de efluente y tratamiento. Particularmente, no se ha encontrado bibliografía suficiente sobre las características de los lodos derivados del tratamiento del lixiviado de RS y, por otro lado, dichas características dependerán de la localidad, tipo de operación del RS, tratamiento de los lixiviados, entre otros factores. Por tal motivo, se ha hecho una revisión

general sobre lodos de tratamiento, con el fin de comprender mejor la problemática de este tipo de residuos.

**Tabla 2.1. Concentración de contaminantes en lodos de distintos orígenes**

Descripción del Lodo estudiado	Contaminante evaluado	Concentración (mg kg <sup>-1</sup> )	Bibliografía
Lodo de aguas residuales proveniente de un digestor de lodos anaeróbico, del tratamiento de 92% de aguas domiciliarias y 8% industriales	Pb	54,7 ± 6,2	(Ren et al., 2015)
	Cr	372,8 ± 23,6	
	Cd	3,30 ± 0,58	
	Cu	1735,4 ± 286,3	
	Zn	2110,3 ± 78,5	
Suelo agrícola que ha sido fertilizado con lodos de aguas residuales durante 13 años.	Cd	0,573	(Luo et al., 2015)
	Zn	605	
Lodo de Relleno Sanitario	Pb	18,1	(Chávez Porras et al., 2017)
	Cr	210,0	
	Cd	0,3	
	Hg	0,7	
Lodo de planta de aguas residuales	Pb	5,49 ± 0,23	(Almasi et al., 2019)
	Cd	2,08 ± 0,01	
	N <sub>total</sub>	2,10 ± 0,12%	
	P <sub>total</sub>	2,86 ± 0,25%	
Lodo de planta de aguas residuales domésticas e industriales, estabilizado aeróbicamente.	C <sub>orgánico</sub>	32,60 ± 0,78%	(Elloumi et al., 2016)
	Pb	23	
	Cr	665	
	Cu	550	
	Zn	1825	
Lodo de planta de aguas residuales	Pb	263,4	(Singh et al., 2020)
	Cr	66,8	
	Ni	44,9	
	Cd	8,1	
Lodos de planta de aguas residuales, previamente estabilizado aeróbicamente.	Pb	301,0 ± 15,1	(Zaier et al., 2010)
	Cd	2,0 ± 0,4	
	Zn	515,0 ± 25,7	
	Cu	155,0 ± 7,8	
	Co	10,0 ± 0,5	
Lodos de una planta de aguas residuales, espesados y deshidratados	Mn	234,0 ± 11,2	(Zhu et al., 2013)
	Pb	133,2	
	Cd	12,8	
	Cu	545,6	
	Zn	1516,7	

En general la mayor preocupación de estos efluentes pasa por el contenido potencial de patógenos y de metales pesados. En la **Tabla 2.1** se muestran los contaminantes

(principalmente metales pesados) encontrados en lodos de diferentes orígenes informados por distintos autores.

#### **2.1.4. Efectos perjudiciales de los metales pesados**

Como se describió en la sección anterior, una de las características más preocupantes en los lodos de tratamiento es la presencia de metales pesados. Estos contaminantes presentan diversos efectos adversos tanto en la salud, como en las especies vegetales que crecen en medios donde se encuentran presentes.

Uno de los indicadores más comunes de toxicidad en plantas, inducida por metales pesados, es la disminución en el crecimiento y un bajo rendimiento de biomasa (Kumar et al., 2022; Rehman et al., 2017). Sin embargo, en ocasiones el rendimiento de biomasa puede verse inducido por el aumento de algunos metales en el medio, lo que puede ser un indicador de la tolerancia a vivir en ambientes contaminados por parte de ciertas especies vegetales (Chandrasekhar y Ray, 2019).

Los MP en muchas ocasiones desplazan a los metales esenciales de sus sitios naturales de unión en las proteínas, alterando así la homeostasis de la célula. Al no ser susceptibles de degradación se acumulan en los tejidos de los organismos (bioacumulación) y entran en la cadena alimentaria, afectando así a otros organismos que no están directamente implicados y conduciendo a una posible biomagnificación del contaminante (Pathak et al., 2020).

Otro de los posibles daños causados por MP son los daños oxidativos de distintos componentes de los tejidos vegetales. Los iones metálicos estimulan la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS) que pueden causar daños en estructuras como el ADN y proteínas, interrumpiendo distintas funciones biológicas.

En la **Tabla 2.2** se resumen los diferentes posibles efectos nocivos por parte de los metales pesados y metaloides en plantas y animales (Pathak et al., 2020).

**Tabla 2.2. Efectos toxicológicos de los metales pesados y metaloides**

<b>Metal</b>	<b>Efecto en plantas</b>	<b>Efecto en animales</b>
Arsénico (As)	Estrés oxidativo, alteraciones fisiológicas	Cáncer de piel, trastornos respiratorios
Cadmio (Cd)	Reducción en la germinación de semillas	Cáncer de próstata, atrofia testicular
Cromo (Cr)	Clorosis, crecimiento reducido	Cáncer de pulmón, enfermedades hepáticas
Cobre (Cu)	Estrés oxidativo	Daños renales, desórdenes metabólicos
Mercurio (Hg)	Efectos genotóxicos	Ataxia, ceguera
Plomo (Pb)	Inhibición de la actividad enzimática	Daño neuronal, nefropatía
Níquel (Ni)	Reducción en la absorción de nutrientes	Cáncer de pulmón y nariz
Selenio (Se)	Alteración de las propiedades de proteínas	Disfunciones del sistema endócrino

Sin embargo, la respuesta puede variar según la especie vegetal, siendo algunas de ellas fácilmente susceptibles a sufrir daños, mientras que otras muestran mayores niveles de tolerancia a concentraciones elevadas de MP. Pueden diferenciarse dos tipos de plantas en función de su capacidad para interactuar con los metales pesados: aquellas que evitan al MP y otras tolerantes a los mismos. La primera categoría restringe la entrada de los metales a la planta mediante la barrera de permeabilidad de la membrana celular de la raíz, mientras que las segundas, dirigen los metales a la vacuola tras su absorción, sin causar ningún daño (Kumar et al., 2022). En este sentido, las células vegetales han desarrollado diferentes mecanismos adaptativos para contrarrestar los efectos nocivos de los MP, utilizando estrategias para evitar su participación en mecanismos de reacción innecesarios que conducen a la toxicidad (Kumar et al., 2022).

## 2.2. Importancia de la cobertura vegetal en rellenos sanitarios

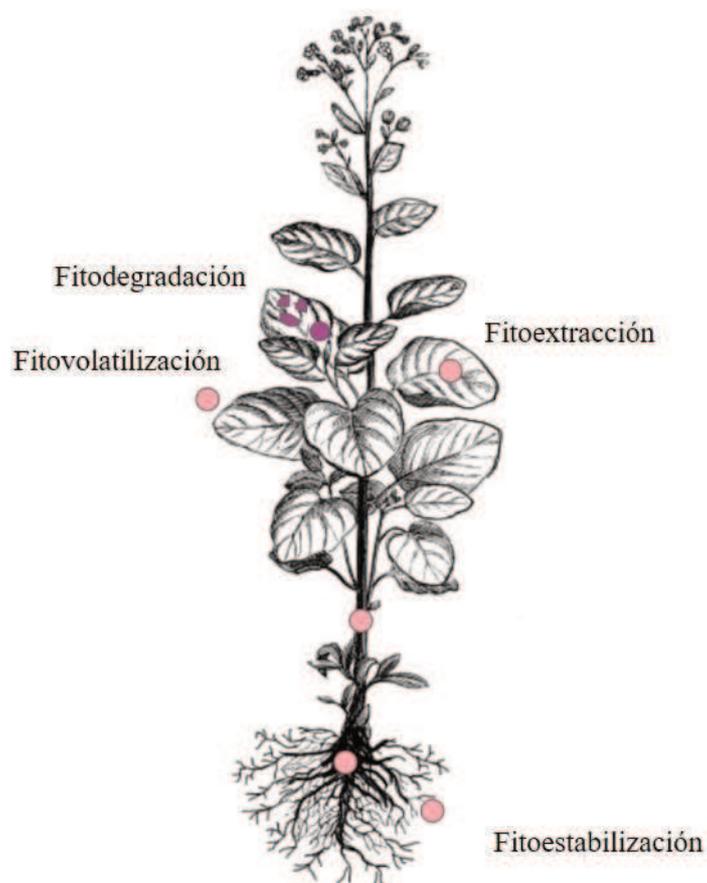
Un programa de cierre de RS incluye, entre otras cuestiones, la recuperación del sitio para proteger la cobertura final del RS y mejorar el entorno que posibilite su utilización como área recreativa o el uso que se plantee como objetivo (Brutti et al., 2018). En ambos casos la revegetación del sitio resulta esencial. La incorporación de una cubierta vegetal, además de aportar un valor estético, es importante para controlar la erosión del suelo y minimizar la infiltración de agua de lluvia (Kostopoulou et al., 2010; Nagendran et al., 2006). Asimismo, esta vegetación juega un papel importante en el control de la generación de lixiviados, ya que limita la infiltración de las lluvias y absorbe la humedad del suelo de la cobertura, devolviéndola a la atmósfera por evapotranspiración (Garg et al., 2019; Ni et al., 2020). Además, se ha demostrado que la incorporación de plantas jóvenes reduce la conductividad hidráulica del suelo, lo que ayuda a retener el agua antes de que se evapore (Ni et al., 2020). Sin embargo, la baja calidad y falta de nutrientes de los suelos empleados como cobertura suelen ser una limitante en el establecimiento de la vegetación (Tchobanoglous et al., 1994). Además de encontrarse un suelo normalmente infértil y compacto, otros de los aspectos que suelen prevalecer es la coexistencia de componentes tóxicos como metales pesados, déficit hídrico, entre otros. Estas características pueden inducir efectos negativos en las plantas dificultando su crecimiento y desarrollo y, en general, provocando una cubierta vegetal deficiente y dañada (Kostopoulou et al., 2010). Durante el cierre de los módulos del relleno sanitario, se utiliza una gran cantidad de suelo con un nivel muy bajo de materia orgánica (MO), y se requiere una gran cantidad de fertilizantes orgánicos para restaurar su fertilidad e inducir la revegetación después del cierre (Song y Lee, 2010). Por esto, la aplicación de lodos al suelo de cobertura podría ser una opción efectiva y económica como fuente alternativa de MO y nutrientes (Kim y Owens, 2010; Song y Lee, 2010).

### 2.3. Proceso de fitorremediación

A lo largo de los años, en la búsqueda de remediar ambientes contaminados como suelos y recursos hídricos, se han empleado diferentes enfoques, tanto biológicos como físicos y químicos. Una de las técnicas de remediación biológica es la fitorremediación, que se basa en la utilización de plantas e involucra procesos de translocación, acumulación, transporte, transformación y volatilización de los contaminantes por parte de la vegetación. Es una tecnología prometedora por su bajo costo, simplicidad, de gran aceptación social por su impacto visual positivo, por el mantenimiento de propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos, etc. (Naghipour et al., 2017; Shen et al., 2022).

La fitorremediación implica diferentes mecanismos o estrategias por parte de la planta en interacción con los contaminantes, que pueden clasificarse como **Fitovolatilización, Fitoestabilización, Fitodegradación y Fitoextracción** (Zhang et al., 2020). Dependiendo de la naturaleza del contaminante y de las capacidades de la planta, serán posibles o predominantes ciertos mecanismos frente a otros.

En la **Figura 2.1** se detallan los distintos mecanismos por los que se da el proceso de descontaminación con plantas, y a continuación se describe cada uno de ellos.



**Figura 2.1. Mecanismos de fitorremediación**

### 2.3.1. Fitovolatilización

La fitovolatilización es la liberación de contaminantes presentes en el medio hacia la atmósfera, principalmente por el proceso de transpiración (Zhang et al., 2020). Este proceso aplica principalmente a contaminantes volátiles o que pueden transformarse durante el proceso a estas formas. En cuanto a los metales pesados, es un mecanismo que puede se ha reportado para elementos como Hg, Se y As.

### 2.3.2. Fitoestabilización

La fitoestabilización, también es un mecanismo útil cuando se evalúan estrategias de remediación de suelos contaminados por MP. Se basa en el mecanismo de convertir a

los contaminantes en sus formas menos biodisponibles, evitando así su migración desde el sitio de contaminación, a través de lixiviación o escorrentías, hacia zonas de mayor riesgo o sensibilidad ambiental (Pathak et al., 2020). Engloba procesos de absorción y acumulación en las raíces o bien, procesos de precipitación en la zona de la rizosfera debido a cambios fisicoquímicos del medio. Suele ser particularmente efectiva en suelos de textura fina con un alto contenido de materia orgánica (Delgadillo-López et al., 2011).

### **2.3.3. Fitodegradación**

La fitodegradación, también denominada fitotransformación, se da a través de modificaciones químicas de los compuestos contaminantes gracias a las actividades enzimáticas en la zona radicular o en la parte aérea de la planta. En la zona radicular, este tipo de proceso, muchas veces es asistido por procesos de degradación por parte de microorganismos, como bacterias y hongos (Pathak et al., 2020).

### **2.3.4. Fitoextracción**

La fitoextracción es el enfoque de fitorremediación más importante cuando se trata la eliminación de metales y metaloides en suelos contaminados, agua, sedimentos y biosólidos, e implica la extracción y acumulación de los contaminantes en los tejidos cosechables/aéreos (Pathak et al., 2020; Sarwar et al., 2017).

El proceso de fitoextracción está mediado por distintos mecanismos biológicos, que determinarán la tasa de acumulación y la distribución de los contaminantes en los diferentes tejidos de la planta. Estos procesos pueden dividirse en los siguientes:

*Movilización.* En esta etapa se incrementa la solubilidad y, por tanto, la biodisponibilidad de los metales en el suelo. Se cree que las plantas poseen la capacidad

de secretar exudados capaces de actuar como agentes quelantes y solubilizar los metales en la región de la rizosfera. Además tienen la capacidad de disminuir el pH en esta zona, lo que aumenta la solubilidad de los metales en la solución del suelo y las reductasas metálicas específicas proporcionan a las plantas la capacidad de reducir los metales no biodisponibles (Mahmood, 2010; Upcraft y Guo, 2020).

*Captación y secuestro.* Los iones se absorben en las raíces y se transportan a lo largo de la vía simplástica o a través de la vía apoplástica, quedando el exceso de metales retenido en las vacuolas. Los metales esenciales como el Cu, Zn, Mn, Ni y el Fe, tienen funciones reguladoras importantes en una serie de procesos biológicos, como parte de las proteínas transportadoras de electrones y como cofactores de numerosas enzimas (Sarwar et al., 2017). La mayoría de los iones metálicos ingresan activamente a las células vegetales a través de la vía simplástica, mediante portadores de iones metálicos. Sin embargo, ocurre una competencia por estos portadores entre metales esenciales y no esenciales, lo que explicaría como éstos últimos son capaces de transportarse contra un gradiente de concentración (Upcraft y Guo, 2020). Una vez dentro de la planta, los iones metálicos se almacenan en las raíces o se transportan hacia el brote y las partes aéreas de la planta.

*Carga en el xilema.* Los iones son transportados al xilema a través de proteínas transportadoras unidas a la membrana. Los iones que inicialmente se transportaban a través de la vía apoplástica son bloqueados por la banda de Caspary y continúan posteriormente a través de la vía simplástica hasta el xilema. El transporte desde las células de la raíz hacia el xilema establece un paso limitante (Mahmood, 2010; Upcraft y Guo, 2020).

*Transporte y descarga del xilema.* Los iones se descargan a lo largo del xilema, y se produce el transporte xilemático hacia el floema, mediado por las células de transferencia. Las paredes celulares del xilema poseen una alta capacidad de intercambio iónico, por lo que el transporte de cationes metálicos puede verse seriamente retrasado, y el transporte se produce con iones metálicos acomplejados con una serie de ligandos de moléculas orgánicas pequeñas, como el citrato (Kutrowska y Szelag, 2014; Upcraft y Guo, 2020).

*Descarga, distribución tisular y secuestro.* Los iones metálicos entran en el simplasto de las hojas y se distribuyen por toda la hoja a través de la vía simplástica y apoplástica. A partir de aquí, los metales esenciales en exceso y los no esenciales son secuestrados en las vacuolas celulares. Una caracterización útil para cuantificar el grado en que se produce esta cadena de transporte es el factor de translocación (FT), que relaciona la concentración de contaminante almacenada en el brote y la raíz.

### **2.3.5. Variables que afectan el proceso de Fitoextracción**

El proceso de fitoextracción estará fuertemente influenciado también por las propiedades del suelo, como el pH, Conductividad Eléctrica (CE), contenido de MO, textura, presencia de iones competitivos, entre otros, ya que influyen en el proceso de movilización y absorción, acumulación y distribución de los contaminantes en los tejidos vegetales (Aihemaiti et al., 2018; Pathak et al., 2020). Además también influyen fuertemente las especies y edades de las plantas presentes, los exudados de las raíces, los microorganismos presente en el suelo, etc. (Sarwar et al., 2017).

En general se reconoce que la disminución del pH del suelo aumenta la solubilidad de los metales. Algunos autores encontraron que la absorción de metales por la planta

umentaba conforme disminuía el pH y aumentaba su solubilidad, aunque existen resultados contradictorios (Maxted et al., 2007). Estas contradicciones en los resultados pueden deberse a que existen diversas formas en las que el pH influye en el proceso de fitorremediación y que agregan incertidumbre a la evaluación de estos procesos. Dentro de ellas, se puede mencionar que afecta la capacidad de intercambio catiónico del suelo, el equilibrio de disolución-precipitación de los iones metálicos en las soluciones del suelo, la supervivencia y desarrollo de distintos microorganismos del suelo que pueden interferir en el proceso, procesos de adsorción y desorción, entre otros (Zhang et al., 2020).

La materia orgánica del suelo también juega un papel importante en la absorción de metales al alterar la capacidad de intercambio catiónico y la capacidad de sorción del suelo. Sin embargo, en muchas ocasiones también existen resultados opuestos respecto a su efecto en la remediación (Aihemaiti et al., 2018). Un mayor contenido de MO puede determinar una mayor cantidad de sitios de sorción y quelantes de metal en la matriz del suelo, reduciendo la proporción de metales extraíbles. Sin embargo, algunos resultados muestran que la adición de diferentes fuentes de materia orgánica influyó positivamente en la extracción de metales en los tejidos vegetales. Aihemaiti et al. (2018) encontraron que el contenido de MO y la absorción de Cr en los brotes de *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. (Almorejo) presentaban una correlación positiva en los sitios relevados, en línea con otros autores que observaron que la adición de materia orgánica al suelo incrementó la biodisponibilidad de los metales pesados (Beesley et al., 2010; Schwab et al., 2007).

El contenido de nutrientes también puede afectar la capacidad de la planta para extraer y traslocar metales del medio. Aihemaiti et al. (2018) encontraron que mayores niveles de potasio (K) se correlacionaron negativamente con el contenido de Vanadio (V), Cr y Cu en raíces de *S. viridis*, y positivamente con la de los brotes, indicando que su

adición podía mejorar la capacidad de traslocación estos metales, desde las raíces a los tejidos aéreos. Además, la adición de nutrientes puede tener efectos positivos sobre la generación de biomasa vegetal incrementando la cantidad de contaminante extraído. Por otro lado, también puede darse una interacción recíproca, ya que la capacidad de las plantas para extraer agua y nutrientes del suelo, en muchos casos puede verse influida por la presencia de compuestos tóxicos como los metales pesados, que generen además una reducción en el rendimiento de la biomasa (Zhang et al., 2020).

Las variables que influyen en los procesos son múltiples, y en la mayoría de los casos se encuentran íntimamente ligadas y comprometidas, por lo que los resultados suelen diferir en las investigaciones, siendo necesario estudiar los mecanismos de influencia de manera integral (Zhang et al., 2020).

### **2.3.6. Criterios para la selección de especies vegetales fitoextractoras**

La selección de especies vegetales para aplicar el proceso de fitorremediación se centra en su capacidad de tolerar, acumular, estabilizar y degradar los contaminantes de interés.

En general, las plantas seleccionadas deben cumplir con las siguientes características (Ali et al., 2013; Sarwar et al., 2017): tasa de crecimiento rápido, gran producción de biomasa, capacidad de hiperacumular MP de interés, amplia distribución geográfica, capacidad de translocar el MP desde la raíz a la parte aérea y tolerar sus efectos tóxicos, ser resistente a los patógenos y plagas, encontrarse bien adaptadas a las condiciones climáticas imperantes, de fácil de cultivo y cosecha, y no presentar atracción por los herbívoros (evitando así, su ingreso en la cadena alimentaria). Esto último, es una

de las razones por las cuales puede ser adecuado la elección de especies de uso ornamental.

En los últimos años se han identificado centenares de especies con características de hiperacumulación de MP (Pathak et al., 2020). Sin embargo, la mayoría de las plantas hiperacumuladoras suelen ser de crecimiento lento y baja generación de biomasa (Liu et al., 2018).

Es por esto que en general, se han utilizado dos enfoques diferentes en la fitoextracción: el uso de especies vegetales hiperacumuladoras, con una gran acumulación de MP por unidad de masa seca, pero con una producción de biomasa relativamente baja (y lenta) que dificulta el éxito de sus aplicaciones; y el uso de especies vegetales con una producción de biomasa aérea mayor, pero con una menor acumulación de metales, a veces favorecida mediante el agregado de agentes quelantes o microorganismos que mejoran la capacidad de acumulación de la planta (Sarwar et al., 2017; Upcraft y Guo, 2020).

Muchos estudios han evaluado el potencial fitorremediador de diferentes plantas para la descontaminación de efluentes y suelos. Khan et al. (2019) estudiaron la descontaminación de efluentes sintéticos que contenían concentraciones significativas de MP utilizando plantas ornamentales, como *Nicotiana glauca* L. y *Petunia hybrida* L. El proceso se vio favorecido por la incorporación de enmiendas orgánicas como compost. Song y Lee (2010) estudiaron el acondicionamiento del suelo de rellenos sanitarios incorporando compost de lodos de depuradora evaluando su influencia en la revegetación del sitio, considerando tres especies arbóreas (*Quercus acutissima* Carruth., *Liriodendron tulipifera* L. y *Betula schmidtii* Regel). Salehi et al. (2020) analizaron la descontaminación de suelos contaminados con pireno utilizando plantas de *Sorghum*

*bicolor* L. (sorgo), evaluando el efecto sobre la eficiencia de fitorremediación provocado por la aplicación de diferentes dosis de lixiviados de RS. Yang et al. (2017) estudiaron la fitoextracción realizada por especies de tabaco (*Nicotiana* sp.) en suelos contaminados con cadmio.

El género *Nicotiana spp.* forma parte de la familia de las solanáceas, una importante familia de plantas con flores (angiospermas) que comprenden más de 100 géneros y más de 3000 especies. Las solanáceas se encuentran en todo el mundo en ecosistemas que van desde los desiertos hasta las selvas tropicales, y abarcan formas de vida desde hierbas anuales hasta árboles de las selvas tropicales. Tienen una importancia económica considerable y se utilizan ampliamente como plantas ornamentales (petunias), fuentes de compuestos medicinales (tabaco, mandrágora, belladona, estramonio) y como alimento (por ejemplo, tomate, berenjena, pimientos). Aunque los miembros de la familia *Solanaceae* se encuentran en todo el mundo, son más abundantes y están más ampliamente distribuidos en las regiones tropicales de América Latina, donde unos 40 géneros son endémicos.

*Nicotiana spp.* es un género de especies vegetales con potencial fitorremediador debido a su rápido crecimiento, enraizamiento profundo, alta producción de biomasa y potencial de acumulación de MP (Daghan, 2019; Liu et al., 2011; Rosén et al., 2012; Yang et al., 2017). Se cultiva en varias regiones del mundo debido a su adaptación a una amplia gama de climas. Se pueden encontrar especies del género *Nicotiana* cultivadas para el consumo de sus hojas, como *N. tabacum*, y especies utilizadas sobre todo con fines ornamentales, como *Nicotiana alata* L.

Diversos autores han demostrado interés en *Nicotiana alata* L. (también conocida como tabaco ornamental o tabaco jazmín), ya que sus flores contienen defensinas (NaD1)

con aptitudes antifúngicas (Dracatos et al., 2014; Lay et al., 2012), y más recientemente, comenzó a ser estudiada en el tratamiento de cáncer (Baxter et al., 2017).

Si bien la especie *N. alata* se reporta como un acumulador de varios MP (Khan et al., 2021), los estudios encontrados son escasos y enfocados principalmente a la descontaminación de efluentes líquidos y sintéticos (Khan et al., 2020b, 2019).

### **2.3.7. Co-plantación**

Si bien la mayoría de los estudios se centra en la evaluación de una única especie, o de varias especies en monocultivo, la presencia de varias especies en conjunto no sólo suele ser lo recurrente en los suelos silvestres, sino que puede resultar en diferentes ventajas para el proceso de fitorremediación. La co-plantación con diferentes especies puede mejorar el espectro de metales efectivamente absorbidos (ya que diferentes plantas pueden acumular de manera preferencial ciertos MP), aumentar la resistencia y tolerancia a los contaminantes presentes en el suelo, aumentar la acumulación de MP en los tejidos vegetales, mejorar el rendimiento de biomasa (y por ende la cantidad de MP extraído), aumentar el área de raíz en el suelo, entre otros (Shen et al., 2022; Wu et al., 2021).

Especies como *Lolium perenne* L. (césped) y *Trifolium repens* L. (trébol) se suelen encontrar en rellenos en proceso de restauración (Brutti, L. N., Beltrán, M. J., & Giardina, 2015; Song, 2018). A la vez, estas especies también han sido estudiadas como especies con capacidad fitorremediadora de metales pesados (Hough et al., 2005; Lin et al., 2021; Padmavathiamma y Li, 2012; Pandey y Bajpai, 2019).

## **2.4. Utilización de lodos como enmienda orgánica**

Como se planteó anteriormente en la sección **2.2**, uno de los problemas para la implantación de la vegetación en los RS, ya sea para fines estéticos, fitorremediación, o ambas, no sólo es la presencia de elementos potencialmente fitotóxicos, sino la baja calidad de los suelos, ausencia de nutrientes, y otros factores que limitan el desarrollo vegetal. La fitorremediación asistida implica la utilización de plantas para la recuperación de sitios contaminados junto con el agregado de enmiendas de distintos orígenes, con el fin de disminuir la fitotoxicidad del suelo mejorando sus características físicas y químicas, la disponibilidad de nutrientes, la capacidad de retención de agua, etc. (Jaskulak et al., 2020).

### **2.4.1. Nutrientes: su importancia en el desarrollo vegetal y como potenciales contaminantes**

El Nitrógeno (N) es un elemento esencial para todos los seres vivos, y es considerado un macronutriente. Además de ser un componente específico de las proteínas, está presente en la mayor parte de las combinaciones orgánicas de los vegetales. Actualmente está demostrado que es el factor limitante más común del crecimiento de las plantas y que un suministro deficiente de este nutriente puede provocar notables descensos en la producción vegetal. En los sistemas agrícolas, la fertilización nitrogenada suele ser una alternativa costosa, pero a menudo necesaria, para solucionar las deficiencias edáficas (Benimeli et al., 2019).

En las plantas, el nitrógeno compone diversos compuestos esenciales, como los aminoácidos, unidades estructurales de proteínas, enzimas, vitaminas, clorofilas, entre otros. Ante la deficiencia de N, la planta suele presentar un escaso desarrollo, con hojas

pequeñas, que se vuelven rígidas y suelen exhibir clorosis (Benimeli et al., 2019). En muchos casos, ante la falta de N, el contenido de proteínas suele ser bajo y el de azúcares alto, debido a que el N es insuficiente para combinarse con todas las cadenas carbonadas y formar proteínas. La mayor parte del N absorbido por las plantas es en forma de nitratos, que está presente en los suelos por descomposición de la materia orgánica, deposición de estiércol animal o el agregado de fertilizantes.

El fósforo es otro de los nutrientes esenciales para el desarrollo vegetal, participando en funciones clave de transferencia de energía, en la fotosíntesis, transporte de nutrientes, entre otros. La ausencia de este elemento puede causar una reducción en el tamaño de la planta, número de hojas, producción de frutos, retraso en la madurez, etc. En el suelo, existe como fosfato, siendo incorporado al suelo de las mismas maneras que el nitrato, es decir a través de la degradación de la MO, de las deposiciones o de manera artificial por fertilización. Sin embargo, gran parte del fosfato en el suelo no está de forma disponible para las plantas (Gruposacsa, 2015).

Por lo expuesto, la incorporación de nutrientes al suelo es vital para el desarrollo vegetal y la recuperación de suelos degradados. Sin embargo, como se desarrolló anteriormente, la escasez de fertilizantes para la producción agrícola se presenta como un nuevo conflicto emergente, por lo que recuperar y reutilizar recursos como los nutrientes presentes en las corrientes residuales, se vuelve una necesidad imperante en los modelos de desarrollo actuales (Kurniawan et al., 2023).

A su vez, si bien las plantas consumen los nutrientes disponibles en los sustratos, la presencia de grandes cantidades de nitrógeno, fósforo y materia orgánica en los lodos puede ocasionar problemas si son liberados al ambiente o a los cursos de agua en forma incontrolada. Por este motivo, una gestión sistematizada y ambientalmente responsable

es necesaria para evitar daños secundarios al ambiente. Según informes relevados, anualmente se producen 5 millones de metros cúbicos de lodo de aguas residuales, y se estimó que para 2022 alcanzaría los 7 Mm<sup>3</sup>. La fitorremediación podría resultar efectiva para estabilizar el lodo al eliminar tanto materiales orgánicos como inorgánicos (Almasi et al., 2019).

#### 2.4.2. Índice de tolerancia en el enriquecimiento con lodos

La aplicación de lodos como enmienda puede tener efectos positivos o negativos. La inhibición o promoción del crecimiento vegetal causado por la aplicación de lodos, puede ser expresada a través del índice de tolerancia (IT), que se define como la relación entre el crecimiento de la planta en el suelo enriquecido con lodo, en comparación con un suelo control (Drzewiecka et al., 2019; Zaier et al., 2010).

$$IT = \frac{\text{Crecimiento en suelo enriquecido}}{\text{Crecimiento en suelo control}} \quad (2.1)$$

Si IT es igual a 1, se considera que no hay influencia del tratamiento en el crecimiento, si es mayor a 1 el efecto es favorable, y si es menor a 1, entonces el tratamiento afectaría negativamente el crecimiento vegetal.

Zaier et al. (2010) estudiaron la aplicación de lodos de depuradora de aguas residuales, encontrando que dicha enmienda estimulaba significativamente la producción de biomasa de *Brassica napus* L. (colza), y que este efecto se veía incrementado a medida que la concentración de lodo crecía. Esto llevó a que el índice de tolerancia para los tres tratamientos relacionados con las dosis de lodo fuera superior a 1, alcanzando un valor de 3 para el tratamiento de mayor contenido de lodo, confirmando el efecto beneficioso del lodo sobre el crecimiento de *B. napus*, probablemente debido a su efecto fertilizante.

Drzewiecka et al. (2019) calcularon el índice de tolerancia para plantas de *Acer platanoides* L. (arce real) y *Tilia cordata* Mill. (tilo) cultivadas en tierra y lodos mineros. En ambas plantas se obtuvo un IT inferior a 1 evaluando el crecimiento de toda la planta, y resultando en 0,1 y 0,2 cuando se aplicó sólo al peso foliar, mostrando el efecto inhibitorio que tuvo el lodo en las plantas, sobre todo en el crecimiento foliar.

#### **2.4.3. Mejoramiento de la fitorremediación utilizando técnicas agronómicas**

La incorporación de lodos al suelo no sólo resulta en una forma alternativa para el tratamiento del lodo como problemática ambiental, sino que al utilizarse como potencial mejorador de suelo también resulta en una forma de fomentar el proceso de fitorremediación del suelo ya afectado, tanto por recuperar sus propiedades fisicoquímicas en sí, como por potenciar el crecimiento de las plantas con poder fitorremediador que se implementen. Las prácticas agrícolas de incorporación de aditivos al suelo, ya sea como fertilizantes, inóculo de microorganismos, biochars etc., aumentan el crecimiento y la biomasa de las plantas, lo que conduce a una mayor absorción y acumulación de MP del suelo. Las prácticas agrícolas como el policultivo, o las diseñadas para mejorar la exposición del suelo a la luz y el aire, son otros medios para aumentar el crecimiento de las plantas, con una mayor generación de biomasa y un aumento en la cantidad de contaminantes extraídos/remediados (Pathak et al., 2020).

#### **2.4.4. Implementación de lodos como material de cierre**

Algunos autores han estudiado la utilización de lodos de distintas procedencias para material de cobertura temporal en rellenos sanitarios (Fan et al., 2019; He et al., 2021; Rosli et al., 2020). Sin embargo, tanto de esta forma como de la práctica más habitual de recirculación de los lodos dentro del RS, la materia orgánica, nutrientes y posibles

elementos valiosos presentes en el lodo quedan confinados en el relleno, imposibilitando que estos elementos puedan ser reconvertidos en materiales útiles para las actividades humanas.

Como se desarrolló previamente, las propiedades fisicoquímicas de los suelos que cubren los rellenos sanitarios a menudo necesitan mejorarse incorporando enmiendas. A su vez, uno de los posibles usos de lodos de aguas residuales es su utilización como mejorador de suelos, debido a su aporte de materia orgánica, macro y micronutrientes (Eid et al., 2019), incrementando su fertilidad y mejorando el desarrollo vegetal y rendimiento de cultivos.

Los rellenos sanitarios comprenden áreas muy grandes, por lo que la aplicación de lodos al suelo de cobertura podría ser una opción efectiva y económica como fuente alternativa de MO y nutrientes, al tiempo que mejora sus propiedades físicas y disminuye la presión sobre recursos necesarios para la producción alimenticia (Kim y Owens, 2010; Kurniawan et al., 2023; Song y Lee, 2010). Por otro lado, su utilización en tareas de recuperación de un área altamente afectada como un RS, mejoraría la aceptación social sobre su implementación en suelos, a la vez que disminuye el riesgo de contaminación respecto a su aplicación en otras áreas, por ser ésta, un sitio con usos restringidos y controles ambientales permanentes.

Si bien no existe una norma específica que legisle la utilización de este tipo de lodos, está vigente la resolución “Norma técnica para el manejo sustentable de barros y biosólidos generados en plantas depuradoras de efluentes líquidos cloacales y mixtos cloacales-industriales” (MDSyMA, 2018), que puede utilizarse como norma guía para intentar establecer las condiciones del manejo sustentable de los lodos analizados.

En dicha norma, según diferentes requerimientos (como niveles de patógenos máximos establecidos), pueden clasificarse en biosólidos clase A o B, y en función de ellos surgen distintas limitaciones para su uso.

El Artículo N°4 de la norma establece que los biosólidos que se encuentren por encima de los valores de referencia de metales en el biosólido o que posean alguna de las características que los definen como peligrosos en los términos del marco regulatorio vigente, no serán considerados aptos para su utilización, según las formas de uso definidas en el artículo 10 “formas de uso y disposición”. Dentro de las formas de uso se encuentra la posibilidad de ser utilizados como cobertura final o bio-coberturas en las acciones de clausura de rellenos sanitarios de residuos sólidos urbanos y en las actividades de su revegetación, que son los objetivos macros planteados en esta tesis.

Particularmente, para que el lodo sea aplicado según las formas establecidas de uso en la norma (dentro de las cuales se encuentra su uso como material de cobertura final para el cierre de rellenos sanitarios) el mismo debe, además, atravesar un proceso de estabilización. Dentro de estos procesos se encuentra el compostaje, digestión aeróbica y anaeróbica termofílica, entre otros procesos. De no atravesar por uno de estos procesos el biosólido no puede ser considerado como de “clase A o B”, y debe ser enviado a disposición. Dentro de las opciones de disposición, se encuentra la “Disposición como cobertura de las capas diarias de las celdas en rellenos sanitarios”, que puede ser una opción cuando no se logren cumplir con los objetivos planteados, aunque de esta forma surge un desaprovechamiento de los nutrientes y recursos presentes en el lodo, a la vez que se disminuye la vida útil de las celdas del RS. Además, existen restricciones sobre el cuerpo receptor, como el contenido de metales ya presentes en el suelo, cercanía a captaciones de agua, permeabilidad del suelo, nivel freático, entre otros aspectos a analizar al momento de su aplicación real.

## 2.5. Modelado de los procesos de fitorremediación

El propósito del modelado es predecir la transferencia de contaminantes del suelo a las plantas (Pedron et al., 2017). Se suelen utilizar tanto modelos mecanicistas como empíricos para predecir la concentración final en las plantas o en el suelo, en función de los objetivos buscados (Lopes et al., 2012).

En las siguientes secciones, se presentan algunos de los modelos encontrados en la bibliografía, que pueden ser útiles en la simulación a escala real en forma eficiente y medianamente simple.

### 2.5.1. Factores de bioconcentración/ traslocación

La eficiencia de la fitoextracción se suele cuantificar calculando el factor de bioconcentración (FBC) y el factor de traslocación (FT) (Alaribe y Agamuthu, 2015; Almasi et al., 2019; Pedron et al., 2017). Las expresiones correspondientes pueden representarse por las siguientes ecuaciones:

$$\text{Factor de bioconcentración: } FBC = \frac{C_{planta,i}}{C_{suelo,i}} \quad (2.2)$$

$$\text{Factor de traslocación: } FT = \frac{C_{brote,i}}{C_{raiz,i}} \quad (2.3)$$

Donde  $C_{planta,i}$ , es la concentración del metal en la planta cosechada,  $C_{suelo,i}$  es la concentración del metal en el suelo,  $C_{raiz,i}$  representa el contenido del metal en las raíces y  $C_{brote,i}$  en las partes aéreas.

Luo et al. (2020) además calcula el factor de extracción total de metales:

$$\text{Factor de extracción: } FE = C_{planta,i} \times MS_{planta} \quad (2.4)$$

Donde  $MS_{planta}$  es el peso seco de los tejidos vegetales.

Almasi et al. (2019) estudiaron el potencial de las plantas *Gossypium hirsutum* L. (algodón) y *Solanum lycopersicum* L. (tomate) para la estabilización de lodos de depuradora. Los factores de translocación (2,44) y de bioconcentración (1,63) más altos se observaron para *S. lycopersicum*. Los autores expresaron que las plantas utilizadas tienen una alta capacidad de translocación y acumulación de Cd y que, evaluando la totalidad de los parámetros, se podrían usar adecuadamente para estabilizar los lodos de depuradora.

En el estudio de Alaribe y Agamuthu (2019) de remoción de Pb en suelos contaminados, con ejemplares de *Lantana cámara* L. (1753) (bandera española) y enmendados con distintos sustratos, el FBC y FT fueron calculados bajo los distintos tratamientos. Las plantas exhibieron un alto FBC y un bajo FT de Pb, bajo las diferentes concentraciones Pb estudiadas. Estos resultados sugirieron que el mecanismo de eliminación de Pb por las plantas de *L. camara* puede ser a través de fitoextracción en conjunto con la fitoestabilización, al contrario de los mecanismos utilizados por los hiperacumuladores.

El factor de bioconcentración, se puede utilizar para evaluar la efectividad de las plantas en la eliminación de metales del suelo en un período de crecimiento corto. El factor de translocación (FT) define la relación de concentración de metales entre la biomasa aérea y subterránea y proporciona una estimación de la translocación de metales dentro de la planta. Los resultados de ambos se pueden usar para evaluar la capacidad de la planta de extraer metales del suelo y trasladarlos a tejidos cosechables, y proporcionar

una evaluación preliminar de la eficacia potencial de la fitorremediación (Pedron et al., 2017).

El FBC se usa generalmente para evaluar el rendimiento de las especies de plantas e incluye un supuesto de linealidad en el comportamiento de absorción: la concentración del metal en las plantas aumenta con un contenido creciente en el suelo, en una relación específica para cada contaminante y cada planta. Sin embargo, en muchos estudios se ha observado una desviación de esta tendencia: las plantas generalmente toman elementos de manera más eficiente a bajas concentraciones del metal en el suelo, causando que el FBC disminuya a medida que se da un incremento de la presencia del contaminante en el sustrato (Pedron et al., 2017). Esto ha llevado a que se proponga el uso de funciones no lineales como modelos de absorción de contaminantes por las plantas.

### **2.5.2. Modelos de isotermas de sorción**

El modelo de Freundlich se puede utilizar para evaluar la absorción de metales pesados en suelos contaminados con concentraciones de contaminante significativamente diferentes. El modelo se basa en la concentración total y disponible del contaminante (Jaskulak et al., 2020; Pedron et al., 2017). Considera que la absorción se da en forma no lineal, y tiene en cuenta las diferencias entre las especies de plantas, lo que ayuda durante el proceso de selección de las plantas más adecuadas para un área determinada. Al mismo tiempo, es un modelo dinámico simple, haciendo su implementación a escala real fácil de aplicar (Jaskulak et al., 2020; Yaashikaa et al., 2019).

El modelo puede ser descrito de la siguiente manera:

$$q_e = C_e^{\frac{1}{n}} \times K \quad (2.5)$$

En la ecuación tipo Freundlich,  $K$  puede considerarse como la capacidad de sorción (un valor de  $K$  mayor indica una capacidad de sorción mayor), mientras que el valor de  $1/n$  es indicativo de la fuerza de sorción (Alaribe y Agamuthu, 2019; Pedron et al., 2017). Los valores más grandes de  $n$  implican fuertes interacciones entre sorbentes e iones metálicos (Alaribe y Agamuthu, 2019).

La biosorción es el proceso de sorción de un contaminante por biomasa no viva debido a la presencia de superficies adsorbentes caracterizadas por grupos funcionales capaces de interactuar con el contaminante. Se caracteriza por diferentes procesos como la adsorción en las superficies, precipitación, intercambio iónico y complejación. La captación de MP por parte de las plantas involucra organismos vivos, con un mecanismo fisiológico de transporte de contaminantes, que depende por ejemplo del tipo de especie. Por lo tanto, la ecuación de tipo Freundlich puede usarse como una herramienta operativa para planificar la fitorremediación, sin atribuir significación termodinámica a los parámetros del modelo, usándolos exclusivamente para una indicación de la aplicabilidad de la fitorremediación en las condiciones específicas del sitio contaminado bajo examinación (Pedron et al., 2017).

Alaribe y Agamuthu (2019) estudiaron la remoción de Pb en suelos contaminados bajo distintas concentraciones, con ejemplares de *Lantana cámara* L., ajustando un modelo de isoterma de Freundlich. Además, se estudió la influencia del agregado al suelo de distintas enmiendas. Las isotermas se ajustaron muy bien a los datos experimentales, con coeficientes de determinación de regresión entre 0,9012 y 0,9840. Los parámetros del modelo variaron, según el tratamiento, entre 2,44 a 2,59 el valor de  $n$ , y los valores de  $K$  por otro lado, variaron entre 0,01 y 0,30. El valor más alto de  $n$  se halló en los suelos no suplementados, indicando que el agregado de enmiendas provocó una disminución

entre la afinidad suelo-metal, promoviendo el movimiento del metal desde el suelo contaminado hacia las plantas.

Yaashikaa et al. (2019) estudiaron la remoción de cromo con ejemplares *Sorghum bicolor* L. (sorgo), evaluando la influencia de la aplicación de bacterias de *Pannonibacter phragmetitus*, resistentes al cromo, como promotoras del crecimiento de las plantas para mejorar la absorción de este metal. Se aplicaron los modelos de isotermas de Freundlich y Langmuir para evaluar la absorción del cromo en las plantas de sorgo. Ambos modelos describieron adecuadamente el proceso, resultando ligeramente mejor, el modelo de Langmuir.

Pedron et al. (2017) estudiaron la fitoextracción, realizada a escala de invernadero, para la remediación de un sitio contaminado con arsénico (As), con alta variabilidad. Se compararon tres especies vegetales (*Brassica juncea* var. Scala, *Lupinus albus* var. Multitalia, y *Helianthus annuus* var. Paola) y se estudió el efecto de la adición de fosfato para aumentar la biodisponibilidad del contaminante. La transferencia del As del suelo a la planta se estudió con un enfoque similar a Freundlich a fin de obtener una ecuación de predicción simple pero más confiable para definir el comportamiento de absorción de diferentes especies de plantas en el suelo con propiedades físicas y químicas homogéneas, y parámetros de fertilidad similares (NPK) pero caracterizados por áreas que presentan una variabilidad considerable en la concentración de As. El modelo se ajustó tanto para la absorción del sistema de raíces como para la parte aérea de la planta, y se relacionó tanto con la concentración total de arsénico en el suelo, como con el contenido potencialmente biodisponible. Entre estos últimos, si bien los parámetros cambiaron, la tendencia fue la misma para ambas metodologías. Finalmente, el modelo tipo Freundlich no sólo fue utilizado para modelar la concentración del metal en la planta en relación con la del suelo, sino para modelar la cantidad de metal extraído, relacionando el contenido

de metal en el vegetal con el rendimiento de biomasa. El ajuste del modelo fue satisfactorio en todos los casos, concluyendo que los modelos de este tipo se pueden utilizar para predecir en forma realista la eficiencia de esta tecnología. Por otro lado, los resultados mostraron que, para todas las especies de plantas, la absorción siempre aumentó después del tratamiento con fosfato.

Memarian y Ramamurthy (2013) estudiaron la remoción de Cd (II) y Pb (II) *Brassica juncea* L. (mostaza india) en presencia de surfactantes. La remoción de metales se evaluó con los modelos lineales y los no lineales de tipo Langmuir y Freundlich, relacionando la concentración del contaminante en la planta con la concentración del contaminante en el suelo en forma soluble. El modelo lineal es un caso especial del modelo de Freundlich para  $n=1$ . El modelo tipo Freundlich describió mejor la absorción simultánea de Cd (II) y Pb (II) que los otros dos modelos. Comparando los parámetros del modelo tipo Freundlich, para ambos metales, se pudo inferir que la capacidad de biosorción de Pb fue aproximadamente 2,6 veces mayor que la de Cd para la planta de mostaza india. Si bien este estudio evalúa la extracción simultánea de ambos metales, cada modelo se ajusta a cada metal por separado, sin considerar la influencia de la presencia conjunta.

Aunque se reconoce que los mecanismos que median el proceso fitoextracción de los contaminantes por las plantas son más complejos que los mecanismos físico-químicos puros de adsorción representados por las isothermas de Langmuir y Freundlich, el uso de las formas matemáticas de las isothermas de adsorción ha sido empleado para propósitos de modelado. Si se pudiera establecer con éxito una analogía con la teoría tradicional de adsorción, el modelo de Langmuir indicaría que la absorción de contaminantes por parte de las plantas no puede superar un determinado nivel de máximo de saturación (Saber et al., 2018).

### 2.5.3. Aplicación de modelos de superficie de respuesta

La optimización de los parámetros que condicionan el proceso de fitorremediación resulta uno de los pasos más importantes para garantizar la calidad del proceso. Hay una variedad de factores que determinan y afectan el alcance y el éxito de esta tecnología, y adoptar un enfoque de optimización variable por variable lleva mucho tiempo, es costoso y no identifica las posibles interacciones entre las variables. Hoy en día, una de las estrategias de predicción y optimización más importantes es el uso de modelos estadísticos y matemáticos, como la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM). RSM es un modelo basado en la metodología estadística utilizada para diseñar experimentos, modelar, evaluar los efectos de las variables y sus interacciones y determinar los puntos óptimos de un proceso (Jaskulak et al., 2020; Upcraft y Guo, 2020).

Mohammadi et al. (2019) aplicaron RSM para la optimización de la eliminación de pireno de suelo contaminado, utilizando plantas de *Sorghum bicolor* L. Moench, 1974 (sorgo). Estudiaron los efectos del ácido indol acético (IAA), bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, concentración inicial del contaminante y el tiempo de tratamiento en el aumento de la eficiencia de eliminación de pireno mediante el proceso de fitorremediación. Se aplicó un diseño Box-Behnken (BBD), que es un modelo de segundo orden basado en un diseño factorial incompleto de tres niveles. Un total de 32 puntos experimentales fueron necesarios. En el modelo RSM, el modelo no lineal de segundo orden estaba de acuerdo con los resultados experimentales. Los efectos de interacción entre las distintas variables y las condiciones óptimas para la remoción de pireno fueron estudiadas con éxito.

Jaafari y Yaghmaeian (2019) aplicaron un diseño BBD para estudiar la remoción de metales pesados (Cd, Co, Fe y As) de un efluente líquido utilizando microalgas. Como

variables independientes se tomaron la concentración inicial de metal, de microalgas y el tiempo de reacción, estudiando como respuestas la eficiencia en la remoción de cada uno de los metales. En todos los casos una respuesta polinómica de segundo orden fue ajustada, y las condiciones óptimas fueron estudiadas para cada respuesta en particular.

Titah et al. (2018) aplicaron la Metodología de superficie de respuesta (RSM) como modelo para el estudio de la absorción de arsénico por parte de ejemplares de *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) P.H.Raven en suelo. A través de la función de deseabilidad se encontraron las condiciones óptimas para la remoción, encontrándose ésta en un 72,6%. Los resultados obtenidos mostraron que el modelo podría usarse en la predicción de la absorción de As, otorgando apenas una baja sobreestimación (aproximadamente 3,5%) respecto a los resultados experimentales llevados a cabo para la validación.

#### **2.5.4. Modelos de regresión múltiple**

Eid et al. (2019) evaluaron a través de modelos de regresión la acumulación de los distintos metales en cada una de las partes de las plantas de frijoles, a partir de su concentración en el suelo, del contenido de materia orgánica y pH del suelo como factores. El objetivo fue evaluar los riesgos del consumo de frijoles cultivados en suelos enmendados con lodos de depuradora en distintas concentraciones. El contenido de los metales traza en los diferentes tejidos del frijol mostraron que la mayoría de estos se acumularon en las raíces de las plantas en lugar de los frutos.

Lopes et al. (2012) estudiaron mediante modelos de regresión la dependencia del contenido de metal extraíble en un suelo en relación a variables como el contenido total del metal en el suelo, el pH, materia orgánica, fósforo total, nitrógeno total, entre otras. Luego se aplicaron modelos de regresión también para la estimación del factor de

bioconcentración del metal en las plantas (FBC), en función del contenido de metal extraíble en el suelo estimado. Se observó que la relación FBC y la concentración de metal extraíble en el suelo podrían describirse de manera significativa mediante un modelo de potencia para todos los MP presentes en el suelo. Los modelos demostraron ser adecuados para estimar la concentración de metal en la planta y de aplicación simple, pudiendo resultar útiles para realizar evaluaciones de riesgos.

Kumar et al. (2019) utilizaron un modelo de regresión múltiple para predecir la absorción de varios metales pesados en tejidos de *Pistia stratiotes* L. (repollito de agua) cultivados en efluentes de fábricas de papel contaminados con Cd, Cu, Fe, Pb, Mn y Zn. Los resultados mostraron que el modelo fue confiable para describir el proceso de fitoextracción, y se encontró que el pH y la concentración de metales pesados fueron las variables más importantes para el modelo de predicción desarrollado.

### **2.5.5. Otros modelos**

Zhao et al. (2019), desarrolló un modelo simple de absorción de metales pesados sigmoide que utiliza el factor de bioconcentración (FBC) de las plantas, la tasa de contaminación de biomasa y metales pesados. Durante el ciclo de vida de una planta, su crecimiento se puede dividir en tres fases: fase de aceleración temprana o crecimiento exponencial, fase lineal y fase de saturación para la maduración o de senescencia. Estas fases de crecimiento se pueden simular usando la función de crecimiento sigmoide como modelo matemático de crecimiento. Este estudio se basó en la hipótesis teórica de que la tasa de absorción de metales pesados por planta es proporcional a la biomasa de la planta y, por lo tanto, la acumulación de metales pesados en la planta puede predecirse combinando la función de crecimiento sigmoide y el factor de bioconcentración o

bioacumulación. La función finalmente aplicada, resultado de combinar una predicción del crecimiento de biomasa junto con el FBC, resultó en la siguiente expresión:

$$M_{MP,planta} = \frac{M_{max}}{1 + e^{-k_M(t-t_{0,5,M})}} \times C_{MP,suelo} \times FBC_{MP} \quad (2.6)$$

Donde  $M_{MP,planta}$  es la cantidad de metal extraído por la planta (mg seco),  $C_{MP,suelo}$  es la concentración del metal en el suelo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ),  $FBC_{MP}$  es el factor de bioconcentración que relaciona la concentración del metal en la planta y en el suelo,  $M_{max}$  es la máxima biomasa generada por la planta,  $k_M$  es una constante que determina la curvatura del patrón de crecimiento sigmoide,  $t$  es el tiempo de crecimiento y  $t_{0,5,M}$  es el tiempo en el que la tasa de crecimiento alcanza la mitad del valor máximo. Se demostró que el modelo fue útil en la predicción de la absorción en los girasoles cultivados en suelos contaminados con Cd, Ni, Pb y Zn.

### 2.5.6. Estudios cinéticos

La velocidad de una reacción química puede proporcionar información importante sobre el mecanismo y el comportamiento en el que se producen las interacciones biológicas en los sistemas vivos (Emiliani et al., 2020). Emiliani et al. (2020) estudiaron la remoción por parte de la macrófita *Salvinia biloba* Raddi (helechito de agua), de Pb, Cu, Zn y Cd de un agua contaminada sintéticamente. La eliminación de Cd y Zn del agua se ajustó a un modelo de reacción de segundo orden, lo que sugiere que la velocidad del proceso de fitorremediación puede depender de dos reactivos de primer orden, como la concentración de metales y el número de sitios de unión de metales en la biomasa de *S. biloba*.

Yaashikaa et al. (2019) evaluaron tres modelos cinéticos en la remoción de cromo mediante el cultivo de sorgo bicolor. Los modelos evaluados fueron de pseudo primer orden, pseudo segundo orden y el modelo cinético de Elovich que se expresan de la siguiente manera:

$$\text{Modelo de pseudo primer orden: } q_t = q_e(1 - \exp(-k_1t)) \quad (2.7)$$

$$\text{Modelo de pseudo Segundo orden: } q_t = \frac{q_e^2 k_2 t}{1 + q_e k_2 t} \quad (2.8)$$

$$\text{Modelo cinético de Elovich: } q_t = (1 + \beta_E) \ln(1 + \alpha_E \beta_E t) \quad (2.9)$$

Donde  $q_e$  es la masa del ion Cr (VI) absorbido por unidad de masa de planta en el equilibrio ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $q_t$  es la capacidad de absorción en el tiempo  $t$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $t$  es el tiempo,  $k_1$  es la constante de velocidad cinética de pseudo primer orden ( $\text{d}^{-1}$ ),  $k_2$  es la constante de velocidad de pseudo segundo orden ( $\text{g mg}^{-1} \text{d}^{-1}$ ),  $\alpha_E$  es la tasa de adsorción inicial ( $\text{mg g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) y  $\beta_E$  es la constante de desorción ( $\text{g mg}^{-1}$ ), aunque en este caso no presentan interpretaciones relacionadas al proceso de adsorción.

Se encontró que todos los modelos describieron bien la captación del metal, siendo el modelo con una cinética de pseudo segundo orden el que mejor representó los resultados en el tiempo.

Alaribe y Agamuthu (2015) estudiaron la remoción de suelos contaminados artificialmente con plomo ( $\text{PbCl}_2$ ) en concentraciones de 10-80  $\text{mg/kg}$  suelo, enmendados con compost de dos orígenes distintos.

Los resultados de la extracción se ajustaron al modelo cinético de primer orden:

$C_{t,i} = C_{0,i} \times e^{-kt}$ , donde  $C_t$  es la concentración ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de metal residual en un momento específico y  $C_0$  es la concentración inicial de metal ( $\text{mg kg}^{-1}$ ). Las tasas de remoción más altas se encontraron para las experiencias con menor contenido de plomo ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y con suelos enmendados, obteniendo valores de constantes cinéticas de pseudo primer orden de  $0,3069 \text{ d}^{-1}$  y  $0,2580 \text{ d}^{-1}$ , para los dos tipos de compost.

Alaribe y Agamuthu (2019) estudiaron la descontaminación de suelos contaminados con distintas concentraciones de plomo (adicionado artificialmente) y suplementados con distintas enmiendas. Estudiaron la tasa de remoción en cada uno de los tratamientos, ajustando un modelo cinético de primer orden:  $C_{t,Pb} = C_{0,Pb} \times e^{-kt}$ , donde  $C_{t,Pb}$  es la concentración ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de metal residual en un momento específico,  $C_{0,Pb}$  es la concentración inicial de metal ( $\text{mg kg}^{-1}$ ),  $k$  es la constante cinética de primer orden ( $\text{día}^{-1}$ ) y  $t$  el tiempo transcurrido (día). La tasa de absorción de Pb aumentó en los tratamientos con menor contenido de plomo, y en los suelos suplementados en comparación con el suelo sin el agregado de una enmienda. Los resultados indicaron que las tasas óptimas de absorción de metales ocurrieron a la menor contaminación de plomo ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ), probablemente debido la mayor presencia de microbiota menos tolerante. Además, el hecho de que las tasas de absorción en los suelos suplementados fueran más altas, podría deberse a la mayor presencia de N que respalda la disponibilidad de nutrientes para el crecimiento de las plantas y la actividad microbiana (Alaribe y Agamuthu, 2019).

## 2.6. El después en la fitorremediación

Si bien la fitoextracción resulta una herramienta atractiva para la remoción de metales pesados en suelos y agua a través de su acumulación en los tejidos vegetales, es

importante evaluar la gestión de este biorresiduo, en el que resulta la biomasa contaminada, proponiendo procesos de eliminación y utilización ambientalmente seguros. El compostaje, las operaciones de secado, y los tratamientos térmicos como la incineración se presentan como posibles procesos para su tratamiento o reciclado (Alaboudi et al., 2018; Shen et al., 2022).

El tratamiento térmico es el más común de los procesos utilizados para eliminar la biomasa contaminada por MP, e incluye distintos procesos en función de las condiciones operativas: incineración, pirolisis, gasificación, carbonización hidrotermal, licuefacción y gasificación (Liu y Tran, 2021). En el proceso de incineración, la biomasa de las plantas se concentrará en los residuos del proceso (principalmente cenizas de fondo y volantes, como así también gases de combustión), reduciendo en forma significativa el volumen del biorresiduo. Variables como la temperatura puede influir en la distribución de los MP entre las cenizas de fondo y las fases gaseosas. Además, algunos aditivos como la zeolita, el óxido de calcio, el caolín, entre otros, pueden evitar que los MP en los residuos de fitorremediación se transfieran a la fase gaseosa (Liu y Tran, 2021).

El proceso de compostaje implica la degradación biológica en condiciones aeróbicas de la biomasa vegetal. La reducción de materia con este tipo de proceso es menor que en el tratamiento térmico, y uno de los factores de riesgo a tener en cuenta es la transferencia del contaminante a los lixiviados (Liu y Tran, 2021). La combinación de varios procesos también puede resultar en una estrategia adecuada (Liu y Tran, 2021).

## **2.7. Costos asociados a la fitorremediación**

En general, se informa al proceso de fitorremediación como uno de los métodos más económicos para extraer contaminantes del suelo (Padmavathiamma y Li, 2007;

Shah y Daverey, 2020; Wan et al., 2016). Aunque no existe demasiada bibliografía que realice análisis económicos de los mismos, los costos informados para el proceso de fitorremediación rondan, por cada metro cúbico tratado, entre los 19 USD a los 78 USD (Shah y Daverey, 2020; Wan et al., 2016).

Wan et al. (2016) evaluaron durante dos años los costos asociados a un proceso de fitorremediación de suelos contaminados con arsénico, cadmio y plomo. En su análisis, los costos asociados a infraestructura y consumo de fertilizantes representaron los más importantes.

Los costos asociados al proceso de fitorremediación incluyen una investigación inicial necesaria para evaluar la contaminación local, caracterizar el sitio y pensar las estrategias de abordaje más adecuadas, cuya formulación y preparación también es parte de los recursos necesarios. Por otro lado, se incluye la preparación del suelo, la construcción y equipamiento de un invernadero para el cultivo de las plantas que serán utilizadas en el proceso, los sistemas de riego, y las instalaciones para el procesamiento de la biomasa contaminada. Además, en general se requiere de la construcción de caminos y mejoras asociadas a los mismos, para facilitar el trabajo y transporte de materiales.

En cuanto a los costos operativos, una parte importante se ve representada por la mano de obra empleada para realizar las tareas de campo (arado del suelo, trasplante de plantas, control de malezas y plagas de ser necesario, cosecha, entre otros), de invernadero en la producción de plántulas y operación de la planta de tratamiento de biomasa. También se incluyen todos los materiales, insumos y servicios asociados a las tareas anteriores. Además, se deben considerar los pagos por servicios de monitoreo ambiental.

Los beneficios incluidos durante y después de la remediación dependerán del tipo de cultivo implantado, el destino del sitio remediado, entre otras cuestiones. Si se utilizan

cultivos potencialmente comercializables, puede considerarse un ingreso mediante este medio. Sin embargo, en este caso, se debe considerar el riesgo asociado a la actividad (por ejemplo, si la planta acumula MP en las partes comercializables y para qué fines serán comercializadas). Luego de la remediación, el área remediada podrá ser empleada para diferentes fines, además de considerar el servicio eco-sistémico que puede prestar. Wan et al. (2016) consideraron como beneficio luego de la remediación, la mejora comparada con las pérdidas causadas por la contaminación anterior, tales como la reducción en la cantidad de productos agrícolas, la reducción de la función del servicio eco-sistémico y el efecto sobre la salud humana, asumiendo el recupero de todas estas funciones luego del proceso.

En general, los rellenos sanitarios requieren de un tiempo para considerarse al sitio “recuperado”. Suelen destinarse a áreas recreativas y educativas, canchas de golf entre otras posibilidades. Si bien no todas implican un beneficio explícito en términos monetarios (dependiendo también del tipo de gestión), es posible evaluar los beneficios indirectos e implícitos que puede tener su recupero, considerando los servicios ecosistémicos que se recuperan, los beneficios sociales, etc., a través de diferentes metodologías de análisis de costos para bienes sin mercado.

## **2.8. Descripción del área de estudio**

El presente trabajo se desarrolla sobre la problemática de la gestión de los lodos generados en la planta de tratamiento de lixiviados del relleno sanitario de la ciudad de Santa Fe (Santa Fe, Argentina). El complejo se ubica en la periferia de la ciudad, entre la Avenida Circunvalación y el Río Salado (coordenadas: -31.5920554205763, -60.75098161667877).



**Figura 2.2. Imágenes del Relleno Sanitario de la ciudad de Santa Fe**

En este relleno se tratan todos los RSU junto con los residuos recolectados de municipios y comunas aledañas. La planta de tratamiento de lixiviados procesa aproximadamente  $100 \text{ m}^3 \text{ día}^{-1}$  (Regaldo et al., 2020), y consiste en una serie de etapas que inicia en un decantador primario, seguido por una laguna de ecualización y desde donde se bombea hacia un tratamiento biológico. Este último, consta de una laguna anaeróbica y otra aeróbica, para luego seguir hacia el sedimentador secundario y finalizar

en otra laguna, donde se realiza un tratamiento fisicoquímico, se eliminan los sólidos en suspensión y se realiza la desinfección mediante cloración.

Aproximadamente  $75 \text{ m}^3 \text{ día}^{-1}$  de lixiviado tratados son volcados en el Río Salado, cumpliendo las especificaciones de la normativa ambiental provincial (Regaldo et al., 2020). Inicialmente, los lodos sedimentados eran recirculados en parte al tratamiento biológico, y otra parte al propio relleno sanitario, mediante su disposición final. Desde el año 2019 la empresa a cargo de la operación comenzó a experimentar a escala piloto el deshidratado de estos lodos mediante un sistema de geotubos, y actualmente lo aplica para la generación total de estos barro. Estos lodos, una vez deshidratados y consolidados en el geotubo (**Figura 2.3**), son finalmente dispuestos en el RS. Los geotubos, una vez llenos, tienen un volumen aproximado de  $54 \text{ m}^3$ , y están contruidos de membrana geotextil permeable, que permite la deshidratación y concentración de sólidos en su interior, y una reducción de hasta un 90% en el volumen de lodos.



**Figura 2.3. Geotubo de deshidratación de lodos (a) en escala piloto (b) en funcionamiento a escala real**

Regaldo et al. (2020) evaluaron las características del lixiviado tratado y no tratado del relleno de Santa Fe por un periodo de tres años, en periodos de verano e invierno. Los

resultados informados por los autores se muestran en la **Tabla 2.3**, y corresponden a los valores medios de muestreos ejecutados en 6 meses de verano y 6 meses de invierno durante 3 años.

**Tabla 2.3.** Características del lixiviado del Relleno Sanitario de Santa Fe (Argentina)

Parámetros	Verano		Invierno	
	Lixiviado sin tratar	Lixiviado tratado	Lixiviado sin tratar	Lixiviado tratado
Conductividad (mS cm <sup>-1</sup> )	13,43	12,52	19,53	12,45
pH	8,42	8,40	7,88	7,42
DBO <sub>5</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	1882	274	3842	314
DQO (mg L <sup>-1</sup> )	10591	4531	10573	4596
Pb (mg L <sup>-1</sup> )	0,20	0,17	0,27	0,26
Cr (mg L <sup>-1</sup> )	0,69	0,64	1,18	0,84
Ni (mg L <sup>-1</sup> )	0,35	0,31	0,47	0,36

Dentro de las características que se pueden resaltar de este estudio a los fines de esta tesis, se puede destacar que el pH del lixiviado presenta valores alcalinos, valores de materia orgánica de baja biodegradabilidad, una alta conductividad eléctrica, y presencia importante de Pb, Cr y Ni. Estas características son de importancia, ya que gran parte de los elementos presenten en los lixiviados quedan retenidos en los lodos del tratamiento. De los valores informados por los autores, se observa una reducción del valor promedio de Pb entre la entrada y la salida del 4 al 15% de la concentración del lixiviado sin tratar, según la estación, del 7 al 29% para el caso del Cr y del 11 al 23 % en el caso del Ni. Los metales a menudo son eliminados de la fase acuosa por los procesos de floculación y sedimentación (Regaldo et al., 2020), por lo que estas diferencias, posiblemente se deban a la fracción retenida en los sólidos, que finalmente son sedimentados en el clarificador y deshidratados en los geotubos.

## Capítulo 3. Materiales y métodos

En el presente capítulo se describe la metodología general aplicada para las distintas experiencias, como así las técnicas de laboratorio empleadas en la determinación de los diferentes parámetros empleados para el seguimiento y caracterización de los sistemas evaluados.

Todas las experiencias se llevaron a cabo en invernadero, en condiciones de luz natural. Cada tratamiento se realizó en macetas con recolección del percolado para evitar la pérdida de los elementos seguidos en el estudio (como nutrientes, metales pesados, etc.), como se muestra en la **Figura 3.1**.



**Figura 3.1.** *Nicotiana glauca* L. post trasplante al medio de crecimiento

### 3.1. Configuración experimental

Cada experimento se diseñó en función de la necesidad de estudiar hipótesis específicas referidas al objeto de estudio. Por ello, cada diseño experimental específico se describe en su respectivo capítulo (secciones **4.3** y **5.3**). En los primeros casos, se aplicó

la metodología estadística de diseño experimental, que permite diagramar las experiencias minimizando el número de puntos experimentales. El diseño experimental permite evaluar la importancia estadística de los parámetros de procesos individuales, así como la interacción entre los factores (Montgomery, 2013; Vera Candiotti et al., 2014).

En ambos casos se usó el software Design Expert 7.0 para formular los diseños experimentales, y realizar las evaluaciones estadísticas de los resultados. Se aplicó la metodología de superficie de respuesta para evaluar el efecto de las variables en las respuestas. El test de ANOVA permitió identificar la importancia de los términos individuales y de interacción cuando correspondía. Los términos significativos se evaluaron según su probabilidad (valor  $p$ ) con un nivel de significación del 95%. Este análisis, la verificación de sus hipótesis relevantes y el análisis de regresión múltiple proporcionaron información sobre la validez de cada modelo. Los valores atípicos se identificaron mediante la prueba de Cook (Montgomery, 2013; Vera Candiotti et al., 2014). Cuando correspondió, se aplicó un análisis de optimización a través de la función de deseabilidad, con el objetivo de minimizar o maximizar las respuestas en función de las variables de control, según los objetivos perseguidos.

Para la formulación de los diseños experimentales y en función de los objetivos propuestos, se debieron establecer previamente diferentes criterios de trabajo y condiciones experimentales que podían tener influencia en el proceso (tales como el pretratamiento del lodo, la germinación de las semillas, etc.). Por ello, una primera experiencia “exploratoria”, se llevó a cabo a fin de comprobar la supervivencia de distintas plantas en el suelo enmendado con el lodo de lixiviado a diferentes concentraciones extremas.

Semillas y plántulas de tabaco jazmín (*Nicotiana alata* L.), diente de león (*Taraxacum officinale* L.), caléndula (*Calendula officinalis* L.) fueron sembradas y trasplantadas respectivamente, en sustratos con distintas concentraciones de lodo (Control (0%), 10%, 25%, 50%, 75%, 90%), y con un pre-tratamiento diferente (lodo sin secar y lodo seco y molido). En todos los casos la germinación en los sustratos con lodo fue menor que en el control, y nula en el tratamiento con 75% de lodo. Los test de germinación en extracciones de lodo dieron como resultado un muy bajo índice de germinación (**Tabla 4.1**). En cuanto a la supervivencia y crecimiento de las plántulas trasplantadas a los sustratos, en general se observó un muy bajo crecimiento y endurecimiento del sustrato cuando el lodo era aplicado sin previo secado. En los sustratos conformados por el lodo seco se encontró que *N. alata* fue la que mejor se adaptó al medio de crecimiento, desarrollando gran biomasa aérea en las concentraciones bajas. Sin embargo, no logró sobrevivir en el sustrato con mayor concentración de lodo (90%), y el crecimiento fue notablemente menor en el tratamiento con 75% LR respecto del resto de tratamientos (con concentraciones menores de lodo).

Por otro lado, a partir de las caracterizaciones llevadas a cabo, tanto en el lixiviado como en el lodo, se encontró predominancia de plomo (Pb), cromo (Cr) y níquel (Ni), y en concentraciones variables según la fecha de muestreo. Previamente Khan et al. (2020b), en un estudio realizado en sistemas hidropónicos para descontaminación de efluentes líquidos artificiales, encontraron que las plantas de *N. alata* acumularon Pb, Cr y Ni en el brote, en forma significativamente mayor respecto de su sistema radicular.

En función de estos resultados y observaciones se determinaron las siguientes pautas para desarrollar los experimentos:

- Se utilizarían plantas de *Nicotiana alata* L. como objeto de estudio.

- Se utilizarían concentraciones máximas de lodo del 75% (V/V).
- El lodo sería secado previamente al aire, molido y estabilizado con el suelo con al menos 20 días.
- Las semillas de *N. alata* serían germinadas en sustratos comerciales, y luego trasplantadas a los medios de cultivo experimentales.
- El estudio de la influencia y remoción de Pb, Cr y Ni deberían ser estudiados como metales predominantes en el sustrato investigado.
- Concentraciones diferentes de los metales pesados deberían ser contempladas debido a su gran variabilidad en el lodo.

A fin de estudiar la posibilidad de utilizar el lodo como enmienda, se aplicó un diseño experimental de un factor, que correspondía a la concentración de lodo. De esta forma se buscó evaluar los efectos de su agregado en los sustratos sobre la supervivencia y condiciones de crecimiento de las plantas.

El segundo gran bloque de esta investigación consistió en evaluar la descontaminación del complejo suelo-lodo por parte de *N. alata* bajo diferentes situaciones de contaminación por metales pesado. Para ello se consideró un suelo enmendado a una concentración constante (a fin de no aportar variabilidad sobre este factor), y se aplicó un diseño experimental tipo Box–Behnken, para evaluar los efectos sobre *Nicotiana* sp. y la extracción de MP bajo distintas concentraciones de Pb, Cr y Ni.

Las semillas de *N. alata* fueron sembradas y germinadas en semilleros de 55 cm<sup>3</sup> cada celda, regadas con agua de grifo regularmente y solución nutritiva una vez a la semana. Luego de seis semanas de crecimiento, cuando las plántulas tenían entre 4 y 5 hojas verdaderas, y un promedio de 4 cm de altura, se seleccionaron ejemplares

homogéneos que fueron trasplantados en macetas con los sustratos correspondientes a cada tratamiento según el experimento. Este periodo de crecimiento y adaptación fue necesario para obtener plantas saludables y resistentes, que fuesen tolerantes y de fácil adaptación al sustrato final en cada tratamiento. En el primer bloque se utilizaron macetas de 4 L, en donde se agregó una cantidad de sustrato entre 1,8 a 2,1 kg por maceta, encontrándose este peso determinado por la densidad de las diferentes mezclas. En el segundo bloque, donde se aplicó una única proporción de lodo, se utilizaron macetas de 850 cm<sup>3</sup>, agregándose 0,5 kg en cada maceta. En todos los experimentos se colocó, en cada maceta, un único ejemplar de la especie seleccionada, *Nicotiana sp.* Muestras iniciales de cada tratamiento se recolectaron y guardaron para su posterior análisis.

En todos los casos las plantas se cultivaron hasta el estado de floración, y en ese momento fueron cosechadas, separando los tejidos de hoja, tallo, flores y raíces.

## **3.2. Determinaciones analíticas**

### **3.2.1. Determinación de pH**

El pH de los sustratos tiene un importante influencia en el proceso de extracción de contaminantes como metales pesados, ya que ejerce un control sobre la movilidad y biodisponibilidad de los metales en los suelo (Lopes et al., 2012).

#### *Procedimiento:*

Se hizo extracto de suelo en agua destilada en una relación 1:5 (p:v), y se dejó en agitación durante 2 horas. Luego la muestra fue centrifugada, y se determinó el pH de la solución.

### 3.2.2. Determinación de la conductividad eléctrica (CE)

La concentración de sales en los suelos y en sustratos utilizados como enmienda orgánica, puede ser determinada en forma indirecta a través de su conductividad eléctrica. Valores altos de CE puede influir negativamente en la capacidad de germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas, ya que repercute en el potencial osmótico del medio (Campitelli y Ceppi, 2008).

*Procedimiento:*

Se hizo extracto de suelo en agua destilada en una relación 1:5 (p:v), y se dejó en agitación durante 2 horas. Luego la muestra fue centrifugada, y se determinó el CE de la solución.

### 3.2.3. Materia orgánica

La determinación de materia orgánica se llevó a cabo mediante el método de pérdida de biomasa por ignición (Alaboudi et al., 2018; Eid et al., 2019; Salazar y Pignata, 2014). La muestra seca se calentó a 550°C en un horno de mufla durante 4 horas y posteriormente se pesaron las cenizas remanentes.

El contenido de materia orgánica en base seca se calculó:

$$Morg (\%) = \frac{MS - Cenizas}{MS} \times 100\% \quad (3.1)$$

El contenido de carbono se estimó utilizando un factor de conversión de 0,58 (Hough R.L. et al., 2003):

$$C (\%) = 0,58 \times Morg (\%) \quad (3.2)$$

### 3.2.4. Determinación del índice de germinación

La fitotoxicidad de un sustrato puede ser evaluada a través del índice de germinación (IG). Zucconi et al. (1981) sugieren que productos que presenten un IG entre 26 y 65 deben ser considerados fitotóxicos para ser empleados como tal. Productos con un IG de 66 a 100 pueden considerarse sin características fitotóxicas, y cuando el IG es mayor a 101 puede definirse al medio como un sustrato fito-estimulante. Esta prueba consistió en un ensayo de germinación en extracto acuoso de las diferentes muestras (lodo, suelo, mezclas de sustratos), utilizando semillas de *Lactuca sativa* L. (lechuga) (Campitelli y Ceppi, 2008).

*Procedimiento:*

El extracto se preparó en una mezcla con agua destilada, en una relación 1:5 (p:v). La mezcla se dejó en agitación durante 2 horas, y luego se filtró con gasas para recuperar el extracto acuoso. 15 semillas se colocaron en cajas Petri con 7 mL de extracto y se germinaron en la oscuridad durante 5 días a 25°C. Por cada muestra, se colocaron un total de 9 placas como réplicas. El control se realizó llevando a cabo el mismo procedimiento en agua destilada. A los 5 días, se contabilizó el total de semillas germinadas por placa y se midió la longitud de raíz de cada semilla germinada.

El índice de germinación se calculó siguiendo a (Fiasconaro et al., 2022; Zucconi et al., 1981), de la siguiente forma:

$$IG(\%) = \frac{GRS \times CRR}{100} \quad (3.3)$$

Donde:

*GRS* (%): Germinación relativa de semillas

$CRR$  (%): Crecimiento relativo de raíces

$$GRS (\%) = 100 \times \frac{NSG_{tratamiento}}{NSG_{control}} \quad (3.4)$$

$$CRR (\%) = 100 \times \frac{PLR_{tratamiento}}{PLR_{control}} \quad (3.5)$$

$NSG_{tratamiento}$ : Numero de semillas germinadas en el tratamiento

$NSG_{control}$ : Numero de semillas germinadas en el control

$PLR_{tratamiento}$ : Promedio de longitud de raíces de las semillas germinadas en el tratamiento

$PLR_{control}$ : Promedio de longitud de raíces de las semillas germinadas en el control

### 3.2.5. Determinación del área foliar

Procedimiento:

Una hoja de tamaño promedio fue seleccionada por cada planta, se registró su peso fresco ( $PF_{hoja}$ ), se escaneó su contorno y se determinó su superficie ( $AF_{hoja}$ ) utilizando el software ImageJ 1.52. Se determinó su peso seco ( $PS_{hoja}$ ) mediante secado en estufa hasta peso constante, y a través de la relación área/peso seco de esta hoja promedio, se estimó el área foliar total ( $AF_{total}$ ) de la planta:

$$AF_{total} = PS_{hojas\ totales} \times \frac{AF_{hoja}}{PS_{hoja}} \quad (3.6)$$

### 3.2.6. Determinación del índice de tolerancia

La inhibición o promoción del crecimiento vegetal causado por la aplicación de lodos fue evaluado a través del índice de tolerancia (IT) que se define como la relación

entre el crecimiento en el suelo enriquecido con lodo, en comparación con un suelo control (Drzewiecka et al., 2019; Zaier et al., 2010). Este índice fue calculado de la siguiente manera:

$$IT = \frac{PS_{T_i}}{PS_{T_{SN}}} \quad (3.7)$$

Donde:

$PS_{T_i}$ : Peso seco promedio de las plantas del tratamiento enmendado (T-i%).

$PS_{T_{SN}}$ : Peso seco promedio de la planta correspondiente al tratamiento control (T-SN).

Si el IT es igual a 1, no hay influencia del tratamiento en el crecimiento, si es mayor a 1 el efecto es favorable, y si es menor a 1, entonces se estaría indicando que el tratamiento afecta negativamente el crecimiento vegetal.

### 3.2.7. Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos

El contenido de clorofila y carotenoides está estrechamente relacionado con la eficiencia en la captura de luz, pudiendo generar incrementos en la efectividad neta de la fotosíntesis (Jia et al., 2015). Diversos estudios han evaluado el contenido de clorofilas como respuesta fisiológica a diferentes condiciones de estrés, o como reacción positiva a mejoras en el medio de cultivo (Abrile et al., 2021; Jia et al., 2015; Khan et al., 2019; Song y Lee, 2010). Para su determinación se aplicó una extracción en etanol al 95%.

*Procedimiento:*

Se agregaron aproximadamente 0,04 gr de hoja fresca en tubos de ensayo por duplicado, junto con 5 mL de etanol al 95%. Los tubos se colocaron en baño caliente a

80°C hasta la decoloración total de las hojas. Luego se midió la absorbancia de cada muestra a 750 nm, 664,2 nm, 648,6 nm y 470 nm en un espectrofotómetro (Perkin Elmer. Lambda 35. UV/VIS). La medición a 750 nm se realizó para corregir por turbidez.

Finalmente, el contenido de clorofilas a, b, totales y el contenido de carotenoides (en mg mL<sup>-1</sup>), se cuantificaron siguiendo las ecuaciones de Lichtenthaler (1987):

$$C_a = 13,36 \times A_{664,2} - 5,19 \times A_{648,6} \quad (3.8)$$

$$C_b = 27,43 \times A_{648,6} - 8,12 \times A_{664,2} \quad (3.9)$$

$$C_{totales} = 5,24 \times A_{664,2} + 22,24 \times A_{648,6} \quad (3.10)$$

$$Carotenoides = \frac{1000 \times A_{470} - 2,13 \times C_a - 97,64 \times C_b}{209} \quad (3.11)$$

Luego los resultados fueron re-expresados en mg g<sup>-1</sup> de hoja.

### 3.2.8. Determinación del contenido de azúcares y proteínas solubles totales

La mejora en las condiciones de nutrientes, disponibilidad de agua y la presencia o no de algún inhibidor del crecimiento vegetal, puede influir en el contenido de azúcares y proteínas totales en hojas (Fiasconaro et al., 2013; Méndez, 2014).

El contenido de azúcares y proteínas solubles totales se determinó a partir de su extracción en una solución tampón fosfato-potásico (Fiasconaro et al., 2019).

*Procedimiento:*

*Extracto de proteínas y azúcares:* una muestra fresca de aproximadamente 0,3 g se trituró y homogenizó en 10 mL de solución tampón (Tampón Fosfato- Potásico 50 mM y pH 7,4), en un mortero pre-enfriado. El extracto se filtró y centrifugó a 15500 rpm durante 15 minutos y a 4°C.

*Determinación de proteínas solubles totales (PST):* Se dispensaron 0,1 mL del sobrenadante del extracto de proteínas y azúcares en tubos de ensayo, junto con 5 mL de reactivo Azul de Coomassie G. Se dejó reaccionar la mezcla durante 10 minutos en oscuridad, y se determinó la absorbancia a 630 nm. Para obtener la curva de calibrado se repitió el mismo procedimiento con soluciones de distintas concentraciones de albumina de suero bovino. Finalmente, se determinó la concentración del extracto y se re-expresó en mg PST g<sup>-1</sup> de masa seca.

Para la preparación del reactivo de Azul de Coomassie G. se disolvieron 0,1 g de Azul de Coomassie G. en 50 mL de Etanol 95 %. Luego se agregó 85 mL de PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub>, se enrasó a 1 L y se filtró con papel de filtro.

*Determinación de azúcares solubles totales (AST):* Se dispensaron 0,25 mL del sobrenadante del extracto de proteínas y azúcares en tubos de ensayo, junto con 3 mL de reactivo de antrona. Se colaron en baño caliente a 100°C durante 15 minutos. Se colocó en baño frío inmediatamente para cortar la reacción, y se midió la absorbancia a 620 nm. Para obtener la curva de calibrado se repitió el mismo procedimiento con soluciones de distintas concentraciones de glucosa. Finalmente, se determinó la concentración del extracto y se re-expresó en mg AST g<sup>-1</sup> de masa seca.

Para la preparación del reactivo de Antrona, se disolvieron 50 mg de antrona en 100 mL de solución de ácido sulfúrico.

### 3.2.9. Determinación de indicadores de estrés

Se ha demostrado que, en condiciones de estrés, como la presencia de contaminantes tóxicos para las plantas como es el caso de los metales pesados, se estimula la formación de especies reactivas al oxígeno (ROS) (como  $O_2^-$ ,  $OH^\cdot$ ,  $H_2O_2$ ). Estas especies son moléculas dañinas porque provocan la oxidación inespecífica de proteínas y lípidos de membrana. Como consecuencia de la peroxidación lipídica, se forma una gran cantidad de aldehídos, entre los que se encuentra el malondialdehído (MDA), que puede además conjugarse tanto con el ADN como con las proteínas. De esta forma, un incremento de MDA puede utilizarse como indicador de estrés oxidativo (Álvarez-Robles et al., 2020).

Las plantas presentan distintos mecanismos de protección para eliminar las especies reactivas al oxígeno (ROS) antes de causar daños al metabolismo y a su estructura celular. Uno de ellos es ajustar la actividad de enzimas antioxidantes, como la catalasa (CAT) y la Peroxidasa de Guayacol (GPX) (Luo et al., 2020; Suárez et al., 2017). En condiciones de estrés, la síntesis de enzimas antioxidantes puede incrementarse como respuesta de protección. Cuando las condiciones son muy perjudiciales para la planta, por ejemplo, cuando los niveles de metales pesados llegan a ser tóxicos, la actividad enzimática puede inhibirse o reducirse. Por ello, el estudio del sistema de defensa antioxidante en las plantas puede proporcionar información importante sobre su potencial fitorremediador (Goswami y Das, 2016).

*Determinación del contenido de MDA:* El contenido de MDA se determinó siguiendo a Khan et al. (2020b) y Venkatachalam et al. (2017). Se pesaron 0,4 gramos de hoja fresca, se agregó 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 5% (p/v) y se homogenizó en un mortero en baño con hielo. El homogenizado se centrifugó a 10000 rpm durante 20

minutos a 4°C. Aproximadamente 4 mL del sobrenadante se mezclaron con 4 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,67% (p/v) y se incubó en un baño térmico a 95°C durante 30 minutos. Una vez finalizada el tiempo se cortó la reacción rápidamente en baño con hielo. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos, y se midieron las absorbancias del sobrenadante a 450, 532 y 600 nm. El contenido de MDA se determinó mediante la siguiente fórmula (Michael y Krishnaswamy, 2011):

$$MDA (\mu\text{mol } g^{-1}) = [6,35 \times (A_{532} - A_{600}) - (0,56 \times A_{450})] \times \frac{V}{M} \quad (3.12)$$

*M*: Peso de la muestra (g)

*V*: 0,004 L

*Determinación de las actividades enzimáticas Catalasa (CAT) y Peroxidasa de Guayacol (PXG)*: Las actividades de CAT y PXG se determinaron siguiendo a Khan et al (2020b) y Venkatachalam et al. (2017).

*Extracción*: Para la preparación de extractos enzimáticos, se homogeneizaron aproximadamente 0,1 g de tejido fresco de la hoja (en mortero pre-enfriado en baño con hielo) con 1 mL de tampón de fosfato de potasio enfriado con hielo (0,05 M, pH 7,4 que contenía EDTA 0,5 mM). El extracto se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se recogió y almacenó en heladera (4 °C) para la determinación de ambas actividades enzimáticas.

*Determinación de la actividad de Catalasa:*

Una alícuota de 60 µL del extracto de enzimas se añadió a la mezcla de reacción en una cubeta de cuarzo, que contenía 3 mL de tampón de fosfato de potasio (0,05 M, pH 7,4). Se adicionó 120 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 1% dando inicio a la reacción de actividad

enzimática. Inmediatamente se observa la absorbancia a 240 nm cada 30 segundos por un lapso de 3 minutos cada muestra.

*Cuantificación de la actividad de Catalasa:*

La actividad de catalasa se calculó utilizando el coeficiente de extinción ( $\epsilon$ ) de 39,4 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Una unidad de actividad CAT (U) se definió como la cantidad de enzima requerida para descomponer 1  $\mu$ mol de peróxido de hidrógeno x min<sup>-1</sup>, calculado luego de evaluar el decaimiento durante los 3 minutos a través de la pendiente de la concentración vs tiempo. Los resultados se expresaron en U<sub>CAT</sub> g<sup>-1</sup> PF.

$$CAT \left( \frac{U_{CAT}}{g \text{ PF}} \right) = \frac{k}{\epsilon \times b} \times 60000 \times \frac{V_T \times V_E}{PF \times V_M} \quad (3.13)$$

Donde:

CAT: actividad enzimática de la Catalasa (U<sub>CAT</sub> g<sup>-1</sup>PF)

k: cambio en la absorbancia durante la reacción, por unidad de tiempo (seg<sup>-1</sup>)

b: longitud de paso de la cubeta (cm);

$\epsilon$ : coeficiente de extinción de 39,4 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>;

60000: factor de conversión de unidades  $\left( \frac{60 \text{ seg}}{\text{min}} \times \frac{1000 \mu\text{mol}}{\text{mmol}} \right)$

V<sub>E</sub>: Volumen de extracción (L);

V<sub>M</sub>: Volumen de muestra del extracto utilizado en la reacción (L);

V<sub>T</sub>: Volumen total de reacción (L);

PF: Peso fresco de la muestra vegetal utilizada (g)

*Determinación de la actividad de Peroxidasa de Guayacol:*

Una alícuota de 15  $\mu\text{L}$  del extracto de enzimas se añadió a la mezcla de reacción en una cubeta de cuarzo que contenía 1,875 mL de tampón de fosfato de potasio (0,05 M, pH 6,1) y 0,75 mL de guayacol al 1%. Se adicionaron 0,75 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 1% iniciando la reacción de actividad enzimática. Inmediatamente se observa la absorbancia a 420 nm cada 30 segundos por un lapso de 3 minutos cada muestra.

*Cuantificación de la actividad de Peroxidasa de Guayacol:*

La actividad PXG se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de 26,6  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . Luego de evaluar la reacción durante los 3 minutos a través de la pendiente de la concentración versus tiempo, se expresaron los resultados en  $U_{\text{PXG}} \text{g}^{-1} \text{PF}$ .

$$PXG \left( \frac{U_{\text{PXG}}}{\text{g PF}} \right) = \frac{k}{\epsilon \times b} \times 60000 \times \frac{V_T \times V_E}{\text{PF} \times V_M} \quad (3.14)$$

Donde:

PXG: actividad enzimática de la Peroxidasa de Guayacol ( $U_{\text{PXG}} \text{g}^{-1} \text{PF}$ )

k: cambio en la absorbancia durante la reacción, por unidad de tiempo ( $\text{seg}^{-1}$ )

b: longitud de paso de la cubeta (cm);

$\epsilon$ : coeficiente de extinción de 26,6  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ;

60000: factor de conversión de unidades  $\left( \frac{60 \text{ seg}}{\text{min}} \times \frac{1000 \mu\text{mol}}{\text{mmol}} \right)$

$V_E$ : Volumen de extracción (L);

$V_M$ : Volumen de muestra del extracto utilizado en la reacción (L);

$V_T$ : Volumen total de reacción (L);

PF: Peso fresco de la muestra vegetal utilizada (g)

### 3.2.10. Determinación del contenido de microorganismos patógenos en lodo

La presencia de microorganismos patógenos es un riesgo que siempre está presente en las plantas de tratamiento de efluentes, sobre todo en los lodos resultantes de estos procesos. La presencia de coliformes totales, termotolerantes y *Escherichia coli* se usa para indicar una contaminación potencialmente peligrosa por el hecho de que el hábitat natural de estos microorganismos son las heces humanas y de animales de sangre caliente. Una población de coliformes totales es posible que contenga una elevada proporción de *E. coli* o sus variantes, la cual es considerada como el indicador más positivo de contaminación fecal reciente. Esto lleva implícito que la presencia de ella también muestra el riesgo de que haya presente microorganismos entéricos patógenos, por lo cual se constituye en un ensayo microbiológico rutinario y esencial.

En el presente trabajo, dichos grupos microbianos se determinaron empleando la metodología del número más probable (NMP) según el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (Baird et al., 2017). Se pesaron 10 g de lodo en una bolsa estéril y se adicionaron 90 mL de diluyente agua de peptona al 0,1% (m/v), colocando dicha bolsa por 10 min en un stomacher. Luego, se tomó 1 mL de esta muestra y se le realizaron diluciones seriadas decimales hasta  $10^{-9}$  empleando el mismo diluyente mencionado anteriormente. A continuación, se dispensó 1 mL de cada dilución decimal en tres tubos de 10 mL cada uno de caldo lauril sulfato conteniendo la campana de Durham y se incubaron los mismos a 37°C por 24-48 h. A las 24 h se registraron los tubos que produjeron gas y se re-incubaron por 24 h más a aquellos que no lo hicieron en las primeras 24 h. A las 48 h se seleccionaron todos los tubos positivos que produjeron gas (coliformes totales) para la determinación de coliformes termotolerantes. Aquí se seleccionó la dilución que arrojó positividad en todos los tubos y las siguientes dos diluciones más altas a estas. Se inoculó una asada de cada tubo positivo en 10 mL de

caldo EC y se incubó a 44,5°C por 24-48 h. Aquellos tubos que muestren producción de gas resultarán positivos para coliformes termotolerantes. Finalmente, tanto los coliformes totales como los termotolerantes se informaron como NMP g<sup>-1</sup>lodo.

Para confirmar la presencia de *E. coli* primero se realizó el aislamiento, purificación e identificación. Para el aislamiento y purificación, una asada de cada tubo EC positivo se plaqueó sobre agar EMB y se incubó por 24 h a 37°C. A continuación, se seleccionó una colonia característica de cada placa, se la sembró en agar nutritivo y se incubó por 24 h a 37°C. Seguidamente, se seleccionaron colonias individuales y se transfirieron por separado a un tubo inclinado con agar nutritivo y otro con caldo lactosado y se incubó por 24 h a 37°C. A aquellos cultivos que produjeron gas en el caldo lactosado, se le realizó una coloración de Gram para confirmar la micromorfología característica (coco-bacilos Gram negativos no formadores de esporos). Los tubos de agar nutritivo se emplearon para la identificación de *E. coli* a partir de la prueba conocida como IMVIC y que cuenta de 4 pruebas: producción de indol, viraje del indicador rojo de metilo, prueba de Voges-Proskauer y prueba del citrato de sodio.

La presencia en diversos sistemas de cualquier especie de *Salmonella* es potencialmente peligrosa como agente de enfermedades para el hombre y animales homeotermos. De esta manera, las bacterias del género *Salmonella* se estudiaron empleando el protocolo propuesto por la norma ISO 6579-1 (2017) y por Ratto et al. (1983) a través de la ejecución de cinco pasos sucesivos de enriquecimiento, aislamiento, identificación y tipificación serológica.

El enriquecimiento no selectivo se realizó empleando caldo lactosado pesando 100 g de lodo en 1000 mL de medio líquido e incubando a 37°C por 18-24 h. Seguidamente, se realizó el enriquecimiento selectivo; para ello, un volumen de 1 mL del cultivo anterior

se transfirió tanto a 10 mL de caldo selenito cistina como a 10 mL de caldo tetrionato verde brillante, incubándose a 43°C por 24 h. A continuación, se procedió al aislamiento en placas de agar selectivo a partir los cultivos obtenidos anteriormente. Los medios que se utilizaron fueron: agar verde brillante y agar bismuto sulfito, incubando dichas placas a 37°C por 24 h para el agar verde brillante y a la misma temperatura, pero por 48 h para el agar bismuto sulfito. Las colonias sospechosas fueron seleccionadas para la realización de las pruebas de identificación.

La identificación se realizó eligiendo dos o más colonias sospechosas de cada placa a partir de la ejecución de las siguientes pruebas bioquímicas:

- a) Purificación de cada colonia seleccionada en placas con Agar Mac Conkey;
- b) Siembra en agar nutritivo inclinado e incubación a 37°C por 24 h para inmediatamente comprobar su pureza por coloración Gram;
- c) Inoculación en agar triple azúcar-hierro e incubación a 37°C por 24 h y observación de reacción ácida o alcalina más la producción de sulfuro de hidrógeno;
- d) Análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa por hidrólisis del o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido;
- e) Hidrólisis de la urea en caldo urea y observación de la reacción positiva por el viraje del indicador a rosado;
- f) Prueba de la tolerancia al KCN por siembra en caldo cianuro de potasio e incubación a 37°C de 1- 4 días;
- g) Estudios de la descarboxilación de la lisina por siembra de las colonias en caldo diferencial;

h) Utilización del malonato y transformación de la fenilalanina en ácido fenilpirúvico empleando el medio malonato fenilalanina de Shaw y Clarke;

Finalmente, se realizaron las pruebas de tipificación serológica empleando el antígeno polivalente 0 (somático) en portaobjetos.

Cabe mencionar que los análisis microbiológicos descriptos fueron llevados a cabo en colaboración con el laboratorio de microbiología de la FBCB-UNL.

### **3.2.11. Determinación de metales**

La cuantificación de metales (Pb, Cr, Ni, As, Hg, Cu, Zn, Cd, Na, K, Mg y Ca según la muestra y experimento) en vegetales y suelos, se realizó por duplicado sobre las muestras previamente digeridas con una solución ácida en un dispositivo aplicando calentamiento por microondas. La muestra digerida fue analizada mediante espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Estos análisis fueron llevados a cabo en colaboración, por el INCAPE (UNL-CONICET).

#### *Procedimiento:*

Una muestra seca de aproximadamente 0,5 g, fue digerida en una mezcla de ácido nítrico (8 mL de HNO<sub>3</sub> 65%) y ácido fluorhídrico (0,5 mL de HF 40%), en calentamiento a través de un equipo microondas (Milestone ETHOS labstation). El procedimiento duró hasta la digestión completa de la muestra. Luego las muestras digeridas fueron diluidas adecuadamente para cuantificar dentro de los rangos de linealidad de los métodos aplicados, y los metales se determinaron por ICP-OES (Equipo Perkin Elmer ICP-OPTIMA 2100 DV). Los resultados obtenidos se referenciaron en base seca de la muestra original, y se expresaron como el valor medio  $\pm$  error estándar, considerando las distintas réplicas de cada experimento.

### 3.2.12. Determinación de Nitrógeno total de Kjeldahl (N)

La determinación del Nitrógeno total de Kjeldahl se basa en someter la muestra a una digestión ácida catalizada y alta temperatura, logrando de esta forma la mineralización del nitrógeno orgánico presente en la muestra, que pasa a estar presente en su forma amoniacal. El nitrógeno amoniacal formado y el amonio ya existente se colectan en una solución de ácido bórico, y posteriormente se determinan mediante titulación con solución de HCl.

#### *Procedimiento:*

La muestra, por duplicado, se digirió durante 2 horas en 15,6 mL de ácido sulfúrico concentrado y una mezcla de sulfato de sodio y sulfato de cobre como catalizadores, a una temperatura de 450 °C. La muestra se dejó enfriar, se agregaron 220 mL de agua destilada y 100 mL de una solución básica de hidróxido de sodio para liberar el amoniaco. La muestra fue destilada a 450 °C hasta alcanzar el volumen recolectado necesario (200 mL), recolectando el amoníaco en una solución de ácido bórico. Luego, las trampas fueron valoradas con una solución de ácido clorhídrico 0,1 M, y el contenido de N se determinó de la siguiente manera:

$$N(\%) = 100(\%) * \frac{(V_{HCl\ muestra} - V_{HCl\ blanco}) \times N_{HCl} \times 0,014}{P_{muestra}(g)} \quad (3.15)$$

Donde  $V_{HCl\ muestra}$  es el volumen de ácido gastado en la valoración de la muestra,  $N_{HCl}$  es la normalidad del ácido empleado,  $P_{muestra}$  es el peso de muestra empleado y  $V_{HCl\ blanco}$  volumen de ácido gastado en la titulación de la solución de ácido bórico utilizada en la recolección del destilado del blanco, que correspondió a un balón en el cual se siguieron los mismos procedimientos, pero sin el agregado de muestra.

### 3.2.13. Determinación de Nitrógeno amoniacal

Se hizo un extracto de suelo en agua destilada en una relación 1:10 (p:v) de cada muestra por duplicado, y se dejó en agitación durante 2 horas. Luego la muestra fue centrifugada y filtrada. El contenido de amonio de la solución se determinó a través del método del azul de indofenol utilizando un kit de Uremia (Laboratorio Wiener), utilizando como patrón una solución de sulfato de amonio.

Una vez hallado el contenido de amonio en solución, se calculó el contenido de amonio en la muestra de la siguiente manera:

$$N - NH_4 \left( \frac{gN - NH_4}{g MS} \right) = Y * \frac{V_{sol}}{V_{muestra}} * \frac{V_{extraccion}}{MS_{muestra}} \quad (3.16)$$

Donde:

$Y$ : contenido de N amoniacal en la solución de extracción, determinado por la curva de calibrado  $\left( \frac{mgN}{L} \right)$ .

$V_{sol}$ : volumen de la solución de cuantificación (L).

$V_{muestra}$ : volumen de extracto utilizado para la cuantificación (mL).

$V_{extracción}$ : volumen utilizado para la extracción (mL).

$MS_{muestra}$ : muestra utilizada en la extracción del amonio (g).

### 3.2.14. Determinación de Fosforo total

La determinación de fósforo (P) se realizó mediante el Método colorimétrico de Azul de Molibdeno (Murphy y Riley, 1962). Para la determinación de fósforo total la

muestra, por duplicado, fue previamente digerida en un medio ácido, con una mezcla de ácido nítrico y ácido clorhídrico.

*Digestión de la muestra:*

Aproximadamente 0,5 g de muestra seca al aire fueron digeridos en una mezcla de 10 mL de solución 1:5 de HCl y 4 mL de una solución 1:2 de HNO<sub>3</sub> a 90°C, durante 2,5 horas. La muestra fue alcalinizada con una solución 10M de NaOH y una solución 5N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, utilizando fenolftaleína como indicador.

*Determinación de fósforo:*

Se tomó una alícuota de la solución de digestión, se agregó 6 mL de reactivo combinado y se enrazó a 50 mL. El reactivo combinado se formuló a partir de 50 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5N, 5 mL de solución de tartrato de antimonio y potasio (0,2743 g en 100 mL), 15 mL de solución de molibdato de amonio (4 g en 100 mL), y 30 mL de una solución de ácido ascórbico (1,76 g en 100 mL). Luego de la reacción (evidenciada por la formación de un complejo de color azul marino) se determinó la transmitancia (%T) de la muestra a 880 nm. El reactivo combinado se preparó según el siguiente procedimiento: en agitación permanente se agregaron en el siguiente orden 50 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 N, 5 mL de solución de Tartrato de Antimonio y Potasio (0,2743 g en 100 mL), 15 mL de solución Molibdato de Amonio (4 g en 100 mL) y 30 mL de solución de Ácido Ascórbico (1,76 g en 100 mL). La curva de calibrado se realizó con diluciones de una solución patrón de 500 mg L<sup>-1</sup> de Fosfato monobásico de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

En función de la curva de calibrado se calculó la concentración de fósforo en la dilución y posteriormente se expresó en mg kg<sup>-1</sup>, considerando las diluciones realizadas y el peso de la muestra registrado. Los resultados se expresaron como mg P kg<sup>-1</sup> de muestra seca.

### 3.2.15. Sólidos totales (ST)

La determinación del contenido de sólidos totales consistió en la cuantificación de la masa seca de la muestra, luego de su secado a 105°C hasta peso constante. Su cálculo se realizó mediante la relación entre el peso de la muestra post secado ( $MS$ ) y el peso de la muestra inicial ( $M$ ), expresado en porcentaje (p/p):

$$ST (\%) = \frac{MS}{M} \times 100\% \quad (3.17)$$

### 3.3. Preparación del lodo

El lodo fue recolectado en las instalaciones del relleno sanitario y fue trasladado a las instalaciones del INTEC ubicado en el Parque Tecnológico del Litoral Centro (Santa Fe). Este biosólido correspondió a la corriente decantada del sedimentador, luego de ser deshidratada por geotubos durante 3 a 6 meses (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2. Sedimentador y sistemas de geotubos de deshidratación de lodo**

Dentro de las instalaciones de investigación, el biosólido fue secado al aire por 2 semanas, con volteos intermitentes para homogenizar el residuo. Posteriormente fue molido y tamizado ( $\leq 12\text{mm}$ ) y nuevamente homogenizado. Finalmente se mezcló con

suelo comercial en las proporciones correspondientes a cada tratamiento/experimento (Figura 3.3).



**Figura 3.3. (a) Lodo deshidratado por geotubos (b) mezclado de suelo y lodo deshidratado y secado al aire**

### 3.4. Contaminación artificial del sustrato

Como se indicó anteriormente, uno de los módulos experimentales estuvo orientado a evaluar los efectos en la planta y en la descontaminación, de distintas cargas contaminantes. Para ello, se plantearon distintos escenarios de contaminación de Pb, Cr y Ni, agregando diferentes cargas de estos de manera artificial, siguiendo el diseño experimental planteado.

Los reactivos que se utilizaron para contaminar con dichos elementos fueron: acetato plomo neutro  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (El-Mahrouk et al., 2019; Xiong, 1997), nitrato de cromo  $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (Khan et al., 2019), y sulfato de níquel  $\text{NiSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Eissa et al., 2011; Korzeniowska y Stanislawska-Glubiak, 2019).

El proceso de contaminación se realizó siguiendo el procedimiento descrito a continuación (Alaribe y Agamuthu, 2019; El-Mahrouk et al., 2019). Se prepararon soluciones de los distintos contaminantes en agua destilada. El suelo de cada tratamiento se contaminó pulverizando las soluciones anteriormente preparadas, en la cantidad

necesaria para aportar la carga contaminante determinada mediante el diseño experimental. Las muestras de suelo se colocaron en bolsas de polietileno de alta densidad y se dejaron reposar durante 21 días, sometiéndolas a ciclos de homogenización con agua destilada (a fin de mantener un 60% de contenido de humedad aproximadamente), secado al aire y mezcla periódica. Este procedimiento se llevó a cabo para reproducir procesos de sorción de metales en el suelo que ocurren en el ambiente y para lograr una mayor homogeneidad en las mezclas.

### **3.5. Cosecha y preparación de muestras**

Al finalizar el experimento, las plantas fueron cosechadas en laboratorio (**Figura 3.4**). Los ejemplares fueron retirados cuidadosamente de la maceta y se extrajo la mayor cantidad de suelo posible de la zona radicular para ser guardado y analizado. Las raíces fueron lavadas con agua destilada para eliminar las partículas del suelo y se secaron entre dos capas de papel para el eliminar el exceso de agua (Alaboudi et al., 2018; Martínez-Sánchez y Aguayo, 2019).

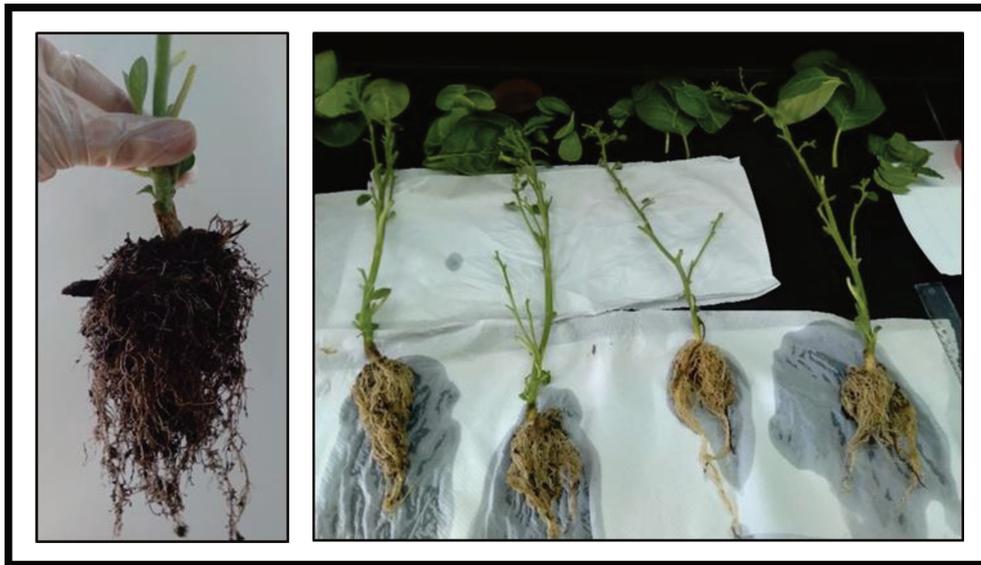
Las plantas se separaron entre raíces, tallo, hojas y flores. Se midió la longitud de la raíz principal y la altura de tallo. El peso fresco total de cada órgano se midió en forma inmediata y se separaron muestras para las distintas determinaciones posteriores.

Las muestras vegetales para determinaciones biológicas (azúcares y proteínas, pigmentos, actividades enzimáticas, etc.) fueron conservadas en ultrafreezer a -80 °C.

El resto de las muestras de tallo, hojas, raíces y flores que no fueron utilizadas, fueron secadas en estufa a 70°C hasta peso constante y se midió la materia seca.

Posteriormente se molieron y homogenizaron y se guardaron en bolsas herméticas para los análisis posteriores.

Los sustratos fueron secados al aire, molidos y tamizado por malla de 2 mm, y se guardaron en bolsas herméticas hasta su análisis.



**Figura 3.4. Imágenes del momento de la cosecha final**

## **Capítulo 4. Evaluación de la utilización del lodo como enmienda orgánica para el crecimiento de *Nicotiana glauca* L.**

### **4.1. Introducción**

Como se desarrolló en el **Capítulo 2**, en gran parte de los casos, como subproducto del tratamiento de efluentes se generan lodos o biosólidos. En los RS el principal efluente generado es el lixiviado, y los biosólidos derivados de su tratamiento (LR), que contienen gran parte de los elementos originales de este líquido, como macro y micronutrientes, materia orgánica, así como también, elementos peligrosos como metales pesados, patógenos, etc. Los biosólidos en general, pueden contener entre 1 y 11% de N y hasta 7,5% de P en peso seco. De igual manera, poseen cantidades variables de elementos esenciales para el crecimiento de las plantas, entre ellos macronutrientes como Ca, Mg, K y Na y micronutrientes como Fe, Zn, Mn y Cu que se pueden encontrar en amplios rangos dependiendo del origen (Almasi et al., 2019; Elloumi et al., 2016; Kim y Owens, 2010; Ren et al., 2015; Seleiman et al., 2020; Singh et al., 2020; Zaier et al., 2010; Zhu et al., 2013). Además, el comportamiento de estos nutrientes es diferente en comparación a los que se encuentran en fertilizantes químicos, en los lodos su liberación se produce más lentamente debido a la presencia de materia orgánica, lo que les confiere un mayor interés agronómico (Kim y Owens, 2010).

El aprovechamiento de efluentes como lixiviados y lodos para las distintas tareas de recuperación y revegetación llevadas a cabo en el propio relleno sanitario brinda la oportunidad de completar el ciclo de nutrientes como el N, devolviéndolo al ecosistema y al mismo tiempo aliviando la carga sobre las instalaciones de tratamiento. A su vez,

gracias a los potenciales procesos de fitorremediación del sistema suelo-planta, se pueden promover procesos de descontaminación de estas corrientes residuales (Cheng y Chu, 2011).

## 4.2. Objetivos

El objetivo general de este capítulo fue evaluar el uso de los lodos derivados del tratamiento de lixiviados del RS de la ciudad de Santa Fe, como enmienda orgánica. Se utilizó la especie vegetal *Nicotiana alata* L. para determinar su evolución a lo largo de su ciclo de vida y su estado fisiológico al momento de la cosecha. Por ello, este estudio se centró en analizar la evolución del crecimiento y desarrollo de la planta en un medio de cultivo con diferentes concentraciones de biosólido, las cuales fueron definidas a través de un diseño experimental de un factor. Se evaluaron varios parámetros de fenotípicos y fisiológicos utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM).

## 4.3. Metodología experimental

Este experimento se llevó a cabo en macetas de 4 L, en condiciones de invernadero. Como se describió en el capítulo de metodología, las semillas de *N. alata* fueron germinadas previamente en una mezcla de turba comercial y perlita. Cuando las plántulas alcanzaron las características necesarias para ser trasplantadas (**Capítulo 3**), se seleccionaron ejemplares homogéneos para trasplantar uno por maceta, con el sustrato correspondiente a cada tratamiento.

Se obtuvieron mezclas en diferentes concentraciones de suelo y lodo del relleno (LR), con el fin de evaluar el efecto de diferentes dosis del biosólido en el desarrollo de *N. glauca*. Las mezclas seleccionadas se definieron mediante un diseño experimental de un factor, variando la concentración de lodo entre 0 (nivel -1) y 75% en volumen (nivel +1). El dominio experimental se estableció después de realizar diferentes ensayos preliminares. Los tratamientos aplicados fueron: suelo sin lodo de relleno (T-C); 81% suelo + 19% LR (T-19%), 62% suelo + 38% LR (T-38%), 44% suelo + 56% LR (T-56%) y 25% suelo + 75% LR (T-75%). Se agregaron réplicas al diseño estadístico con el fin de obtener tres repeticiones para cada punto experimental. Además, se agregó un tratamiento idéntico al control, pero regado con la solución nutritiva de Hoagland (T-SN) (Hoagland y Arnon, 1950), que aportó macro y micronutrientes para el desarrollo de las plantas. Este tratamiento adicional se realizó para distinguir los efectos derivados de la posible falta de nutrientes del suelo utilizado.

Luego del trasplante, el experimento tuvo una duración de 4 semanas cuando la totalidad de las plantas fueron cosechadas, habiendo iniciado la etapa de floración.

Los tejidos cosechados y el suelo retirado de las macetas se conservaron adecuadamente según su destino y se realizaron distintas determinaciones siguiendo las técnicas descriptas en el **Capítulo 3**.

Los resultados de las distintas variables analizadas se presentan con el valor medio de las réplicas  $\pm$  error estándar (SE). Las respuestas se evaluaron mediante un análisis ANOVA para investigar la influencia de la enmienda LR, con un nivel de confianza del 95%. Se realizó la prueba de Tukey para identificar diferencias significativas, identificadas gráficamente a través de distintas letras (valor  $p \leq 0,05$ ) Posteriormente, se ajustó un modelo matemático mediante un análisis de regresión múltiple para describir la

dependencia entre las respuestas y el contenido de lodo (SC). El modelo general estuvo representado por un polinomio de tercer orden, a partir del cual se descartaron los términos no significativos:

$$y = \beta_0 + \beta_1 SC + \beta_2 SC^2 + \beta_3 SC^3 + \varepsilon \quad (4.1)$$

donde  $y$  es la variable dependiente (respuestas de crecimiento y bioquímicas),  $SC$  es la variable independiente,  $\beta_0$  es una constante,  $\beta_1$  es el coeficiente de regresión del efecto lineal,  $\beta_2$  es el coeficiente del término cuadrático,  $\beta_3$  es el coeficiente del efecto cúbico, y  $\varepsilon$  es el error experimental. Para identificar posibles valores atípicos, se aplicó la prueba de Cook a cada una de las variables respuestas analizadas (Montgomery, 2013; Vera Candiotti et al., 2014).

Por último, para evaluar el valor SC que mejora todas las respuestas seleccionadas, se analizó la función de deseabilidad. Esta función considera la combinación de todas las respuestas individuales al mismo tiempo y sus valores objetivos, en función de la importancia asignada a cada una de ellas (Vera Candiotti et al., 2014).

## 4.4. Resultados y discusión

### 4.4.1. Caracterización inicial del lodo

En la **Tabla 4.1** se muestra la caracterización del lodo utilizado como enmienda para la preparación de los sustratos de crecimiento, en los sucesivos muestreos que se realizaron a lo largo de 4 años de estudio (2019 a 2022).

Como se observa, existe una importante variación en el contenido de metales pesados a lo largo de los diferentes muestreos. En todos los muestreos realizados el

contenido de Cd fue menor al valor del límite de detección de la técnica (0,004 ppm), y las concentraciones de todos los metales se encontraron por debajo de los valores de referencia indicados por la Resolución 410/18 para lodos cloacales domésticos y mixtos, que establece los posibles diferentes usos del lodo (MDSyMA, 2018). Los valores medios más altos se encontraron para el Pb, Cr y Ni, correspondiéndose con lo estudiado por otros autores en los lixiviados del mismo RS (Regaldo et al., 2020).

El bajo valor de IG indicó que los LR presentaron una alta fitotoxicidad. Este hecho podría atribuirse a diversas sustancias que actúan sinérgicamente, como por ejemplo, el alto contenido de sales (Komilis y Tziouvaras, 2009; Selim et al., 2012; Varnero et al., 2007). Además, aunque el contenido en MP no supera la norma, los valores detectados podrían afectar conjuntamente a la germinación. Este hecho determinó que las plántulas fueran germinadas en un sustrato comercial, tal y como se describió anteriormente en la sección 3.1.

Es interesante destacar la presencia de nutrientes en el LR, como K, Mg, Ca, P y N, potencialmente utilizables por las especies vegetales. Singh et al. (2022) estudiaron los lodos de 26 plantas de tratamiento de aguas residuales encontrando que el contenido de nutrientes varió en los mismos entre 2,35 a 4,20% para el N, de 1,07 a 1,40% de P y entre 6,9 a 10,0 g kg<sup>-1</sup> de K. Como puede observarse en la **Tabla 4.1** el contenido de N en el lodo estudiado (3,4%) está en un valor medio de este rango y en el caso del K en el LR (25,3 g kg<sup>-1</sup>), por encima de los valores reportados por los autores. Por otro lado, en cuanto al contenido de P los valores presentes en LR, se encuentra por debajo de los valores mínimos observados por Singh et al. (2022).

En cuanto al estudio de patógenos, el contenido de coliformes totales fue inferior a 3 NMP g<sup>-1</sup> MS, y para el resto de los microorganismos no se encontraron niveles

detectables. La concentración de algunos MP encontrados en los lodos, especialmente Cr y Pb, podría explicar en parte el bajo nivel de bacterias patógenas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (Caliz et al., 2012; Fathollahi et al., 2021).

**Tabla 4.1. Caracterización del lodo**

Parámetro	Valor	Elementos potencialmente tóxicos		
		Elemento	Valor	Referencia <sup>(3)</sup>
pH <sup>(1)</sup>	4,38 ± 0,30	Cr (mg kgMS <sup>-1</sup> )	138,0 ± 38,0	1500
CE <sup>(1)</sup> (mS cm <sup>-1</sup> )	12,30 ± 3,10	Cd (mg kgMS <sup>-1</sup> )	<0,004	40
IG <sup>(1)</sup> (%)	20,40 ± 13,30	Pb (mg kgMS <sup>-1</sup> )	48,0 ± 24,0	1200
N <sup>(2)</sup> (%)	3,40 ± 0,89	Ni (mg kgMS <sup>-1</sup> )	56,0 ± 32,0	400
P <sup>(2)</sup> (%)	0,36 ± 0,05	Hg (mg kgMS <sup>-1</sup> )	1,2 ± 0,4	25
ST <sup>(2)</sup> (%)	11,68 ± 1,71	As (mg kgMS <sup>-1</sup> )	15,0 ± 7,0	75
MO <sup>(2)</sup> (%)	66,01 ± 0,41	Cu (mg kgMS <sup>-1</sup> )	20,1 ± 8,1	1750
Na (g kgMS <sup>-1</sup> )	13,6 ± 3,9	Zn (mg kgMS <sup>-1</sup> )	40,2 ± 7,3	4000
K (g kgMS <sup>-1</sup> )	25,3 ± 8,2			
Mg (g kgMS <sup>-1</sup> )	1,6 ± 0,6			
Ca (g kgMS <sup>-1</sup> )	0,7 ± 0,3			

<sup>(1)</sup> Solución 1:5 (p:v), en relación al peso seco del lodo MO: materia orgánica. ST: sólidos totales del lodo previo a su secado. MS: masa seca. <sup>(2)</sup> ST, N (Nitrógeno total de Kjeldahl), P (Fósforo total) y MO son expresados en base seca (g 100gMS<sup>-1</sup>). <sup>(3)</sup> (MDSyMA, 2018). Datos presentados como valor medio ± desvío estándar (DE), de los muestreos realizados en los periodos del 2019 al 2022 (n=5).

#### 4.4.2. Efectos del agregado de lodo al sustrato sobre los parámetros de crecimiento de *Nicotiana alata* L.

En el momento de la cosecha, el estado fenológico de las plantas era visualmente diferente entre los tratamientos de control y los enmendados con LR. La **Tabla 4.2** muestra los parámetros de crecimiento analizados en el momento de la cosecha. Las variables seleccionadas permiten evaluar la capacidad del LR para ser utilizado como enmienda orgánica, y sus posibles efectos negativos en el cultivo. En general, la aplicación de los sustratos enmendados con LR mejoró el crecimiento y desarrollo de las plantas, en comparación con el tratamiento control.

En general, respecto a los parámetros de crecimiento, los tratamientos T-38% y T-56% presentaron los mejores resultados. Las plantas que presentaron menor altura de tallo fueron las correspondientes a T-C ( $9,2 \pm 0,8$  cm), y la mayor altura se encontró en las plantas del tratamiento T-38% ( $28 \pm 1,7$  cm). El número máximo de hojas se obtuvo para el T-38% ( $8,7 \pm 1,2$ ), aunque no hubo diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, el AF total fue significativamente mayor en los tratamientos T-38% y T-56%, presentando valores de área foliar de  $263 \pm 51$  cm<sup>2</sup> y  $275 \pm 54$  cm<sup>2</sup>, respectivamente. La materia seca de planta, hoja, tallo y raíz fue mayor en las plantas cultivadas bajo el tratamiento enmendado con 38% SC y menor en el tratamiento T-C.

**Tabla 4.2. Parámetros de crecimiento de *Nicotiana glauca* L. cultivadas en los diferentes tratamientos con lodo**

	T-C	T-19%	T-38%	T-56%	T-75%
Altura de tallo (cm)	9,2 ± 0,4 c	22,8 ± 3,3 ab	28,0 ± 1,0 a	24,7 ± 0,4 ab	17,4 ± 2,4 b
Nº de hojas (n planta <sup>-1</sup> )	6,7 ± 0,3 a	7,7 ± 0,3 a	8,7 ± 0,7 a	7,7 ± 0,7 a	7,0 ± 0,6 a
AF Total (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	30 ± 4 c	163 ± 15 b	263 ± 30 ab	275 ± 31 a	190 ± 28 ab
MS de planta (g planta <sup>-1</sup> )	0,33 ± 0,02 c	1,03 ± 0,16 bc	2,21 ± 0,33 a	1,87 ± 0,26 ab	1,04 ± 0,14 bc
MS de hoja (g planta <sup>-1</sup> )	0,07 ± 0,01 c	0,35 ± 0,04 c	0,97 ± 0,17 a	0,79 ± 0,13 ab	0,48 ± 0,06 bc
MS de tallo (g planta <sup>-1</sup> )	0,07 ± 0,00, b	0,15 ± 0,02 b	0,53 ± 0,07 a	0,46 ± 0,06 a	0,20 ± 0,01 b
MS de raíces (g planta <sup>-1</sup> )	0,19 ± 0,02 c	0,50 ± 0,04 b	0,70 ± 0,05 a	0,64 ± 0,02 a	0,27 ± 0,04 c
MS de flores (g planta <sup>-1</sup> )	0,00 ± 0,00 b	0,04 ± 0,00 b	0,12 ± 0,02 a	0,10 ± 0,01 a	0,12 ± 0,02 a
CH de planta (g agua g <sup>-1</sup> )	0,83 ± 0,00 b	0,89 ± 0,01 a	0,89 ± 0,01 a	0,91 ± 0,00 a	0,92 ± 0,01 a
IT	0,86 ± 0,06 c	2,70 ± 0,41 bc	5,79 ± 0,87 a	4,89 ± 0,68 ab	2,71 ± 0,38 bc

Datos presentados como valores medios ± error estándar (n=3). Letras diferentes indican que las diferencias son estadísticamente significativas (valor  $p \leq 0,05$ ). CH: contenido hídrico, expresado en base húmeda. MS: Materia seca

Finalmente, respecto a gran parte de los parámetros estudiados las plantas cultivadas bajo el tratamiento T-SN, donde fueron regadas con solución nutritiva Hoagland (Tabla 4.3), mostraron mejores resultados que las cultivadas en T-C (regadas con agua corriente), aunque los resultados fueron en la mayoría de los casos, inferiores al resto de los tratamientos que incorporaron LR. Esto significaría que, el crecimiento mejoraría con la incorporación de LR al sustrato, incluso en comparación con la

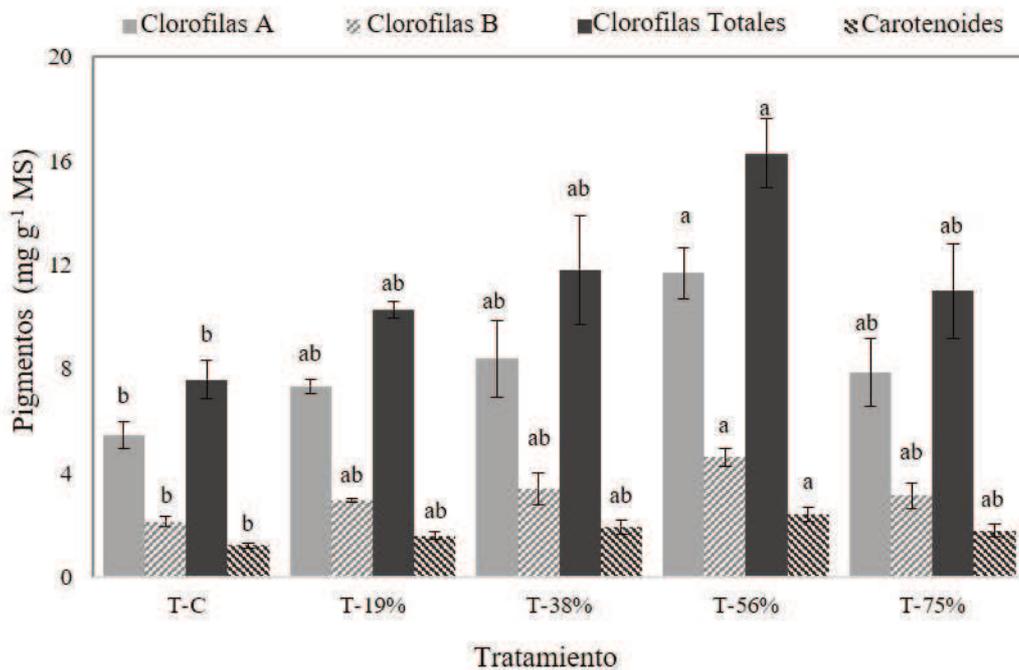
fertilización química (T-SN). Este resultado puede estar relacionado con el importante contenido de nutrientes encontrados en LR, principalmente N, junto con una mayor concentración de MO, que podría favorecer la liberación lenta de nutrientes y su disponibilidad (Kim y Owens, 2010). Como se puede observar en la **Tabla A.I.2** el contenido de materia orgánica promedio en el suelo fue del 17,5%, de N del 0,58% y de P del 0,15%. De esta forma, el agregado de LR al sustrato implicaría un aporte sustancial en estos elementos. Aunque los valores de nutrientes característicos del lodo, al igual que suele ocurrir con el resto de los fertilizantes orgánicos, se encuentran por debajo de los fertilizantes químicos (Council., 1996; Green, 2015), la principal ventaja de este tipo de fuentes alternativas de nutrientes es la posibilidad de generar una reutilización de corrientes desechables evitando así, la pérdida y confinamiento de estos elementos.

Para el cálculo del índice de tolerancia (IT) el crecimiento de las plantas en suelos enmendados se comparó con las que crecieron con suplemento artificial de nutrientes (T-SN), cuyos resultados para las distintas variables medidas se muestran más adelante en la **Tabla 4.3**. Se puede ver que los IT para todos los tratamientos suplementados con lodo dieron mayor a 1, indicando un efecto beneficioso del lodo en el crecimiento de *Nicotiana* sp., aun en comparación con el aporte adicional de nutrientes a través de la solución nutritiva.

#### **4.4.3. Efectos de los diferentes sustratos sobre los parámetros bioquímicos de *Nicotiana alata* L.**

El contenido de pigmentos fotosintéticos (**Figura 4.1**), de azúcares y proteínas solubles totales (**Figura 4.2**) fue medido a fin de evaluar los efectos del agregado de LR como enmienda, en plantas cultivadas bajo esas condiciones.

La concentración de clorofilas A, B, Totales y Carotenoides, fue mayor en los tratamientos enmendados con LR, con su máximo en el tratamiento T-56%. La tendencia fue de un incremento gradual a medida que se aumentó la dosis de lodo, a excepción del tratamiento T-75% donde se mostró una disminución en la respuesta respecto a T-56%, aunque ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa.



**Figura 4.1. Pigmentos fotosintéticos en hojas de *Nicotiana alata* L. bajo distintos niveles de enmienda con LR.**

Es ampliamente conocido que el contenido de clorofila y carotenoides está relacionado con la eficiencia de captación de luz, generando incrementos en la efectividad de la fotosíntesis neta (Jia et al., 2015). Diversos estudios han evaluado el contenido de clorofilas como respuesta fisiológica a diferentes condiciones de estrés, o como reacción positiva a mejoras en el sustrato de cultivo (Jia et al., 2015; Khan et al., 2019; Song y Lee, 2010). De acuerdo con Song y Lee (2010), nuestros resultados que reflejan una tendencia al incremento en la concentración foliar de estos pigmentos, sugerirían una

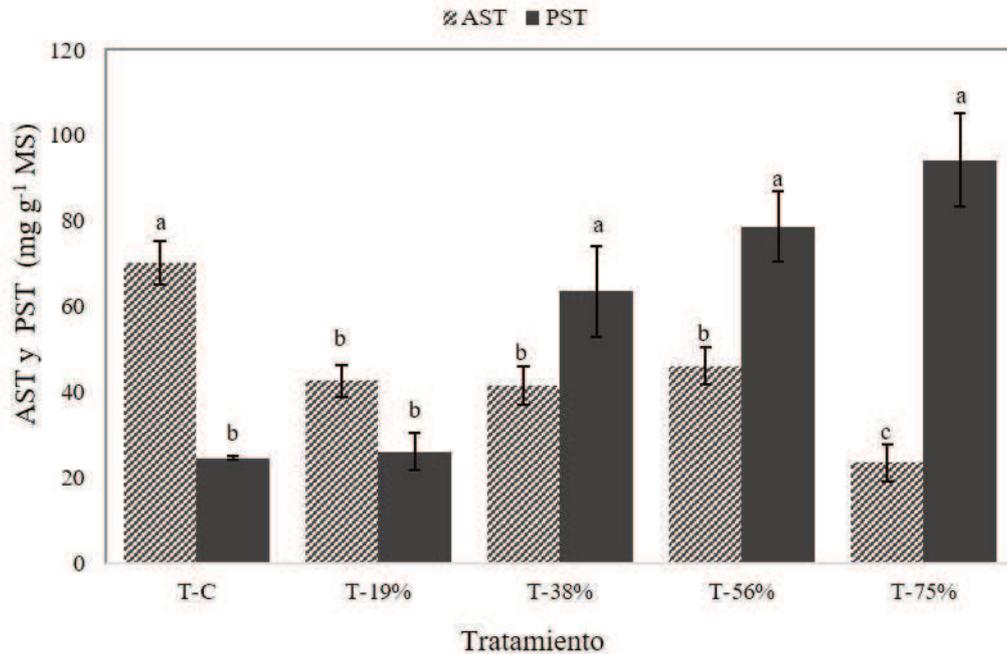
mejora en esta respuesta con la adición de LR como enmienda, aunque esta diferencia sólo es estadísticamente significativa al comparar un agregado de 56% de lodo respecto a T-C. Además, como se discutió en la sección **2.4.1**, en las plantas el nitrógeno pasa a formar parte de distintos compuestos como las proteínas, enzimas y clorofilas, entre otros (Benimeli et al., 2019). El bajo contenido de clorofilas observado en los tratamientos sin enmienda, o el incremento gradual de las mismas a medida que se incrementó la dosis de lodo en los sustratos, podría deberse a la menor o mayor disponibilidad de este elemento para conformar las estructuras de estos pigmentos, aunque las variables analizadas no serían suficientes para confirmar esta hipótesis.

En cuanto al contenido de azúcares solubles totales (AST) y proteínas solubles totales (PST) en las hojas (**Figura 4.2**), se observa un aumento gradual del valor medio de PST a medida que aumenta la concentración de LR en los sustratos. Sin embargo, esta diferencia sólo es estadísticamente significativa cuando se comparan los resultados de los tratamientos T-75%, T-56% y T-38% con los de T-19% y T-C. Esto, podría estar relacionado con el alto contenido de N presente en los lodos. Por otro lado, la aplicación de LR tuvo una influencia negativa sobre la concentración de azúcares en hojas, resultando mayor en el tratamiento control ( $70,29 \pm 8,93 \text{ mg g}^{-1} \text{ MS}$ ). Como se discutió anteriormente (sección **2.4.1**), ante la deficiencia de N la planta puede presentar un escaso desarrollo y el contenido de proteínas puede ser bajo y el de azúcares, alto, debido a que el N no alcanza a ser suficiente para combinarse con todas las cadenas carbonadas y formar proteínas (Benimeli et al., 2019). Khavari-Nejad et al. (2009) observaron un aumento en los azúcares solubles en las plantas de tomate cuando se expusieron a tratamientos deficientes de nitrógeno. Esto podría explicar la diferencia entre el contenido de AST entre T-C y los tratamientos con agregado de lodo, donde en estos últimos, la

disponibilidad de N fue mayor, el rendimiento en biomasa obtenido se incrementó y el contenido de AST disminuyó. Sin embargo, al compararse T-C contra el control suplementado con solución nutritiva (T-SN), el contenido de AST se vio incrementado, lo cual podría contradecir la hipótesis anterior, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Una posibilidad es que las plantas cultivadas en lodo, hayan podido sufrir estrés, ya sea por la presencia de metales pesados o por salinidad, provocando un aumento en la síntesis de los polisacáridos de reserva/estructurales y el incremento en la materia seca, utilizando azúcares libres para esto (Van Dyck et al., 2023). Por otro lado, el aporte de N en el lodo evidenciado en el aumento del contenido de PST, posibilitaría el incremento en la producción de biomasa.

Por otro lado, diversos estudios han reportado un incremento en los azúcares foliares cuando existían condiciones de estrés hídrico (Fiasconaro et al., 2013; Méndez, 2014). Fiasconaro et al. (2013) evaluaron el efecto de la aplicación de lodos de depuradora como enmienda en el cultivo de alfalfa. Sus resultados indicaron que la incorporación de lodos ejerció una mejora en la respuesta de la planta al estrés hídrico, mejorando su contenido hídrico y el de PST. Por otro lado, las plantas sometidas a sequía aumentaron el contenido en AST. Este efecto posiblemente estaba relacionado con la inhibición del crecimiento observada bajo el efecto del estrés. En nuestro estudio, el CH estuvo correlacionado con la dosis de lodo en los sustratos (**Tabla 4.2**), exhibiendo un mayor estado de hidratación general en las plantas correspondientes al tratamiento T-75%. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas entre los tratamientos con lodo. Un comportamiento similar se observó para la respuesta de PST (**Figura 4.2**) donde su concentración aumentó a medida que se incrementaba la dosis de lodo, aunque en este

caso los tres tratamientos con el mayor contenido de lodo sí fueron estadísticamente superiores al tratamiento con menor dosis (T-19%).



**Figura 4.2. Contenido de AST y PST en hojas bajo distintos niveles de enmienda con LR.**

Cabe destacar que, las concentraciones de PST, AST y pigmentos en las plantas cultivadas en T-SN (**Tabla 4.3**) fueron muy similares a las correspondientes a las plantas regadas con agua de canilla sin nutrición química (T-C). Estas observaciones podrían indicar que, además del suministro de nutrientes, el agregado de LR influyó en la disponibilidad de agua, afectando positivamente en variables como contenido de PST y de clorofilas.

**Tabla 4.3. Respuestas de *N. glauca* al tratamiento T-SN**

Parámetros de crecimiento		Parámetros Bioquímicos	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Altura de tallo (cm)	16 ± 0,58	Clorofilas A (mg g <sup>-1</sup> MS)	6,38 ± 0,43
Nº de hojas (n planta <sup>-1</sup> )	7,0 ± 0,6	Clorofilas B (mg g <sup>-1</sup> MS)	2,58 ± 0,25
AF Total (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	48,33 ± 2,03	Clorofilas Totales (mg g <sup>-1</sup> MS)	8,96 ± 0,68
MS Planta (g planta <sup>-1</sup> )	0,38 ± 0,07	Carotenoides (mg g <sup>-1</sup> MS)	1,33 ± 0,05
MS de hoja (g planta <sup>-1</sup> )	0,10 ± 0,00	PST (mg g <sup>-1</sup> MS)	41,60 ± 1,39
MS de tallo (g planta <sup>-1</sup> )	0,13 ± 0,01	AST (mg g <sup>-1</sup> MS)	84,17 ± 1,13
MS de raíz (g planta <sup>-1</sup> )	0,12 ± 0,02		
MS de flores (g planta <sup>-1</sup> )	0,02 ± 0,00		
CH de Planta (g H <sub>2</sub> O g <sup>-1</sup> PF)	0,88 ± 0,00		

\*Valores expresados como valor medio ± error estándar, con n=3; \*\*MS: materia seca; \*\*\*PF: Peso fresco  
AF: área foliar, CH: contenido hídrico, PST: proteínas solubles totales, AST: azúcares solubles totales.

Al momento de la cosecha, el contenido de humedad en los sustratos fue significativamente mayor en aquellos enmendados con un mayor porcentaje de lodo. Los valores obtenidos fueron (g agua g<sup>-1</sup> suelo): T-75% 0,65 ± 0,01a; T-56% 0,65 ± 0,02 a; T-38% 0,63 ± 0,02 a; T-19% 0,57 ± 0,02 b; y T-C 0,52 ± 0,01 b. Esto podría indicar que la incorporación de LR afectaría a las propiedades físicas del sustrato, mejorando la capacidad de retención de agua y evitando que la planta sufra estrés hídrico (Fiasconaro et al., 2013; Méndez, 2014). El crecimiento pudo haber sido inhibido en el tratamiento sin LR, en comparación con los enmendados, como sugieren los resultados de biomasa vegetal (Tabla 4.2). Esto podría atribuirse a una menor capacidad de retención de agua, como se discutió anteriormente, o a una menor concentración de nutrientes en comparación con los tratamientos enmendados. A su vez, estas situaciones podrían haber generado una mayor acumulación de azúcares en los tejidos, como sugieren Fiasconaro et al. (2013).

En la **Tabla 4.4** se muestran los resultados del contenido de nutrientes (N y P) en los tejidos aéreos de *N. glauca* y en los suelos de los diferentes tratamientos al finalizar el

experimento. Como puede observarse, debido al aporte de nutrientes por parte del lodo, el contenido de N y P en los sustratos de crecimiento fue mayor, y en incremento, conforme aumentaba la proporción de lodo suministrado.

En cuanto al contenido de N en los tejidos vegetales, el mismo se vio incrementado conforme aumentó el lodo en los sustratos, a excepción del tratamiento T-75%. Este comportamiento se encuentra en consonancia con otras variables, como ser el contenido de PST, en las que el nitrógeno representa un componente fundamental, el contenido de clorofilas totales y los parámetros de crecimiento en general.

Si bien no se encontraron valores de referencia para el contenido de N en *N. alata*, para el caso de *Nicotiana tabacum* L. se han informado valores de N en hoja entre 1,8 al 5% según diferentes autores (Chouteau y Fauconnier, 1993; Diez et al., 2014). Según Chouteau y Fauconnier (1993), con valores de N en hoja inferiores a 1,5%, aparecen síntomas de deficiencia. Como se observa en los resultados de la **Tabla 4.4**, este límite fue superado únicamente en los tratamientos enmendados con lodo, desde una aplicación de 38 a 75% de LR. Ambos controles (T-C y T-SN) mostraron valores ampliamente inferiores a 1,5% de N. El nitrógeno es un elemento clave en la conformación de proteínas, en la multiplicación celular, en la formación de clorofilas, en la conformación de metabolitos secundarios como alcaloides y en el crecimiento de la planta (Benimeli et al., 2019; Chouteau y Fauconnier, 1993). Esto podría explicar, como se discutió anteriormente, el crecimiento deficiente en las plantas desarrolladas en los tratamientos controles, el menor contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas, y la mejora general observada en las variables antes mencionadas, frente al incremento en la aplicación de lodo que actúa como fuente de N.

En cuanto al fósforo, su contenido en los tejidos aéreos fue superior en los tratamientos controles (T-C y T-SN) respecto a los enmendados con lodo, presentando los valores más bajos en los tratamientos con 38% y 56% de LR. Por lo tanto, si bien el contenido de P en los sustratos con lodo fue incremental a medida que su dosis aumentaba, la capacidad de extracción de este nutriente por parte de *N. alata* no tuvo el mismo comportamiento, y disminuyó en los sustratos enmendados respecto a los controles, aun cuando su concentración en el medio fuera mayor. Además, los tratamientos que mayor cantidad de P acumularon en los tejidos vegetales, fueron los que menor biomasa generaron, y viceversa. De esta forma, podría inferirse que la absorción de P no fue una limitante para el crecimiento de *N. alata* en ninguno de los tratamientos, sino que este último se encontró limitado por el aporte de N que sí tuvo una intrínseca relación con la generación de biomasa y con otros parámetros que limitan el desarrollo, como el contenido de clorofilas y proteínas solubles en hojas (Shi et al., 2023). De hecho, el N se considera como el nutriente con más influencia en el desarrollo de *N. tabacum* (Bailey, 2014), especie más estudiada del género *Nicotiana* sp.

Por otro lado, el comportamiento en la acumulación de P en los tejidos vegetales fue similar a lo sucedido en los niveles de AST en hojas, donde las plantas cultivadas en tratamientos controles exhibieron la mayor concentración de ambos. Khavari-Nejad et al. (2009) observaron que, en contraposición con lo que sucedía con el N, una deficiencia de fósforo conducía a una disminución del contenido de AST en plantas de tomate. De esta forma, otra explicación posible a la disminución del contenido de AST en las plantas cultivadas en sustratos con lodo, es que la misma podría deberse a una inhibición en la absorción del P en las plantas causada, posiblemente, por la presencia de compuestos que

podrían inducir el estrés, como metales pesados o las sales presentes en el LR (Aslani borj et al., 2022; Sharma et al., 2023).

**Tabla 4.4. Contenido de P y N en los tejidos vegetales y suelo**

	T-C	T-SN	T-19%	T-38%	T-56%	T-75%
<b>P en tejidos aéreos (mg P gMS<sup>-1</sup>)</b>	8,68 ± 0,72	9,69 ± 1,27	6,81 ± 0,69	3,55 ± 0,31	2,38 ± 0,09	4,97 ± 0,86
<b>P en suelo final (mg P gMS<sup>-1</sup>)</b>	1,21 ± 0,04	1,04 ± 0,01	1,89 ± 0,18	3,15 ± 0,18	3,54 ± 0,17	3,71 ± 0,22
<b>N en tejidos aéreos (%)</b>	0,59 ± 0,06	0,66 ± 0,11	1,13 ± 0,15	1,69 ± 0,13	1,91 ± 0,06	1,76 ± 0,12
<b>N en suelo final (%)</b>	0,47 ± 0,02	0,48 ± 0,01	0,99 ± 0,04	1,71 ± 0,03	2,08 ± 0,06	2,6 ± 0,04

\*Los valores corresponden al valor medio de las muestras unificadas ± error estándar, con n=2

#### 4.4.4. Análisis estadístico, modelos de variación y optimización de las respuestas

Una vez obtenido el conjunto de datos, se aplicó un análisis ANOVA para evaluar las contribuciones individuales de cada término del modelo para las variables seleccionadas. Estas respuestas fueron MS de planta, CH de planta, CH de suelo, altura de tallo, AF total, clorofilas totales, PST y AST. El modelo ajustado para cada variable fue el resultado de una reducción del modelo general de tercer orden, descartando aquellos términos que no resultaron significativos (valor  $p > 0,05$ ).

La **Tabla 4.5** muestra los resultados de los modelos matemáticos ajustados para cada respuesta, junto con los parámetros estadísticos de la significancia del modelo (valor  $p$ ), la falta de ajuste, y los valores de  $R^2$  y  $R^2$  ajustado. Como se puede observar, sólo para el caso de AST se encontró que todos los términos del modelo general eran significativos, ajustando un modelo polinómico de tercer orden. En el caso de la MS de la planta, CH de la planta, CH del suelo, altura del tallo, AF total y clorofilas totales, el modelo ajustado fue una función polinómica de segundo orden. En el caso del PST, ni los términos de segundo ni de tercer orden fueron significativos, ajustándose un modelo lineal.

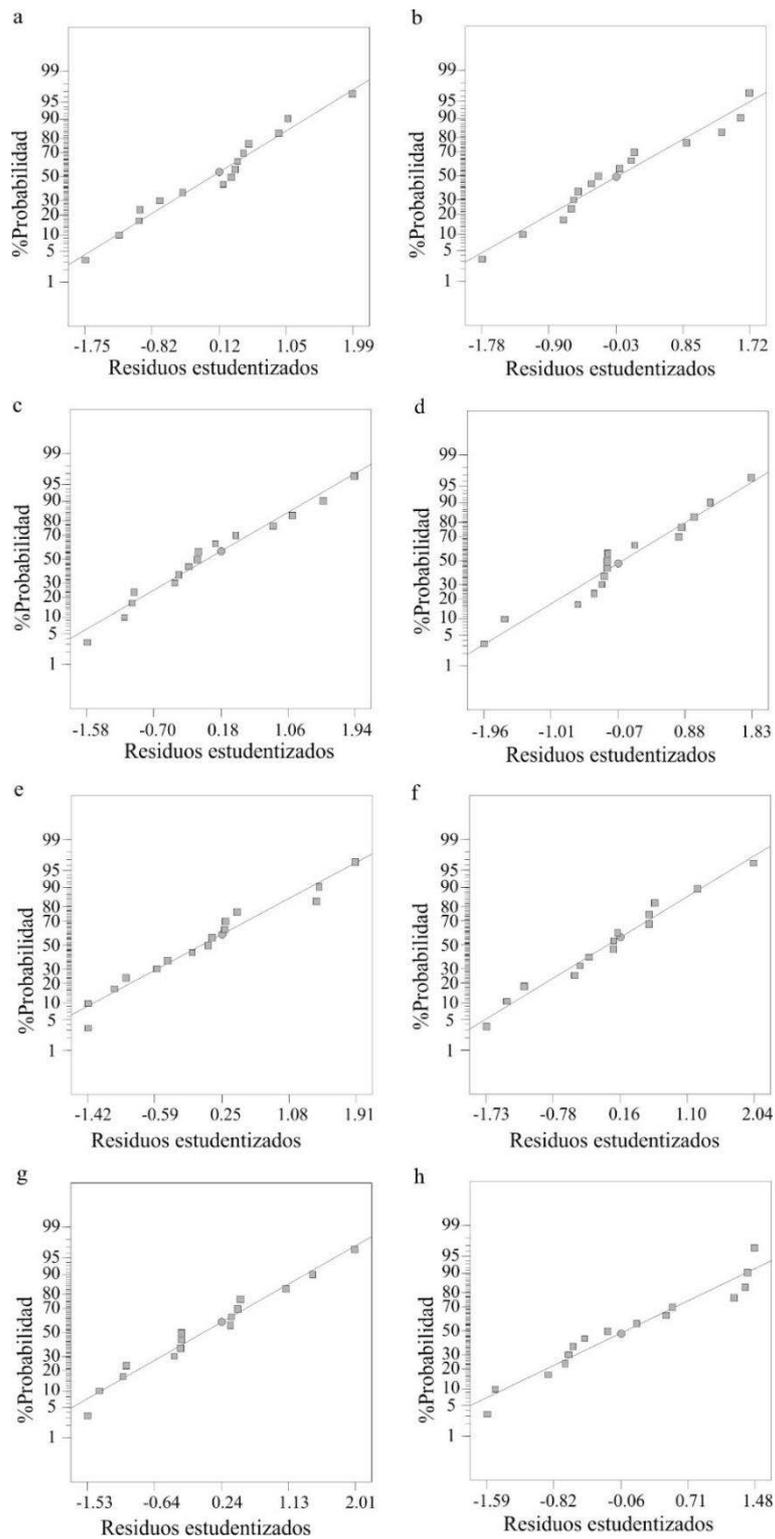
**Tabla 4.5. Modelos estadísticos ajustados para las variables seleccionadas**

Respuesta	Modelo	valor <i>p</i> del modelo	Falta de ajuste	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado
MS Planta	$Y = 0,187 + 0,082 SC - 9,35 \times 10^{-4} SC^2$	0,0002	0,1329	0,75	0,71
CH Planta	$Y = 0,837 + 2,28 \times 10^{-3} SC - 1,55 \times 10^{-5} SC^2$	< 0,0001	0,1634	0,87	0,84
CH Suelo	$Y = 0,518 + 3,74 \times 10^{-3} SC - 2,57 \times 10^{-5} SC^2$	< 0,0001	0,5539	0,85	0,83
Altura de tallo	$Y = 9,551 + 0,866 SC - 0,0103 SC^2$	< 0,0001	0,7370	0,85	0,82
AF Total	$Y = 22,744 + 10,288 SC - 0,106 SC^2$	< 0,0001	0,6930	0,86	0,84
Clorofilas totales	$Y = 7,148 + 0,225 SC - 1,804 \times 10^{-3} SC^2$	0,0074	0,1480	0,59	0,51
PST	$Y = 19,066 + 1,0237 SC$	< 0,0001	0,3742	0,81	0,80
AST	$Y = 70,476 - 2,776 SC + 0,0796 SC^2 - 6,79 \times 10^{-4} SC^3$	< 0,0001	0,7356	0,85	0,81

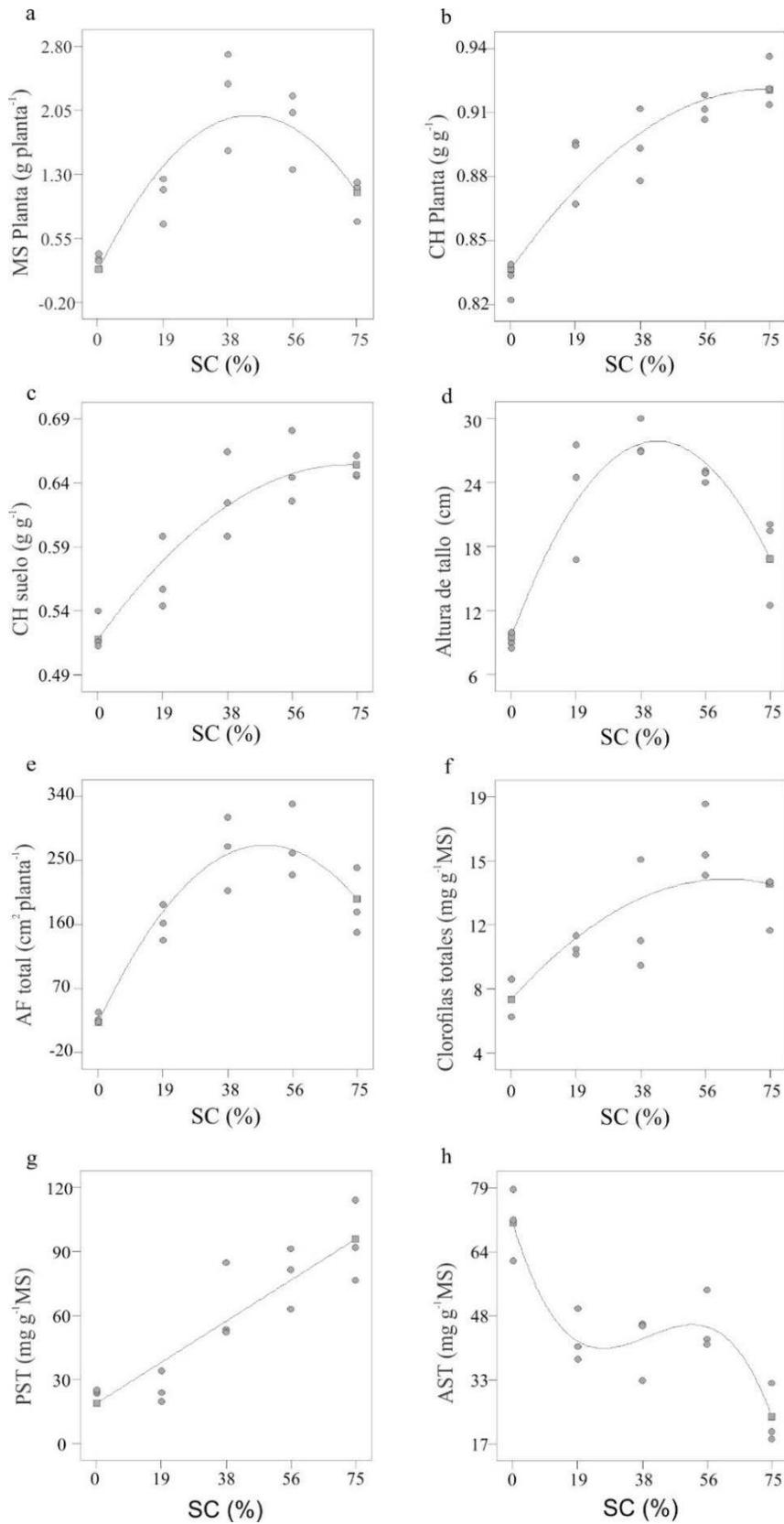
\*SC: contenido de lodo

La hipótesis de normalidad fue corroborada para todas las variables ajustadas (**Figura 4.3**). Como resultado de aplicar el test de Cook, una sola réplica del tratamiento T-75% fue identificado como outlier o valor atípico, el cual no se tuvo en cuenta para el ajuste del modelo (Vera Candiotti et al., 2014). Además, como se observa en la **Tabla 4.5**, el valor *p* fue inferior a 0,05 en todos los casos y la falta de ajuste no fue significativa en ninguno de los modelos. Además, los valores R<sup>2</sup> y R<sup>2</sup> ajustados fueron aceptables y concordantes entre sí, excepto para el modelo que describe las clorofilas totales (R<sup>2</sup>= 0,59). Estos resultados indican que los modelos construidos son, en forma general, apropiados para describir la tendencia de cada variable en los experimentos realizados.

La expresión gráfica de los modelos se representa en la **Figura 4.4**, junto con los puntos experimentales. Como primera observación, y en concordancia con los resultados del análisis de ANOVA, podría decirse que el contenido de lodo en los sustratos (SC) influyó significativamente en casi todas las variables estudiadas. De forma general, las respuestas exhibieron comportamientos cuadráticos. La pendiente de la curva era positiva a medida que aumentaba la SC, hasta hacerse nula en el punto en que la variable estudiada alcanzaba un máximo, y luego tomaba valores negativos una vez superado el umbral mencionado. Este comportamiento general difiere profundamente para el caso de la AST y la PST (**Figura 4.4 g y h**), como se ha indicado anteriormente.



**Figura 4.3. Gráficas de distribución normal de los residuos de las variables: a) MS planta, b) CH planta, c) CH suelo, d) Altura de tallo, e) AF Total, f) Clorofilas totales, g) PST y h) AST.**



**Figura 4.4. Modelos ajustados y puntos experimentales de las variables: a) MS Planta, b) CH Planta c) CH Suelo d) Altura de tallo e) AF Total f) Clorofilas Totales, g) PST y h) AST.**

Con el fin de encontrar la dosis óptima de enmienda para el crecimiento de *N. glauca*, en las condiciones estudiadas, se evaluó la función de deseabilidad. El objetivo fue mejorar los parámetros seleccionados dentro del dominio experimental estudiado. La función de deseabilidad intenta proporcionar el mejor valor dentro de una relación de compromiso, que satisfaga conjuntamente las respuestas de interés. El resultado de este análisis, junto con las respuestas estimadas, puede verse en la **Tabla 4.6**.

**Tabla 4.6. Resultados del análisis de optimización para la aplicación de lodo**

SC (%)	MS Planta (g planta <sup>-1</sup> )	*CH Planta (g g <sup>-1</sup> )	*CH Suelo (g g <sup>-1</sup> )	Altura de tallo (cm)	AF total (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )	Clorofilas totales (mg g <sup>-1</sup> MS)	PST (mg g <sup>-1</sup> MS)	AST (mg g <sup>-1</sup> MS)
53	1,91	0,91	0,64	26,5	270	14,0	73,3	47,2

\*CH expresados en base húmeda. MS: Masa seca

Como puede observarse, el valor óptimo como dosis de lodo, fue cercano al punto experimental del tratamiento T-56%, exactamente a un SC del 53% en volumen. Esta dosis es equivalente a una aplicación de LR a razón de 42 kg m<sup>-2</sup> (base seca), teniendo en cuenta el área de la maceta, la densidad y el contenido en materia seca de los lodos de las condiciones experimentales.

## 4.5. Conclusiones

La aplicación del lodo como enmienda orgánica mejoró los parámetros de crecimiento evaluados como la masa seca total, el área foliar de la planta, y respuestas bioquímicas como el contenido proteínas y de pigmentos fotosintéticos, aunque para estas últimas, las diferencias no fueron siempre estadísticamente significativas. Esta mejora general se expresó a través de un alto índice de tolerancia para cada tratamiento enmendado, con valores notablemente mayores en los tratamientos T-38% y T-56%.

Las variables estudiadas han reportado una dependencia estadísticamente significativa con SC, y los modelos matemáticos han sido desarrollados y ajustados usando RSM. Mediante un análisis de deseabilidad se estimó la dosis óptima del lodo en las condiciones estudiadas en un valor de SC=53%, correspondiente a una tasa de aplicación de LR de 42 kg m<sup>-2</sup> (base seca).

Los lodos estudiados resultan de interés por su importante contenido en nutrientes que, en presencia de metales pesados, podrían favorecer y mejorar su fitoextracción. Sin embargo, debido al riesgo potencial de contaminación por MP presentes en el residuo, el uso de estos lodos sólo se recomienda dentro del vertedero, como material de cobertura y en actividades de revegetación.

Es necesario tener en cuenta que este trabajo de investigación se realizó en condiciones de invernadero. El LR utilizado se deshidrató en las instalaciones del vertedero, sin tratamiento de estabilización. En el futuro, podría ser adecuado el estudio de la aplicación de los lodos en condiciones de campo y la incorporación de pretratamientos, como el compostaje. Debido a la alta variabilidad de las características de LS, el estudio del potencial fitorremediador de *N. glauca* bajo diferentes concentraciones de MP, así como su distribución en los órganos de la planta, podría considerarse una perspectiva de futuro. De esta forma, se podría concluir que los lodos de lixiviados pueden representar una fuente alternativa de fertilizantes para los suelos utilizados en el cierre de vertederos sanitarios.

## **Capítulo 5. Experimento de fitorremediación de lodos bajo distintas cargas contaminantes de metales pesados**

### **5.1. Introducción**

Como se discutió anteriormente, el lixiviado producido en los rellenos sanitarios es una mezcla compleja de varios contaminantes, como sales inorgánicas, compuestos orgánicos (en el que los compuestos húmicos constituyen un grupo mayoritario), nutrientes y metales pesados (Arunbabu et al., 2017; Costa et al., 2019; Wang et al., 2018). Una parte importante de estos compuestos, como los MP, pueden estar presentes y adheridos en el material particulado (Jones et al., 2006) y por ende, terminan siendo partes de la composición de los lodos derivados de su tratamiento. A su vez, la calidad de los lixiviados y el lodo generado es específica del sitio en particular y presenta gran variabilidad dependiendo de factores como la composición de los desechos, los procesos biológicos y químicos que se producen durante la degradación, el contenido de humedad, las precipitaciones, el clima local, etc. (Arunbabu et al., 2017; Jones et al., 2006).

Por todo esto, cuando se plantea la reutilización de estos lodos con el fin de mejorar las propiedades del suelo, en este caso utilizado como material de cobertura, se debe tener cuenta que además de los nutrientes y materia orgánica, se está aportando diferentes contaminantes, como MP en distintas concentraciones.

En este contexto, la implementación conjunta del agregado de enmiendas de lodo, con técnicas de fitorremediación que promueva la recuperación de las propiedades del suelo mientras se induce a la re-vegetación, puede ser adecuada para la restauración integral de sitios altamente intervenidos y alterados como los rellenos sanitarios.

*Nicotiana glauca* L. ha sido estudiada en los últimos años como potencial fitorremediadora de metales pesados (Khan et al., 2020b, 2019). Sin embargo, estos estudios evalúan la extracción y estabilización de MP en situaciones de hidroponía o en la remoción de los MP presentes en efluentes sintéticos. Los experimentos hidropónicos no logran reproducir la interacción de los metales con la matriz del suelo y a menudo se usan tratamientos de dosis altas poco realistas, lo que puede dar lugar a afirmaciones falsas de eficiencia de descontaminación y de clasificación de especies como hiperacumuladoras (van der Ent et al., 2013). Por ejemplo, Maxted et al. (2007) informa que la remoción en suelo de Cd por *T. caerulescens* es de 1 a 2 órdenes de magnitud menor que cuando se evalúan en solución de cultivo.

Por otro lado, muchos estudios de evaluación de especies fitoextractoras, se basan en situaciones de contaminación por un solo metal, sin tener en cuenta la influencia que puede ejercer la presencia de uno o más MP en conjunto. Zhang et al. (2020) sostienen que gran parte de los fracasos en la aplicación de esta tecnología se debe al estrés conjunto de la presencia de varios metales pesados y posibles contaminantes orgánicos. Estas posibles interacciones, tienen influencia en la generación de biomasa, en la absorción y translocación de metales, en la población y actividad microbiana, etc. (Zhang et al., 2020).

En estudios previos ya descritos en el **Capítulo 4**, se evaluó la aplicación de los lodos derivados del tratamiento de lixiviados como enmienda para el crecimiento de *N. glauca*, encontrándose que su aplicación como fuente de nutrientes y mejorador de suelos era factible (Abrile et al., 2021).

## 5.2. Objetivos

El objetivo de este capítulo fue evaluar la influencia de distintos niveles de contaminación por MP en la eficiencia de fitoextracción y los parámetros de crecimiento y desarrollo de las plantas de *N. alata*. El suelo enmendado con lodo se contaminó de forma artificial, mediante el agregado de diferentes concentraciones de Pb, Cr y Ni, definidas a partir de un diseño experimental tipo Box-Behnken. Se determinaron distintos parámetros fenológicos y fisiológicos, la concentración de MP en los tejidos vegetales, y se calcularon variables que permiten inferir sobre la eficiencia de fitoextracción de la planta. A través de diferentes herramientas estadísticas se buscó inferir sobre la relación entre las distintas respuestas y las variables del sistema (MP en suelos).

Por otro lado, se buscó evaluar la evolución del crecimiento y extracción de metales pesados en el tiempo, repitiendo los ensayos experimentales a “valores medios”.

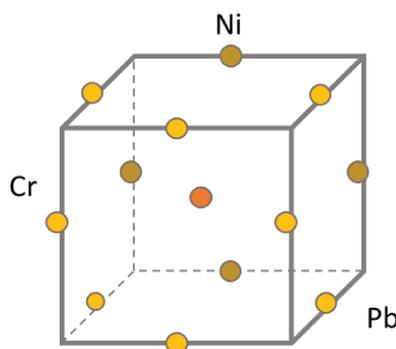
## 5.3. Metodología experimental

### 5.3.1. Configuración del diseño experimental

El diseño experimental se proyectó con el objetivo de evaluar las distintas respuestas para diferentes niveles de contaminación por MP (Ni, Cr y Pb). Para su diseño se utilizaron como niveles extremos una cantidad a agregar de 0 a 300 mg kg<sup>-1</sup> de cada metal, valores establecidos en función de considerar, de mínima, la variabilidad observada en el contenido de estos metales a lo largo de los distintos muestreos realizados del lodo. Se aplicó una concentración constante de lodo (a fin de no aportar variabilidad sobre este factor), y se generó un diseño experimental tipo Box–Behnken con 3 niveles,

correspondientes al agregado de Pb, Cr y Ni, con 3 réplicas del punto central. Los diseños de Box-Behnken son diseños de segundo orden y permiten estudiar los efectos lineales de cada factor, los efectos de interacción y cuadráticos. No tienen puntos experimentales en las combinaciones extremas de todos los factores, pero lo compensa al tener una mejor precisión de predicción en el centro del espacio de factores y se distingue por ser eficiente en el número de puntos experimentales (Gutierrez Pulido y de la Vara Salazar, 2012).

De esta forma, el diseño experimental implementado puede graficarse en forma resumida de la siguiente manera (**Figura 5.1**):



**Figura 5.1. Diseño experimental Box-Behnken**

En la **Tabla 5.1** se muestran los detalles de cada tratamiento que conforma el diseño experimental a explorar. Además, se agregaron 3 controles, con el fin de evaluar la incidencia de distintas componentes del sistema (lodo, planta, agregado de MP).

**Tabla 5.1.** Descripción de los diferentes tratamientos

Nombre Tratamiento	Pb agregado (mg Kg <sup>-1</sup> )	Cr agregado (mg Kg <sup>-1</sup> )	Ni agregado (mg Kg <sup>-1</sup> )	T: TIERRA; L: LODO; C: CONTAMINADO; P: PLANTA
A	150	150	150	T+L+C+P
B	150	0	0	T+L+C+P
C	0	150	0	T+L+C+P
D	0	0	150	T+L+C+P
E	300	150	0	T+L+C+P
F	300	150	300	T+L+C+P
G	300	0	150	T+L+C+P
H	300	300	150	T+L+C+P
I	150	0	300	T+L+C+P
J	150	300	0	T+L+C+P
K	150	300	300	T+L+C+P
L	0	150	300	T+L+C+P
M	0	300	150	T+L+C+P
<b>Tratamientos controles:</b>				
N	0	0	0	T+P
O	0	0	0	T+L+P
P	150	150	150	T+C+P

Con el fin de evaluar la evolución en el tiempo del proceso de crecimiento vegetal y extracción de metales pesados, se agregaron réplicas del tratamiento del punto central “A” (contaminación con un agregado de Pb, Cr y Ni de 150 mg kg<sup>-1</sup> cada uno) de la experiencia anterior. Un esquema similar se aplicó para el tratamiento P (suelo sin enmienda, con el mismo agregado de MP que en el tratamiento A), utilizado como control para determinar la influencia del agregado de lodo.

### 5.3.2. Desarrollo experimental

El lodo fue recolectado en el relleno sanitario y trasladado a las instalaciones del INTEC ubicado en el CCT CONICET Santa Fe. El biosólido en estudio correspondió al producto de la sedimentación de los lixiviados tratados biológicamente y deshidratados en geotubos durante 3 a 6 meses. Este proceso fue realizado en las instalaciones del RS.

Ya en las instalaciones del INTEC, el biosólido fue secado al aire por 2 semanas, con volteos intermitentes para homogeneizarlo. Posteriormente fue molido y tamizado ( $\leq 12\text{mm}$ ) y nuevamente homogeneizado. Finalmente, se mezcló con la tierra comercial en una proporción de 20% de lodo y 80% de tierra (v/v).

El sustrato de cada tratamiento se contaminó con Pb, Cr y Ni según las concentraciones establecidas por el diseño experimental propuesto (**Tabla 5.1**). Primero, tanto el lodo como la tierra a utilizar se homogenizaron mediante su mezclado manual. Luego, se formuló la mezcla de lodo y tierra para todos los sustratos que serían aplicados con estas componentes en conjunto (tratamientos A-M y O), separando de la mezcla homogénea la cantidad necesaria para cada tratamiento (aproximadamente 14 kg para el tratamiento central, y 2 kg para los otros tratamientos). Se tomaron muestras y se determinó el contenido de humedad (%H) y sólidos totales (%ST) mediante su secado a 105 °C hasta peso constante. Las cantidades de cada reactivo necesarias a agregar para aportar la carga contaminante (de Pb, Cr y Ni) establecida mediante el diseño experimental, se calcularon en función de la cantidad de suelo a contaminar por tratamiento y de su contenido de sólidos totales, tal como se expresa en la siguiente ecuación:

$$C_{R,i} = M_s \times \frac{\%ST}{100} \times C_i \times \frac{PM_{R,i}}{PM_i} \times Nmoles_{i,R}$$

$C_{R,i}$ : Cantidad (en mg) de reactivo del metal  $i$  (con  $i=\text{Pb, Cr o Ni}$ ) a agregar a la cantidad de sustrato por contaminar.

$M_s$ : Cantidad (en kg) de sustrato por contaminar. Resulta del pesaje exacto de sustrato separado para cada tratamiento, que incluye el uso en las macetas (0,5 kg aproximado por cada una) y un sobrestimado para muestras e imprevistos.

$\%ST$ : Contenido de sólidos totales del sustrato al momento de la contaminación (kg de MS  $\text{kg}^{-1}$ , con MS: masa seca).

$C_i$ : Concentración del metal  $i$ , a la que se espera llegar según el diseño experimental ( $\text{mg } i \text{ kgMS}^{-1}$ ).

$PM_{R,i}$ : Peso molecular del reactivo utilizado para la contaminación por el metal  $i$ .

$PM_i$ : Peso molecular del metal  $i$ .

$Nmoles_{i,R}$ : Número de moles del metal  $i$  por cada mol del reactivo utilizado para su agregado.

Las muestras de suelo de cada tratamiento se colocaron en bolsas de polietileno de alta densidad. La masa de reactivo calculada para cada tratamiento se disolvió en agua destilada y se pulverizó sobre el sustrato dentro de las bolsas para evitar pérdidas. El envase donde se disolvió cada metal fue lavado repetidamente para remover el excedente de la solución, dispensándola en los sustratos correspondientes. Las mezclas se dejaron reposar durante 21 días, sometiéndolas a ciclos de homogenización con agua destilada (a fin de mantener un 60% de contenido de humedad aproximadamente), secado al aire y mezcla periódica. Este procedimiento se llevó a cabo para reproducir procesos de sorción de metales en el suelo que ocurren en el ambiente y lograr una mayor homogeneidad en las mezclas.

Las semillas de *N. alata* fueron sembradas y germinadas en semilleros, regadas con agua corriente regularmente y con solución nutritiva Hoagland una vez a la semana. Cuando las plántulas alcanzaron las condiciones establecidas para ser trasplantadas, se seleccionaron ejemplares homogéneos que se dispusieron en las macetas con los sustratos correspondientes a cada tratamiento, según el experimento. En cada maceta se colocó un

único ejemplar de la especie seleccionada, *N. alata*. Se recolectaron y guardaron muestras iniciales de cada tratamiento para su posterior análisis.

La finalización del experimento de contaminación bajo diferentes niveles de MP, se consideró cuando las plantas alcanzaron el estadio de floración, lo que correspondió al día 58 desde el trasplante. En ese momento fueron cosechadas y los diferentes órganos (hoja, tallo, flores y raíces) fueron separados y almacenados en condiciones apropiadas hasta realizar las determinaciones correspondientes.

Sobre el material cosechado, se realizaron distintas determinaciones para evaluar su crecimiento y desarrollo, estado de la planta y síntomas de estrés (Nº de hojas, Peso fresco y seco de los distintos tejidos, aérea foliar, altura, longitud de raíz, pigmentos fotosintéticos, actividades enzimáticas, contenido de malondialdehído (MDA), azúcares y proteínas solubles totales), y otras en referencia a su capacidad de extracción de metales pesados (contenido de MP en tejidos aéreos y en raíces).

En cuanto a las plantas destinadas a estudiar el proceso en el tiempo, se procedió de forma similar a lo descrito en los párrafos anteriores (y en la **sección 3.5.**), sólo que en este caso se realizaron sucesivas cosechas, determinando únicamente la biomasa vegetal y la concentración de MP en sus tejidos. Se cosecharon ejemplares, sin importar su estadio fenológico, a los días 0, 14, 26, 40, 58 (ejemplares del experimento anterior) y 85 desde el trasplante de las plántulas de *N. alata* desde los semilleros a los sustratos, superando el tiempo de la cosecha final del ensayo anterior. La cosecha y tratamiento de las muestras se llevaron a cabo de la forma descrita anteriormente en el **Capítulo 3**. El tratamiento P (suelo sin enmienda, con el mismo agregado de MP que en el tratamiento A) se utilizó como control para determinar la influencia del agregado de lodo, y en este caso se realizó una menor cantidad de muestreos, a los días 0, 26 y 58.

### 5.3.3. Factores de translocación, bioconcentración y extracción neta de metales en los tejidos aéreos

La eficiencia de la fitoextracción se suele cuantificar calculando el factor de bioconcentración (FBC) y el factor de translocación (FT) (Alaribe y Agamuthu, 2015; Almasi et al., 2019; Pedron et al., 2017). Las expresiones correspondientes pueden representarse por las siguientes ecuaciones:

$$\text{Factor de bioconcentración: } FBC = \frac{C_{planta,i}}{C_{suelo,i}} \quad (5.1)$$

$$\text{Factor de translocación: } FT = \frac{C_{aereos,i}}{C_{raiz,i}} \quad (5.2)$$

Donde  $C_{planta,i}$ , es la concentración del metal “i” en la planta cosechada,  $C_{suelo,i}$  es la concentración del metal en el suelo, y  $C_{aereos,i}$  es la concentración en los tejidos aéreos de la planta.

Luo et al. (2020) además calcula el factor de extracción total de metales:

$$FE = C_{planta,i} \times MS_{planta} \quad (5.3)$$

Donde  $MS_{planta}$  es el peso seco de los tejidos vegetales. Si se pretende evaluar sólo la cantidad de metal extraído en los tejidos aéreos, que representa la parte fácilmente cosechable de la planta, la expresión correspondiente resulta:

$$MP, i \text{ extraido } \left( \frac{\mu g \text{ } MP, i}{\text{planta}} \right) = C_{aereos,i} \times MS_{aerea} \quad (5.4)$$

Donde  $MS_{aerea}$ : Masa seca aérea de la planta

#### 5.3.4. Análisis estadísticos

Para evaluar la influencia de los distintos niveles de metales de los tratamientos enmendados con lodo en las diferentes respuestas, se aplicó un análisis con modelos lineales generalizados (MLG) con tres factores ( $Pb_{\text{suelo}}$ ,  $Cr_{\text{suelo}}$  y  $Ni_{\text{suelo}}$ ), y las diferencias entre los distintos tratamientos se evaluaron mediante comparaciones múltiples por pareja, a partir de la media estimada. Se utilizó un nivel de confianza del 95%, haciendo una corrección por el método Bonferroni, que permite corregir el nivel de significancia observado considerando que se están poniendo a prueba múltiples contrastes (IBM, 2021). Los tratamientos pertenecientes a grupos estadísticamente diferentes se identificaron con distintas letras.

Por otro lado, los resultados de los tratamientos incorporados como controles (N, O y P) se compararon con los del tratamiento central (A) a fin de observar la influencia del agregado de lodo y MP, en las distintas respuestas evaluadas. A fin de establecer comparaciones entre estos tratamientos, se aplicó una prueba de ANOVA con un 95% de confianza, y se aplicó el test de Tukey con el objetivo de evaluar si las diferencias entre estos tratamientos resultaban estadísticamente significativas.

#### 5.4. Resultados y discusión

En la **Figura 5.2** se pueden observar diferentes momentos en el crecimiento de *N. alata*, y en la **Figura 5.3** se muestran las imágenes de algunos ejemplares del experimento al momento de la cosecha.

El contenido de metales (Pb, Cr y Ni) en los diferentes sustratos varió, aproximadamente, entre 30 a 340 mg kg<sup>-1</sup> de Pb, entre 60 a 360 mg kg<sup>-1</sup> de Cr y desde 20

a  $330 \text{ mg kg}^{-1}$  de Ni. Estos valores se muestran en el Anexo I (**Tabla A.I.1.**) y estuvieron condicionados por el agregado de MP más las cargas preexistentes en cada uno de sus componentes (resultando para este ensayo,  $13,1 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb,  $146,6 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cr y  $50,8 \text{ mg kg}^{-1}$  Ni en lodo, y  $44,4 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb,  $22,7$  de Cr y  $14,1 \text{ mg kg}^{-1}$  de Ni en el suelo utilizado).

Los resultados obtenidos de la experiencia en general se muestran como el valor medio  $\pm$  el error estándar.



Figura 5.2. Imágenes de diferentes instancias en el crecimiento de las plantas de *N. alata*



Figura 5.3. Imágenes de plantas de *N. alata* previo a la cosecha

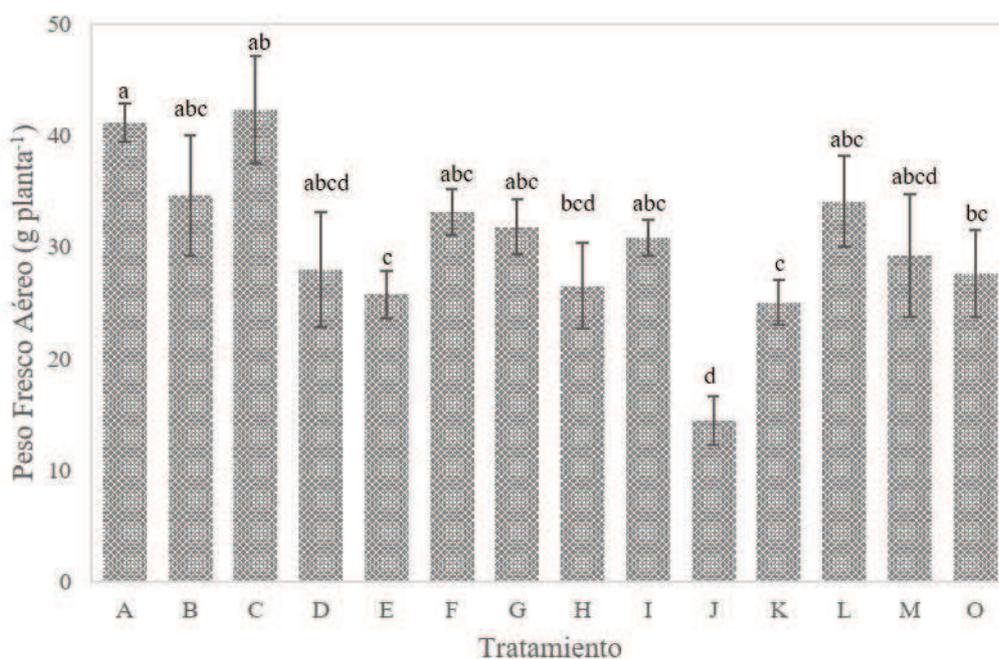
#### 5.4.1. Efectos de los distintos tratamientos en las respuestas de crecimiento y bioquímicas de *Nicotiana alata* L.

En la **Tabla 5.2** se muestran los resultados de las respuestas de crecimiento de las plantas correspondientes a los distintos tratamientos al momento de la cosecha. Se incluyen además los tratamientos controles que fueron incorporados a la experiencia, sin contaminación por metales en forma artificial (O), sin contaminación y sin enmienda de lodo (N) y contaminado de forma idéntica al punto central (agregado de  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de cada metal) pero sin enmienda (P). Los valores más altos de biomasa total generada se encontraron para los tratamientos A y C, que exhibieron valores por encima de los  $50 \text{ g planta}^{-1}$  para el tiempo de desarrollo considerado.

Por otro lado, en la **Tabla 5.3** se exponen los resultados para las diferentes variables bioquímicas medidas en las plantas. Dichas variables podrían explicar mejor cómo influye en *N. alata* la presencia de estos contaminantes en los sustratos.

La **Figura 5.4** muestra los resultados correspondientes a la biomasa aérea generada por las plantas de *N. alata*, en los tratamientos enmendados con LR bajo diferentes niveles de contaminación. En conjunto se calculó el índice de tolerancia (IT) para cada uno de los tratamientos (**Figura 5.5**), a fin de evaluar la influencia de la contaminación por MP

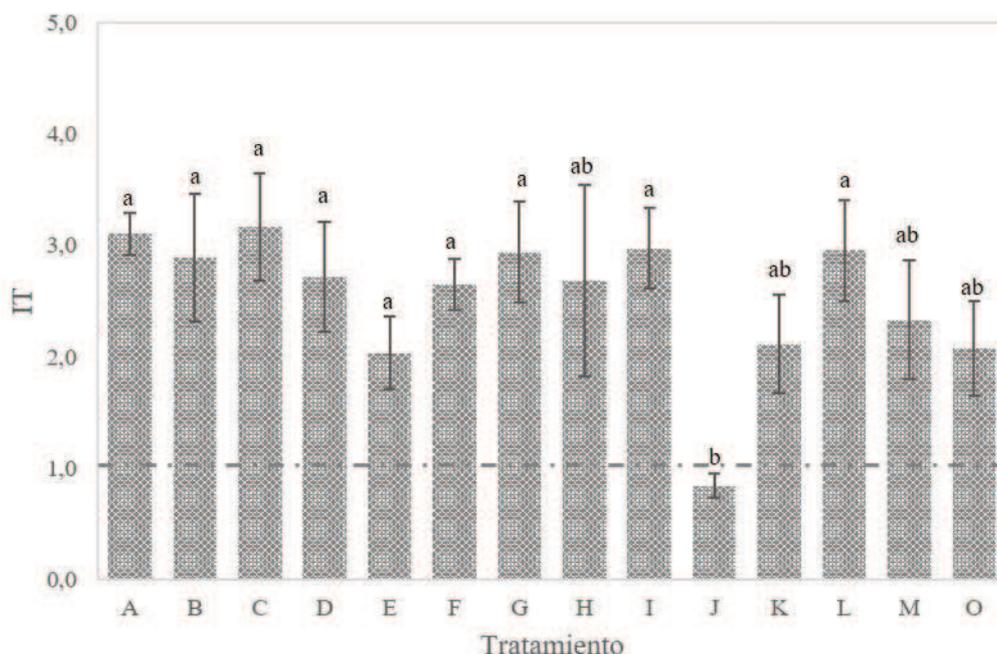
en los efectos del lodo en el crecimiento de las plantas. Como primera observación puede destacarse que la desviación en los resultados para cada tratamiento fue en general, alta. La menor generación de biomasa aérea se halló para el tratamiento J (agregados de Pb=150, Cr=300 y Ni=0 mg kg<sup>-1</sup>), la cual presentó diferencias estadísticamente significativas con todos los tratamientos, a excepción de D, H y M. Luego, los tratamientos que siguen en menor generación de biomasa aérea E y K, ambos estadísticamente inferiores (valor  $p < 0,05$ ) a los tratamientos de mayor crecimiento (A y C).



**Figura 5.4. Peso fresco de tejidos de la parte aérea de *Nicotiana glauca* L. en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni**

Como se discutió anteriormente, un índice de tolerancia (IT) menor a 1 expresa un efecto negativo del sustrato respecto al control, mientras que si  $IT > 1$ , la influencia ejercida en el crecimiento vegetal podría considerarse positiva. En la **Figura 5.5** se muestran los resultados de IT para todos los tratamientos enmendados con lodo, los que

fueron calculados como el cociente entre su biomasa y la del control sin enmienda (tratamiento N). Como primera observación se puede decir que, en principio, el agregado de lodo generó efectos positivos sobre el crecimiento para todos los tratamientos (con valores por sobre la línea de  $IT=1$ ), excepto para J. El nivel de contaminación por MP no evidenció efectos estadísticamente significativos en los tratamientos enmendados, con la excepción del caso particular del tratamiento J, donde no sólo el valor de IT fue diferente a la mayoría del resto de los tratamientos, sino que tomó un valor menor a 1. Cabe resaltar que, si bien el tratamiento J presentó el mínimo valor observado de IT, no resultó en diferencias estadísticamente significativas respecto a los tratamientos H, K y M, donde la característica común con estos tres casos, además del agregado del lodo, es el contenido máximo de Cr en los sustratos (dentro de los niveles estudiados). Como se discutió en la sección **2.1.4**, un alto contenido de Cr puede provocar una reducción en el crecimiento de las plantas y clorosis (Pathak et al., 2020). En este caso, los resultados podrían indicar que la presencia de Cr en altas concentraciones pudo haber sido el causal de la reducción de la biomasa en las plantas del tratamiento J, y en los tratamientos que no se diferenciaron significativamente de este último.



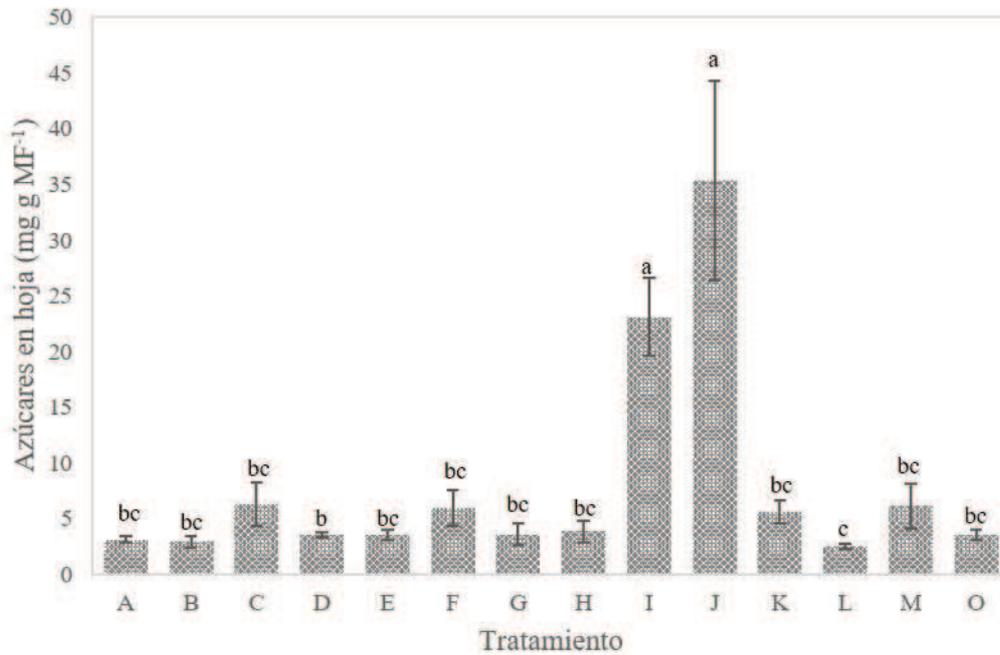
**Figura 5.5. Índice de tolerancia en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni**

En la **Figura 5.6** y **Figura 5.7** se encuentran representados los valores de azúcares solubles totales (AST) y de clorofilas totales, respectivamente, junto con los valores de significancia estadística a fin de analizar los efectos de la contaminación por MP en las plantas. Como puede observarse, los valores más altos de AST se encontraron en las plantas del tratamiento J, con diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de los tratamientos, a excepción de I. Respecto a J, este resultado podría deberse en cierta medida a la inhibición del crecimiento de las plantas de *N. alata* como consecuencia de los niveles de contaminación por MP, principalmente Cr.

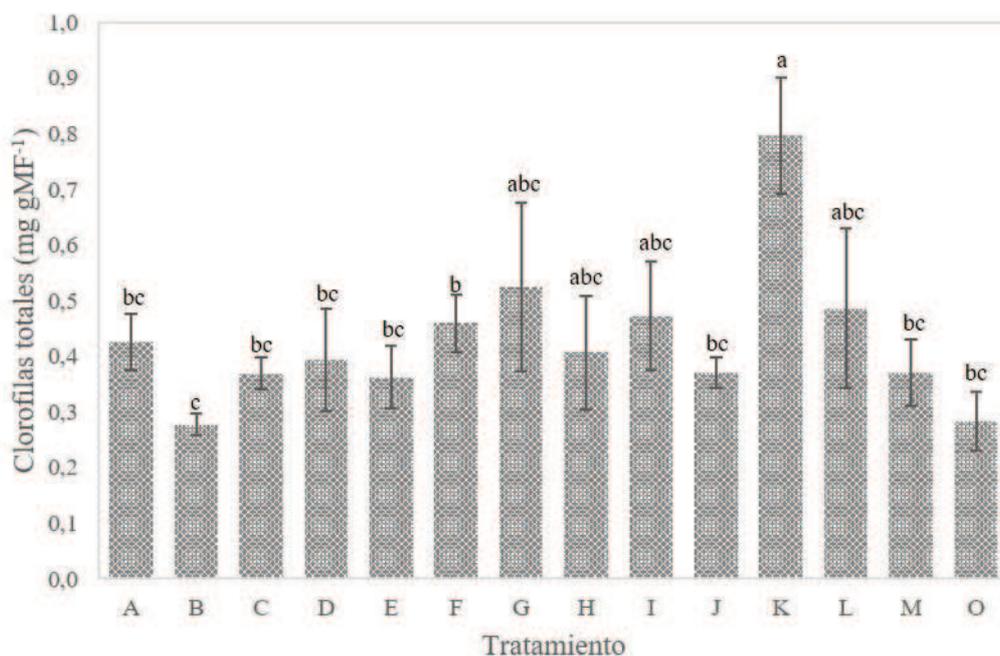
En cuanto al contenido de clorofilas no se pudo establecer una relación clara de su variación en los distintos tratamientos al no observarse una tendencia ni diferencias estadísticamente significativas entre la mayoría de ellos. Observando los extremos, los valores más bajos de clorofilas totales se registraron para el tratamiento B, y los más altos, para el tratamiento K, siendo la diferencia entre ellos, estadísticamente significativa.

Junto con las plantas del tratamiento K se encuentran con los valores más altos de clorofilas totales, sin diferenciarse estadísticamente entre ellos, los tratamientos G, H, I y L. Al compararlos, se observa que la principal característica común entre ellos es que los tratamientos con mayor contenido de clorofilas resultaron ser tratamientos con un nivel medio y alto de Ni en suelo, mientras que el tratamiento con el valor mínimo (B) correspondió a un tratamiento donde no se agregó Ni, por lo que su concentración en el medio era la más baja. Los efectos del Ni en las plantas pueden resultar positivos o negativos en función de la dosis y la tolerancia de la especie, debido a que el mismo cumple funciones importantes en diversos procesos metabólicos de la planta, como en el metabolismo del N, y en su ausencia o déficit las plantas pueden sufrir perturbaciones en la asimilación del N y en la absorción del hierro y un crecimiento reducido (Carvalho Mendes et al., 2023; Li et al., 2022; Parwez et al., 2021). Otros estudios han indicado que, a bajas dosis, el Ni promovió un incremento en el contenido de clorofilas y del proceso de fotosíntesis (Carvalho Mendes et al., 2023). De esta forma, la presencia de este metal podría haber sido el determinante en la mejora de las respuestas en nuestro experimento. Por otro lado, otra distinción importante entre los tratamientos B y K, donde la diferencia fue significativa, es que, si bien el contenido de Pb en el sustrato fue el mismo, la planta en el tratamiento B logró extraerlo, pero, sobre todo, translocarlo en una mayor concentración (**Figura 5.8**), siendo el contenido de Pb en los tejidos aéreos de las plantas en B y K, de 25,4 mg kg<sup>-1</sup> y 16,8 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Algo similar ocurrió en el tratamiento I, donde también el agregado de Pb al medio fue de 150 mg kg<sup>-1</sup> en conjunto con 300 mg kg<sup>-1</sup> de Ni, y los niveles logrados de acumulación de Pb en los tejidos aéreos y en raíces, fueron significativamente menor que en el tratamiento B. De esta forma, una mayor acumulación de Ni en los tejidos producto de su incremento en el sustrato, pareciera haber influido en la acumulación de Pb, principalmente en los tejidos aéreos.

Las plantas susceptibles al Pb, pueden evidenciar una disminución en el contenido de clorofilas conforme aumenta su concentración en los tejidos, y algunos autores sostienen que estos cambios en la producción de los pigmentos fotosintéticos podría deberse a la inhibición del complejo citocromo (Naranjo-Morán et al., 2022).



**Figura 5.6 Azúcares solubles totales en hojas en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni**



**Figura 5.7. Clorofilas totales en hojas en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni**

Como se discutió en los párrafos anteriores, una situación particular en una parte de las respuestas se observa para el tratamiento J, donde el  $IT < 1$  (**Figura 5.5**), el PF y AF de planta (**Tabla 5.2**) resultaron en los menores valores de todos los tratamientos enmendados con lodo, y el contenido de AST fue excepcionalmente alto (**Tabla 5.3**). Un tratamiento muy similar a J es el tratamiento K, también con un agregado  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb,  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cr, y a diferencia de lo ocurrido en el tratamiento J, en él se incorporaron  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  de Ni (mientras que en J no existió agregado de Ni, siendo todo el contenido del mismo, correspondiente a los metales originales del lodo y suelo). En el anexo I, las **Figuras A.I.1** y **A.I.2** muestran ejemplares de estos dos tratamientos al inicio (post trasplante) y final del experimento. Además, esta diferencia en los sustratos de crecimiento, también se extrapoló a los niveles de Ni acumulados en los tejidos aéreos y de raíces, donde en ambos casos, la concentración en el tratamiento K, fue ampliamente superior. A diferencia del tratamiento J, en el tratamiento K mejoraron gran parte de las

respuestas de crecimiento: un mayor IT (también observado en los otros dos tratamientos donde se combinó  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cr con agregado de Ni, “H” y “M”), mayor biomasa, altura de planta, N° de hojas y AF. Así mismo se observaron diferencias entre ambos tratamientos a niveles bioquímicos: las actividades enzimáticas de catalasa (Act. CAT) y de peroxidasa de guayacol (Act. GPX) se vieron incrementadas en el tratamiento J, y el contenido de clorofilas disminuido, aunque en estos dos últimos casos, no de forma estadísticamente significativa. Nuevamente, el incremento de los niveles de Ni en el rango estudiado pareciera mejorar las respuestas de las plantas sometidas al estrés por contaminación por el lodo y el agregado de los MP.

Por otro lado, comparando los resultados de los tratamientos controles sin lodo (N y P), respecto al resto en los que sí fueron enmendados con LR, se puede observar algunas diferencias importantes. Por un lado, en cuanto a los parámetros de crecimiento, ambos tratamientos se encontraron para la generalidad de las variables (N° de Hojas, PF aéreo y de planta, AF planta) en los valores mínimos, junto con el tratamiento J. Por otro lado, estos tratamientos exhibieron un contenido de MDA entre los valores más bajos, mientras que en el resto de los tratamientos enmendados fueron considerablemente superiores (aunque entre ellos no mostraron diferencias significativas). Esto podría indicar que están ocurriendo procesos de estrés oxidativo en aquellas plantas cultivadas en sustratos enmendados con lodo. En particular, al comparar los tratamientos “O” y “N”, con y sin agregado de lodo, y sin agregado de metales al medio en forma artificial, se puede observar un incremento en la actividad catalasa (Act. CAT) en el tratamiento O respecto a N. En el mismo sentido el contenido de clorofilas fue menor y el nivel de MDA se vio incrementado. Esta observación, en dos tratamientos donde no se agregó metales en forma artificial, podría estar expresando que el agregado de lodo al sustrato de crecimiento

generaría efectos negativos a nivel interno de la planta, generando un estrés oxidativo. En consecuencia, por la disminución en el contenido de pigmentos fotosintéticos también decaen las tasas de asimilación de CO<sub>2</sub> y el nivel de azúcares podría ser menor debido a un aumento en su degradación para mantener los niveles de ATP (Carvalho Mendes et al., 2023).

**Tabla 5.2.** Variables de crecimiento frente a los distintos tratamientos

Tratamiento	Nº Hojas	H tallo (cm)	L Raíz (cm)	PF hojas (g)	PF tallo (g)	PF raíz (g)	PF aéreo (g)	PF Planta (g)	AF planta (cm <sup>2</sup> planta <sup>-1</sup> )
<b>A</b>	9 ± 1	30,5 ± 1,2	12,0 ± 0,4	29,9 ± 1,4	11,2 ± 0,6	11,1 ± 0,9	41,1 ± 1,7	52,2 ± 2,5	475,4 ± 29,9
<b>B</b>	9 ± 0	32,5 ± 3,4	13,8 ± 1,7	25,1 ± 4,2	9,4 ± 1,4	11,9 ± 2,6	34,6 ± 5,4	46,5 ± 7,6	444,7 ± 66,0
<b>C</b>	11 ± 1	37,3 ± 5,4	11,4 ± 0,9	30,7 ± 2,2	11,7 ± 2,6	11,7 ± 1,6	42,3 ± 4,8	54,0 ± 6,2	454,5 ± 54,1
<b>D</b>	6 ± 1	34,0 ± 1,8	12,8 ± 1,1	19,8 ± 4,2	8,2 ± 1,1	10,8 ± 1,5	28,0 ± 5,2	38,8 ± 6,7	315,5 ± 48,2
<b>E</b>	8 ± 1	30,5 ± 3,5	10,3 ± 1,3	19,4 ± 1,3	6,3 ± 0,9	8,6 ± 1,4	25,7 ± 2,1	34,4 ± 3,5	328,2 ± 26,6
<b>F</b>	9 ± 1	34,5 ± 1,3	13,0 ± 0,8	23,6 ± 1,3	9,6 ± 1,1	10,7 ± 0,7	33,1 ± 2,0	43,8 ± 2,6	490,7 ± 36,0
<b>G</b>	8 ± 1	33,5 ± 2,2	11,3 ± 0,8	21,9 ± 2,2	9,9 ± 0,9	11,7 ± 1,9	31,8 ± 2,5	43,5 ± 4,2	365,8 ± 50,8
<b>H</b>	6 ± 0	32,0 ± 1,6	8,5 ± 0,9	19,5 ± 2,4	7,0 ± 1,5	11,4 ± 3,4	26,5 ± 3,8	37,9 ± 7,1	379,2 ± 74,0
<b>I</b>	9 ± 1	34,0 ± 3,3	11,0 ± 0,7	21,2 ± 0,8	9,6 ± 1,6	11,2 ± 1,4	30,8 ± 1,6	42,0 ± 2,5	362,3 ± 13,6
<b>J</b>	4 ± 1	22,3 ± 2,6	10,5 ± 0,3	10,7 ± 1,9	3,7 ± 0,5	2,6 ± 0,4	14,4 ± 2,2	17,0 ± 2,5	154,5 ± 34,4
<b>K</b>	7 ± 1	30,8 ± 1,3	12,4 ± 1,1	17,2 ± 1,5	7,8 ± 0,8	7,0 ± 1,3	25,0 ± 2,1	32,0 ± 3,2	311,0 ± 19,8
<b>L</b>	9 ± 1	32,0 ± 2,9	13,3 ± 1,2	24,1 ± 2,7	10,0 ± 1,6	11,6 ± 2,0	34,1 ± 4,1	45,7 ± 5,9	380,9 ± 21,4
<b>M</b>	7 ± 1	28,5 ± 3,5	8,8 ± 1,0	21,4 ± 3,6	7,9 ± 2,0	9,7 ± 2,3	29,3 ± 5,5	39,0 ± 7,7	287,0 ± 60,0
<b>N</b>	5 ± 0	28,0 ± 2,3	8,8 ± 0,5	4,8 ± 1,1	3,4 ± 0,6	4,2 ± 1,3	8,2 ± 1,6	12,4 ± 3,0	124,1 ± 23,6
<b>O</b>	9 ± 3	27,8 ± 1,7	9,0 ± 0,8	20,6 ± 3,1	7,0 ± 0,9	8,8 ± 2,4	27,6 ± 3,9	36,4 ± 6,3	339,6 ± 44,0
<b>P</b>	5 ± 1	29,0 ± 2,0	10,0 ± 0,6	7,6 ± 1,5	5,2 ± 0,7	7,6 ± 1,2	12,8 ± 1,9	20,4 ± 3,1	232,2 ± 42,9

Valores expresados como valor medio ± error estándar (n=4)

**Tabla 5.3.** Efectos de los distintos tratamientos sobre las respuestas bioquímicas de *Nicotiana alata* L.

Tratamiento	Act. CAT (U g <sup>-1</sup> )	Act. GPX (U g <sup>-1</sup> )	Clor. A (mg g MF <sup>-1</sup> )	Clor. B (mg g MF <sup>-1</sup> )	Clor. Totales (mg g MF <sup>-1</sup> )	Carotenoides (mg g MF <sup>-1</sup> )	MDA (nmol g MF <sup>-1</sup> )	AST (mg g MF <sup>-1</sup> )	PST (mg g MF <sup>-1</sup> )
A	0,111 ± 0,006	0,371 ± 0,041	0,292 ± 0,037	0,133 ± 0,014	0,425 ± 0,050	0,070 ± 0,009	18,7 ± 0,8	3,1 ± 0,3	7,0 ± 0,5
B	0,083 ± 0,011	0,208 ± 0,033	0,192 ± 0,012	0,085 ± 0,007	0,277 ± 0,019	0,049 ± 0,003	12,3 ± 1,0	2,9 ± 0,5	5,7 ± 0,9
C	0,121 ± 0,023	0,392 ± 0,079	0,259 ± 0,022	0,110 ± 0,007	0,368 ± 0,029	0,063 ± 0,006	19,1 ± 0,2	6,3 ± 1,9	6,8 ± 1,7
D	0,091 ± 0,003	0,518 ± 0,105	0,264 ± 0,064	0,130 ± 0,029	0,394 ± 0,092	0,064 ± 0,017	17,2 ± 0,4	3,5 ± 0,2	6,4 ± 0,2
E	0,115 ± 0,002	0,440 ± 0,110	0,250 ± 0,042	0,113 ± 0,016	0,362 ± 0,057	0,062 ± 0,011	22,6 ± 3,2	3,6 ± 0,5	7,2 ± 0,9
F	0,087 ± 0,014	0,400 ± 0,047	0,321 ± 0,035	0,139 ± 0,016	0,459 ± 0,051	0,085 ± 0,009	14,9 ± 0,8	6,0 ± 1,6	7,7 ± 1,6
G	0,089 ± 0,020	0,387 ± 0,108	0,366 ± 0,109	0,158 ± 0,043	0,524 ± 0,151	0,091 ± 0,024	19,1 ± 4,0	3,6 ± 1,0	6,7 ± 1,4
H	0,086 ± 0,022	0,393 ± 0,090	0,280 ± 0,074	0,127 ± 0,028	0,407 ± 0,102	0,069 ± 0,017	17,4 ± 1,0	3,9 ± 1,0	7,4 ± 1,6
I	0,123 ± 0,021	0,296 ± 0,053	0,333 ± 0,071	0,140 ± 0,027	0,472 ± 0,098	0,082 ± 0,017	14,6 ± 2,8	23,1 ± 3,5	8,0 ± 1,4
J	0,174 ± 0,022	0,352 ± 0,089	0,260 ± 0,020	0,111 ± 0,008	0,371 ± 0,028	0,064 ± 0,008	13,5 ± 3,4	35,3 ± 8,9	8,6 ± 1,0
K	0,072 ± 0,006	0,246 ± 0,054	0,555 ± 0,074	0,241 ± 0,035	0,796 ± 0,105	0,127 ± 0,016	14,2 ± 0,1	5,6 ± 1,1	7,4 ± 0,7
L	0,102 ± 0,018	0,276 ± 0,031	0,338 ± 0,100	0,148 ± 0,044	0,485 ± 0,143	0,083 ± 0,021	13,6 ± 0,5	2,5 ± 0,3	7,5 ± 0,5
M	0,104 ± 0,016	0,534 ± 0,127	0,255 ± 0,039	0,116 ± 0,021	0,371 ± 0,059	0,061 ± 0,009	21,2 ± 0,0	6,1 ± 2,0	8,2 ± 0,7
N	0,071 ± 0,008	0,148 ± 0,016	0,254 ± 0,011	0,100 ± 0,008	0,354 ± 0,018	0,062 ± 0,001	6,4 ± 0,7	65,6 ± 5,3	8,4 ± 0,6
O	0,124 ± 0,009	0,170 ± 0,011	0,187 ± 0,036	0,097 ± 0,020	0,283 ± 0,053	0,043 ± 0,008	15,6 ± 0,7	3,5 ± 0,4	7,6 ± 1,1
P	0,059 ± 0,005	0,166 ± 0,018	0,149 ± 0,022	0,065 ± 0,006	0,215 ± 0,023	0,036 ± 0,009	7,7 ± 1,4	8,1 ± 1,5	10,9 ± 1,5

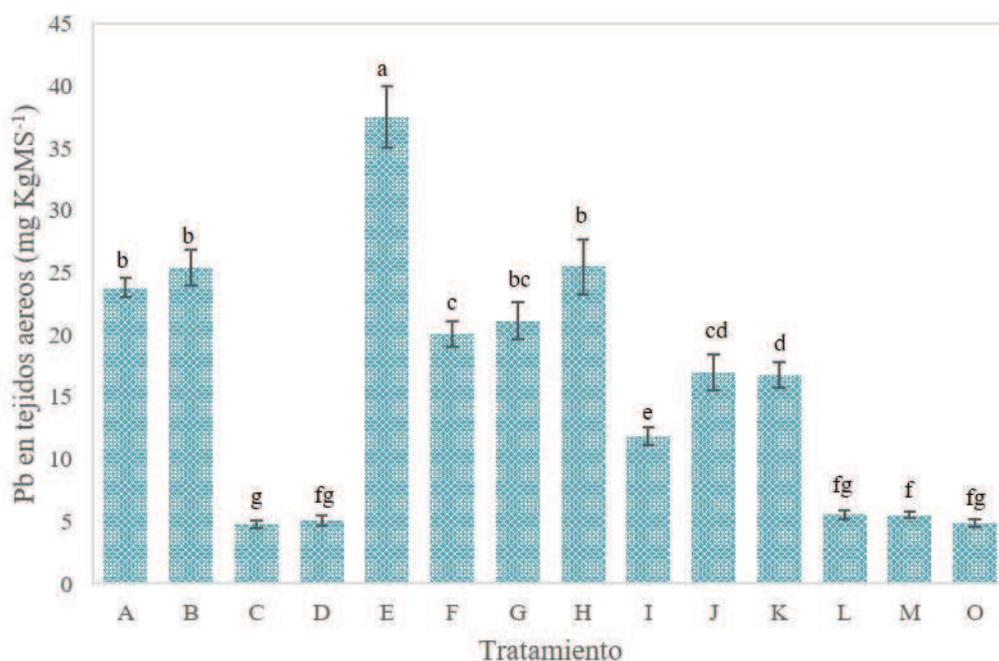
Valores expresados como valor medio ± error estándar (n=4). Clor.: Clorofilas. Act.: actividad.

#### **5.4.2. Efectos de los distintos tratamientos sobre la acumulación de metales en los tejidos vegetales de *Nicotiana glauca* L.**

En la **Figura 5.8** se muestran los valores de concentración de Pb en los tejidos aéreos al final de la cosecha para cada tratamiento. En general, se puede observar una mayor acumulación de este metal en la biomasa superior cuando las concentraciones de Pb en los sustratos de crecimiento fueron mayores (tratamiento con agregado de 150 y 300 mg kg<sup>-1</sup>), superando los 10 mg kg<sup>-1</sup> en todos estos tratamientos. Si bien el tratamiento con mayor extracción en los tejidos aéreos fue el tratamiento E, donde la cantidad de Pb agregado fue la mayor, de 300 mg kg<sup>-1</sup>, este comportamiento no se repitió en los otros tratamientos con el mismo agregado de Pb. En los tratamientos restantes (con 300 mg kg<sup>-1</sup> de Pb), el contenido de Pb en los tejidos aéreos fue significativamente menor, y el factor común en todos ellos fue el agregado conjunto de Pb con Níquel (en 300, 150 y 150 mg kg<sup>-1</sup> para F, G y H respectivamente). Esto podría indicar alguna interferencia y/o competencia entre Pb y Ni, en los procesos de absorción y/o translocación a los tejidos aéreos de la planta, provocando que ante la presencia de Ni, la acumulación de Pb en los tejidos aéreos sea menor. En particular, los tratamientos E y F son similares (agregado de Pb=300 mg kg<sup>-1</sup> y Cr=150 mg kg<sup>-1</sup>), a excepción del Ni, que fue agregado en una magnitud de 300 mg kg<sup>-1</sup> en el tratamiento F. Producto de esta diferencia, el contenido de Ni en los tejidos aéreos para el caso de F fue significativamente mayor que para el caso de las plantas cultivadas en E. Particularmente, esta situación se repite cuando se evalúa el contenido de Pb y Ni en las raíces para ambos tratamientos. Una situación similar ocurre cuando se evalúa la extracción de Ni. Para los tratamientos con la concentración máxima evaluada de Ni (tratamientos F, I, K y L), se observa una menor acumulación en

los tejidos aéreos a medida que la concentración de Pb en el medio se incrementó (Acumulación de Ni en “L” > “K y I” > “F”). Algunos autores sugieren que el Pb y Ni podrían ingresar a las células vegetales a través de los canales de calcio y/o potasio activados (Amari et al., 2017). Esto podría provocar una competencia entre estos metales, limitándose mutuamente el ingreso a las células vegetales.

Por otro lado, puede observarse que aun en los tratamientos donde no se agregó Pb (C, D, L, M y O) se produjo una extracción de este MP en los tejidos aéreos y de raíces, provenientes del metal ya presente en la mezcla de sustrato, debido al aporte del lodo y suelo utilizado. Una situación similar ocurrió en cuanto a la remoción de Cr y Ni, en los sustratos sin su agregado.



**Figura 5.8.** Acumulación de Pb los tejidos aéreos de *Nicotiana glauca* L. en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni

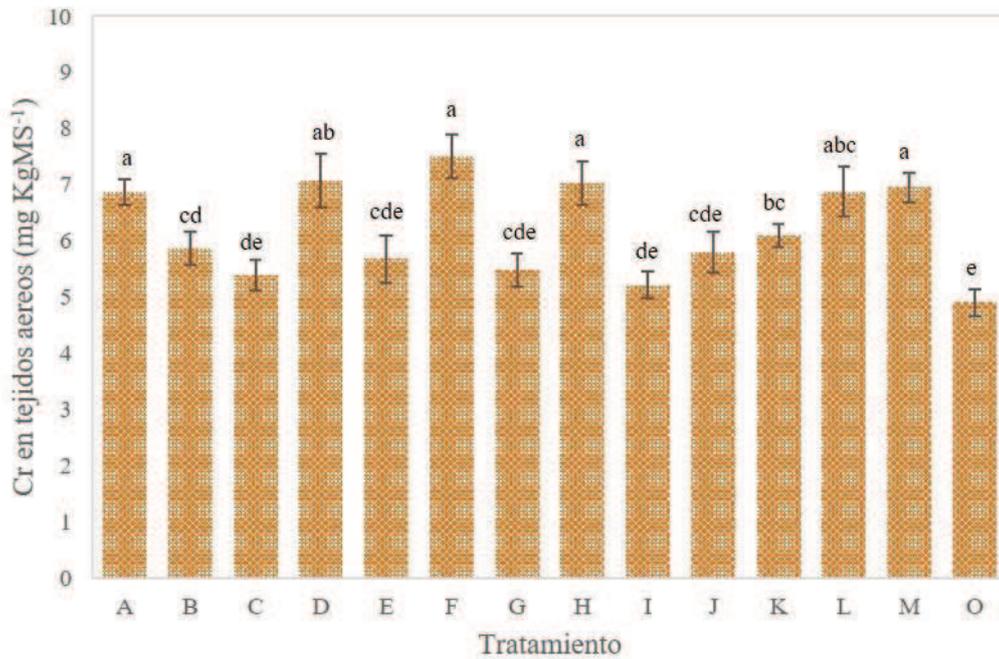


Figura 5.9. Acumulación de Cr en los tejidos aéreos de *Nicotiana glauca* L. en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni

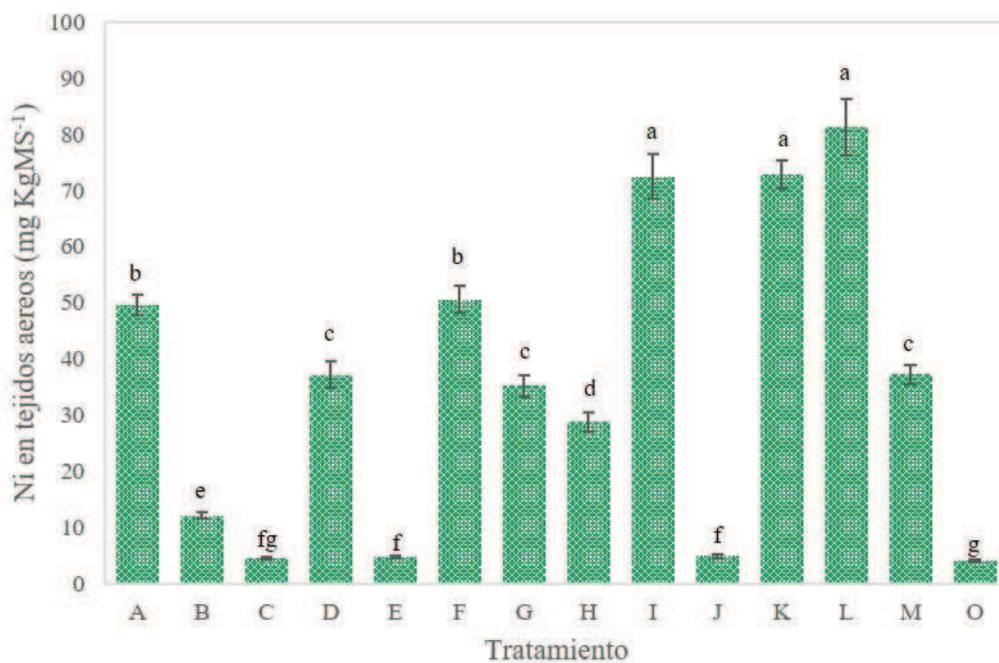


Figura 5.10. Acumulación de Ni en los tejidos aéreos de *Nicotiana glauca* L. en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni

En cuanto al contenido de Cr en los tejidos aéreos al finalizar el experimento (**Figura 5.9**), los niveles alcanzados en general fueron bajos ( $<8 \text{ mg kg}^{-1}$  para todos los casos) en comparación a lo alcanzado para Pb y Ni. Por otro lado, no se observó una clara tendencia en respuesta a las variaciones de Cr en el medio y la interferencia con la adición de otros metales.

Como puede observarse en la **Figura 5.10** los tres tratamientos con mayor contenido de Ni en los tejidos aéreos son I, K y L, donde el agregado de Ni al medio inicial fue de  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  en los tres casos. A diferencia de los anteriores el tratamiento F, también con un agregado de  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  al medio, presentó absorciones notablemente menores que en esos casos. Para el tratamiento F, la particularidad fue la adición simultánea de Pb en el nivel más alto, lo que nuevamente podría expresar la competencia entre estos dos metales.

Si bien los valores reportados por Khan et al. (2020b, 2019) son superiores para los tres metales, las condiciones estudiada por estos autores fueron diferentes, principalmente porque la descontaminación se realizaba desde un efluente líquido, encontrándose los MP de esta manera, en una forma más biodisponible.

En la figura siguiente (**Figura 5.11**) se presentan los resultados de la extracción de plomo en los tejidos radiculares. Se puede observar una notable influencia del agregado de plomo en su concentración en raíces, de forma directa, donde una mayor concentración de Pb en el sustrato se expresó a través de un mayor nivel de su absorción en raíces.

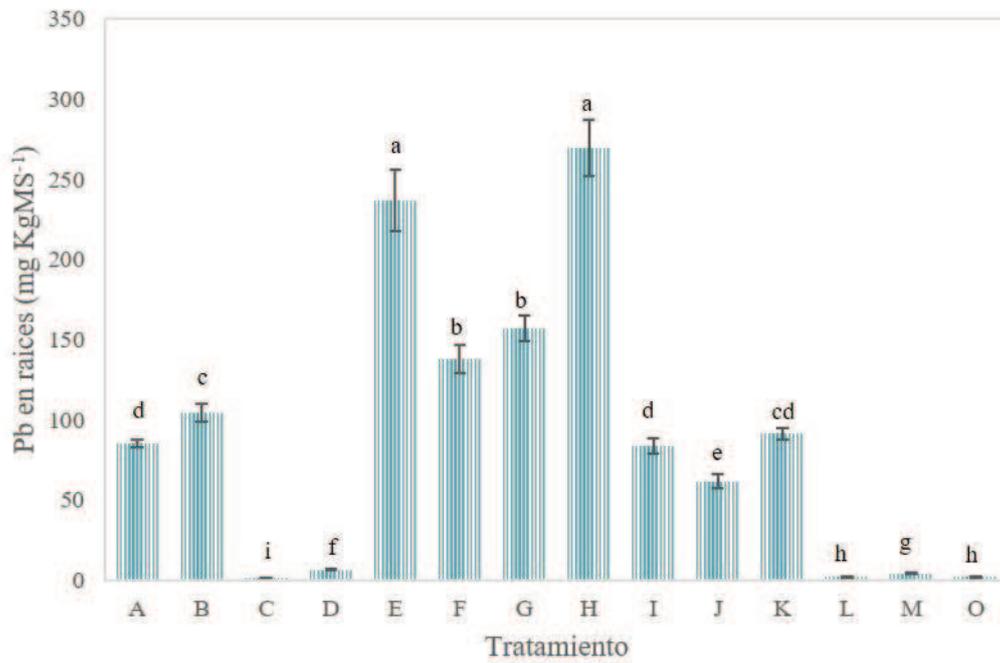


Figura 5.11. Acumulación de Pb en raíces de *Nicotiana alata* L. en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni

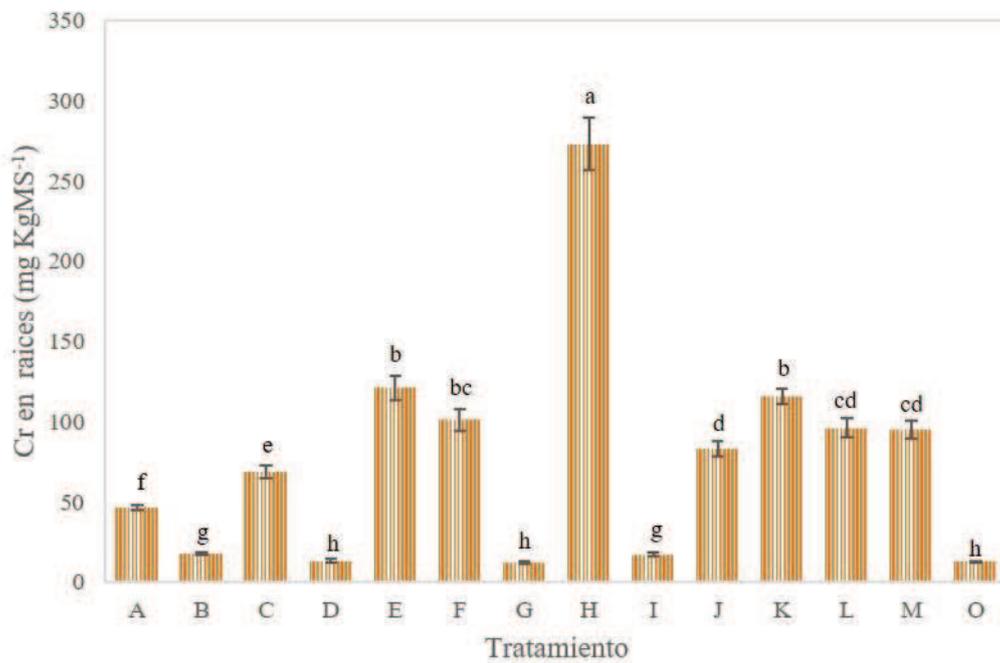
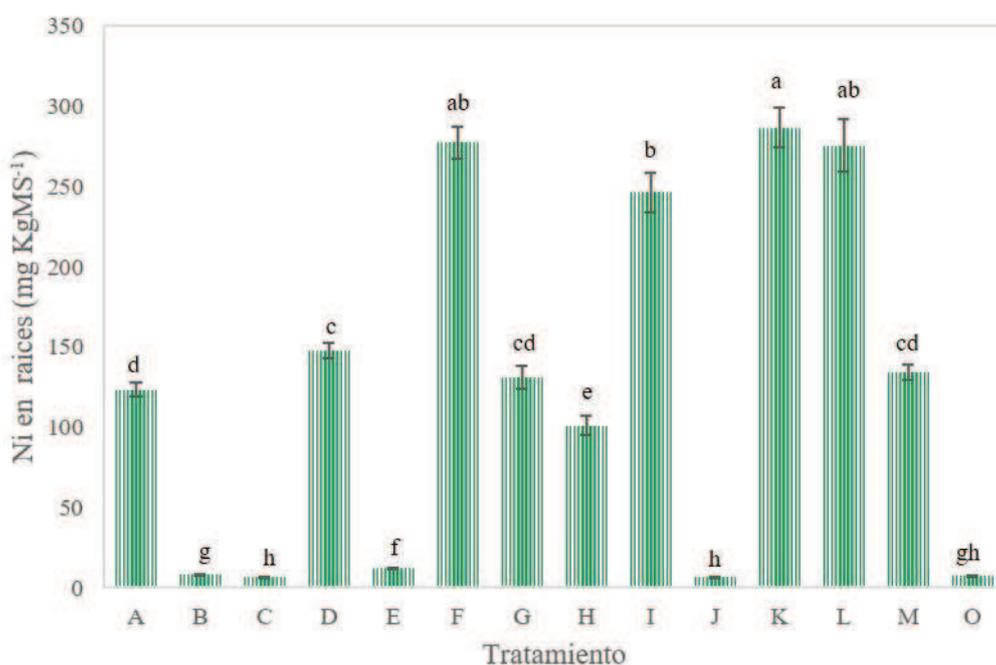


Figura 5.12. Acumulación de Cr en raíces de *Nicotiana alata* L. en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni



**Figura 5.13.** Acumulación de Ni en raíces de *Nicotiana glauca* L. en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni

En cuanto al contenido de cromo en raíces (**Figura 5.12**) no se evidencia una influencia, o una clara diferencia, entre los distintos niveles de agregado de Cr al medio. Sí, por otro lado, es notablemente superior la extracción de Cr en aquellos tratamientos con agregado del mismo al sustrato.

En la **Figura 5.13** se muestran los resultados de la concentración de Ni en las raíces al finalizar el experimento. En general se puede observar una influencia positiva en el incremento de Ni en el medio respecto a la capacidad de extracción de la planta a sus tejidos radiculares. A diferencia de lo ocurrido en los tejidos aéreos, no se observa una diferencia en la extracción de Ni en raíces para un mismo nivel de contaminación de este metal cuando se aplica en simultáneo una contaminación de Pb en niveles altos. Esto podría indicar que la presencia de Pb en niveles altos en el medio no pareciera interferir en los procesos de absorción de Ni, pero sí en los mecanismos de translocación del metal hacia los tejidos superiores.

Los valores más altos de contenido de Pb en raíces se encontraron para los tratamientos E y H, con valores de 237 y 269 mg kg<sup>-1</sup> de Pb, respectivamente. Si bien el tratamiento H fue superior a E, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, y la distinción entre ambos, es la mayor presencia de Cr y Ni en los suelos del tratamiento H. Luego siguieron los tratamientos F y G, con 138 y 157 mg kg<sup>-1</sup> de Pb, donde también en estos casos, correspondieron a tratamientos con el máximo nivel de agregado de este metal. Al comparar E y F, donde el nivel de Pb en raíces fue significativamente inferior en este último, la única diferencia entre ambos es el mayor nivel de Ni en el tratamiento F siendo, además, uno de los tratamientos que más Ni en raíces acumuló.

Para el caso del Cr, los valores más altos en raíces se reportaron para los tratamientos E y H, con valores de 121 y 273 mg kg<sup>-1</sup> de Cr, respectivamente. Las concentraciones más altas encontradas en raíces fueron las correspondientes a los tratamientos F, K y L, alcanzando valores medios entre los 275 y los 286 mg kg<sup>-1</sup> de Ni. En cuanto a los tejidos aéreos, los valores superiores se encontraron en las plantas cultivadas bajo los tratamientos I, K y L, con concentraciones desde los 72 a 81 mg kg<sup>-1</sup> de Ni. Liu et al. (2019) encontraron que *Bidens pilosa* L. (conocida como amor seco o romerillo) pudo concentrar en sus tejidos 180 mg kg<sup>-1</sup>, 28 mg kg<sup>-1</sup> y 53 mg kg<sup>-1</sup> de Ni en sus raíces, tallos y hojas respectivamente, luego de 3 meses de exposición a un suelo contaminado con níquel. Por otro lado, Mirzaei et al. (2021) evaluaron la fitoextracción de *Vitis vinífera* L. (planta de vid) de un suelo contaminado con diferentes metales, encontrando que luego de 2 años de tratamiento, la planta extrajo 63,5 mg kg<sup>-1</sup> y 152,9 mg kg<sup>-1</sup> de Pb y 17,2 mg kg<sup>-1</sup> y 25,3 mg kg<sup>-1</sup> de Cr, en raíces y en partes aéreas respectivamente, aunque en dichos estudios, la concentración de metal en suelo fue

altamente superior que en este experimento, superando las 800 mg kg<sup>-1</sup> en el caso de Pb y las 600 mg kg<sup>-1</sup> para el Cr.

### 5.4.3. Evaluación de los factores de translocación y de bioconcentración

El factor de translocación relaciona el contenido del metal en los tejidos aéreos respecto a su concentración en las raíces. Expresa la capacidad que tiene la planta de transportar el metal, desde sus tejidos internos radiculares, hacia la parte superior. Por otro lado, el FBC relaciona la concentración promedio de MP en toda la planta, respecto a la del suelo.

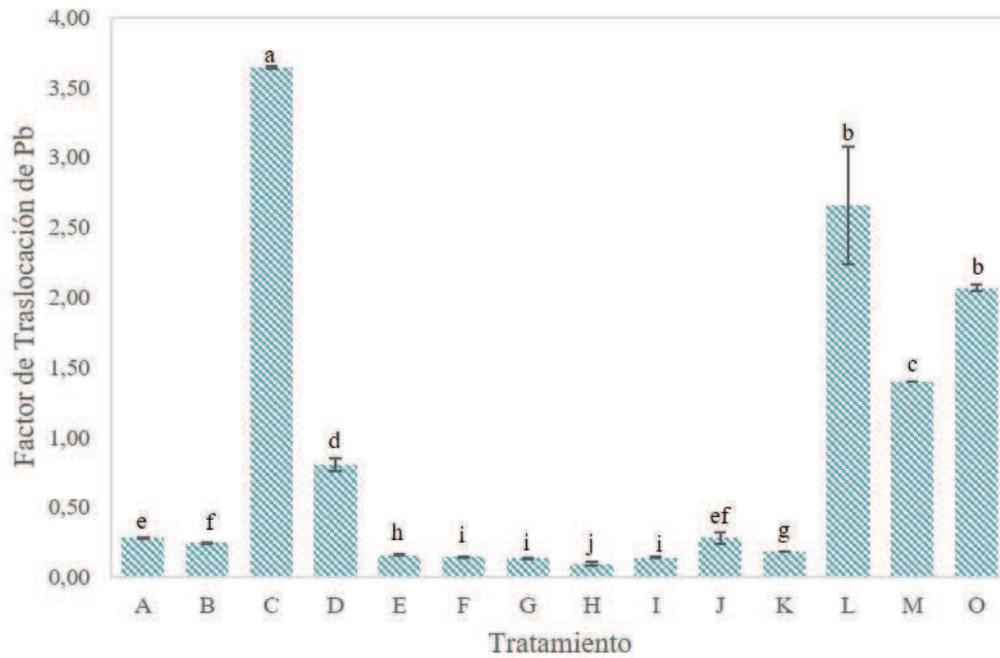
Los resultados obtenidos para los distintos tratamientos aplicados a los sustratos con lodo (de A-M y O) se muestran en las **Figuras 5.14-5.16**. El análisis de MLG dio como resultado que el agregado de metal, Pb, Cr y Ni, tuvo una influencia significativa en los factores FT y FBC de Pb, Cr y Ni, respectivamente. Se puede observar que los valores de FT fueron menores a 1 para la mayoría de los tratamientos con agregado del MP evaluado y que, en general, los mayores FT se encontraron a bajas concentraciones de ese metal (por ejemplo, para el caso del Pb en la **Figura 5.14 (a)** los tratamientos C, L, M y O). Esto también se relaciona en general con bajas concentraciones del MP en sus tejidos, lo cual podría indicar que, a bajos niveles del metal, la planta promueve una concentración más preferencial en los tejidos superiores respecto a las situaciones donde estos niveles son mayores. Una situación similar ocurre para el caso del Ni, donde los valores de FT más altos se encontraron para los tratamientos con menor contenido de Ni en los sustratos (B, C, E, J y O). A su vez, estos tratamientos corresponden a los que menor contenido de Ni acumularon en sus raíces y en los tejidos aéreos. Reyes Roa (2020) encontraron que el factor de translocación de Cd en plantas de *Ocimum basilicum* L.

disminuía en los tratamientos con un mayor contenido este metal en el medio, a pesar de que la concentración del Cd en raíces se incrementaba. Los autores sostienen que ese comportamiento puede deberse a que el aumento en la concentración de este metal genera cambios en la planta, entre ellos un incremento en la producción de quelatos como metalotioneinas y las fitoquelatinas, que podrían inhibir la translocación de este elemento tóxico a las partes aéreas. Dinu et al. (2020) reportaron los valores de MP considerados como fitotóxicos en los tejidos de plantas sensibles a los mismos, siendo para el caso del Pb de 20 mg kg<sup>-1</sup>, para el Cr de 2 mg kg<sup>-1</sup> y para el Ni de 30 mg kg<sup>-1</sup>. Vasile et al. (2021) informaron que la concentración tóxica de Ni en los tejidos de las hojas maduras puede estar en el rango de 10 a 100 mg kg<sup>-1</sup> MS, mientras que Mustafa et al. (2023) indicaron que para plantas tolerantes, ese nivel se encuentra en 50 mg kg<sup>-1</sup> MS. Nuestros resultados muestran que el contenido de Ni en los tejidos aéreos superó los 30 mg kg<sup>-1</sup> como valor de referencia en prácticamente todos los tratamientos en los cuales se agregó este MP en forma artificial, estando siempre por debajo (entre 4 y 14 mg kg<sup>-1</sup>) en aquellos donde el contenido de Ni fue el más bajo y el FT más alto (B, C, E, J y O). En cuanto al Pb se observa algo similar, estando por debajo de los 20 mg kg<sup>-1</sup> de referencia en aquellos tratamientos donde el agregado de Pb fue nulo (menor concentración de Pb en el medio) y también en tres de los tratamientos con concentraciones medias de Pb (I, J y K). Para el Cr, lo observado fue diferente, habiéndose superado el valor informado por Dinu et al. (2020) de 2 mg kg<sup>-1</sup> en todas las situaciones. Estas observaciones, podrían tener relación con el mayor valor de FT observado en los tratamientos con menor contenido de cada uno de los metales en los sustratos, respecto a aquellos en los que el nivel de MP en suelos y tejidos vegetales fue mayor. Posiblemente, a medida que se alcanzaban los niveles de fitotoxicidad en la planta, la misma podría emplear mecanismos de restricción para su absorción y translocación a los tejidos aéreos.

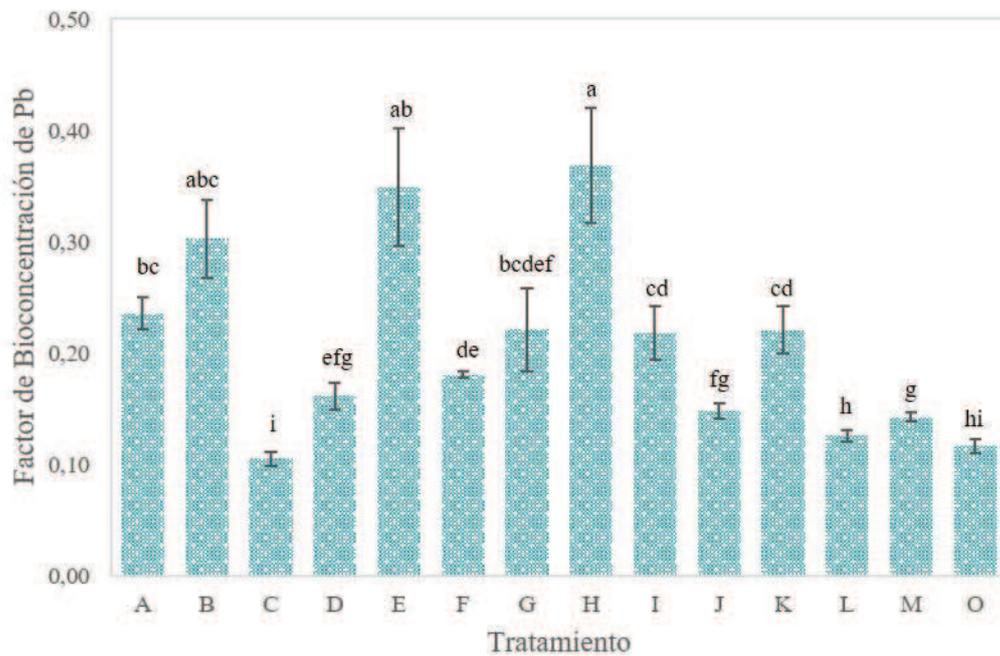
Por otro lado, si comparamos los FT en los niveles medios de agregado de cada metal (tratamientos A, B, I, J y K para Pb, A, C, E, F y L para Cr y A, D, G H y M para Ni) los mismos variaron entre 0,14 y 0,28 para el Pb, entre 0,05 y 0,15 para el Cr y de 0,25 a 0,40 para el Ni, por lo que en general, podría decirse que  $FT_{Ni} > FT_{Pb} > FT_{Cr}$ . Debido a las funciones fisiológicas en las que participa el Ni, al igual que otros metales como el Zn y Cu, es posible que presente una mayor eficiencia de translocación hacia los órganos aéreos (Vasile et al., 2021).

La ventaja de evaluar el FBC respecto del análisis directo del contenido de MP en los tejidos, es que este factor permite tener en cuenta las diferencias de la concentración del metal en los sustratos (**Tabla A.I.1.** ). Al comparar los FBC de los tres metales, se puede observar que en general  $FBC_{Ni} > FBC_{Pb} > FBC_{Cr}$ . Esto podría indicar que la planta de *N. alata* logra extraer el Ni con mayor facilidad que al Pb y Cr. Más allá de la afinidad de la especie vegetal por uno u otro metal, la biodisponibilidad en la solución del suelo también ejerce una influencia importante en la capacidad de extracción del metal. Gonzalez Huecas et al. (2003) estudiaron la retención de diferentes metales en el suelo aplicándole sucesivos lavados y encontraron que la retención del Cr y Pb era ampliamente mayor que la del Ni, existiendo una fuerte competencia entre los primeros por los sitios de adsorción. De la misma forma, Amari et al. (2017) informa que la movilidad del Ni en los suelos es mucho mayor que la del Pb. En función de esto, los resultados obtenidos podrían deberse principalmente a una menor movilidad del Cr (seguido por el Pb) en la solución del suelo.

(a)

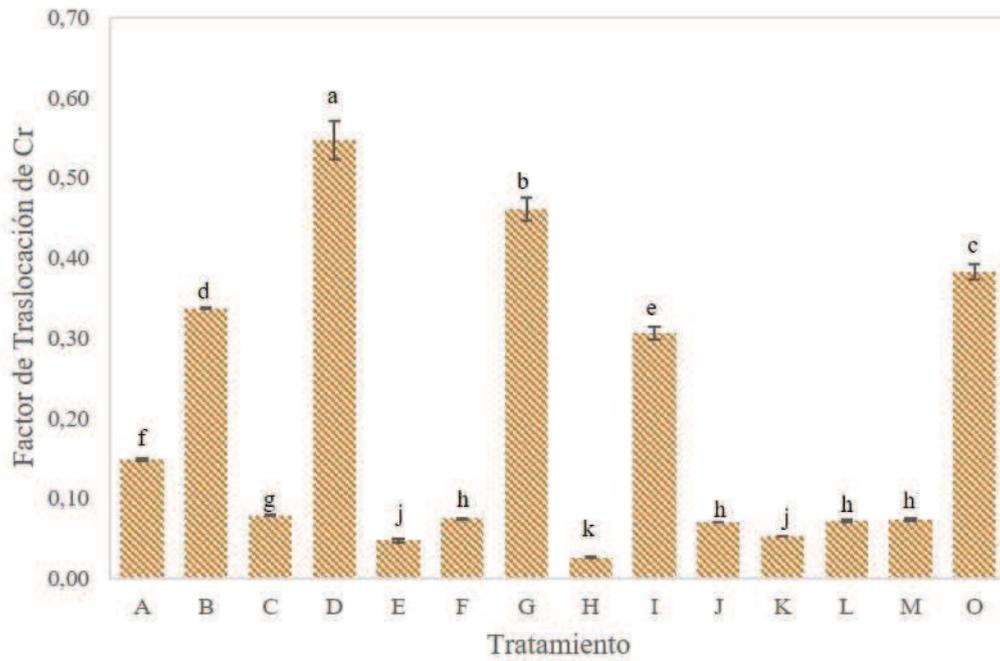


(b)

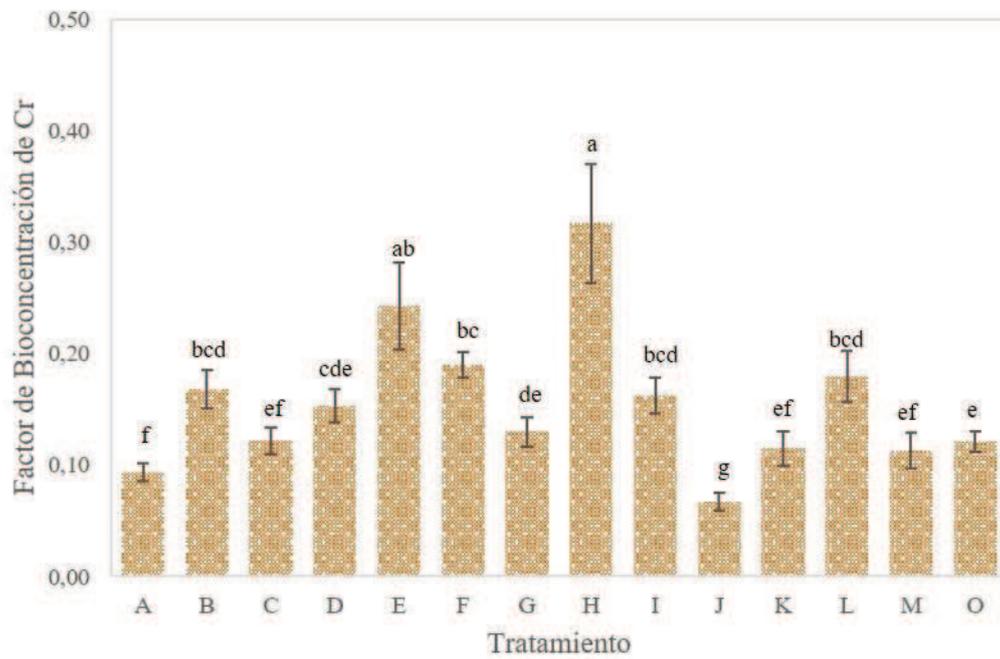


**Figura 5.14. Factores de (a) Translocación y (b) Bioconcentración de Pb en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni**

(a)

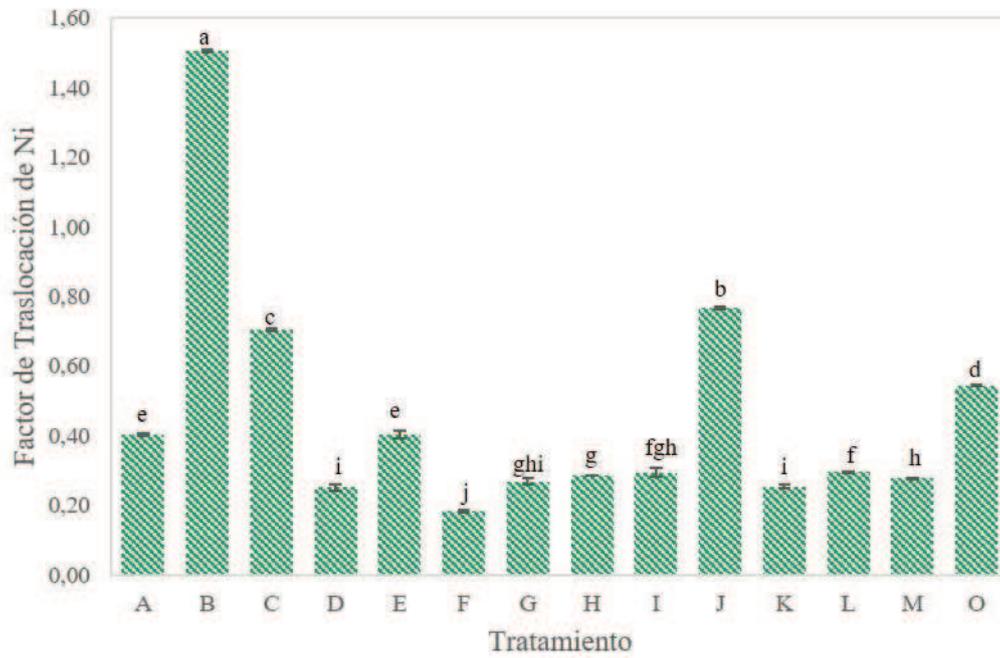


(b)

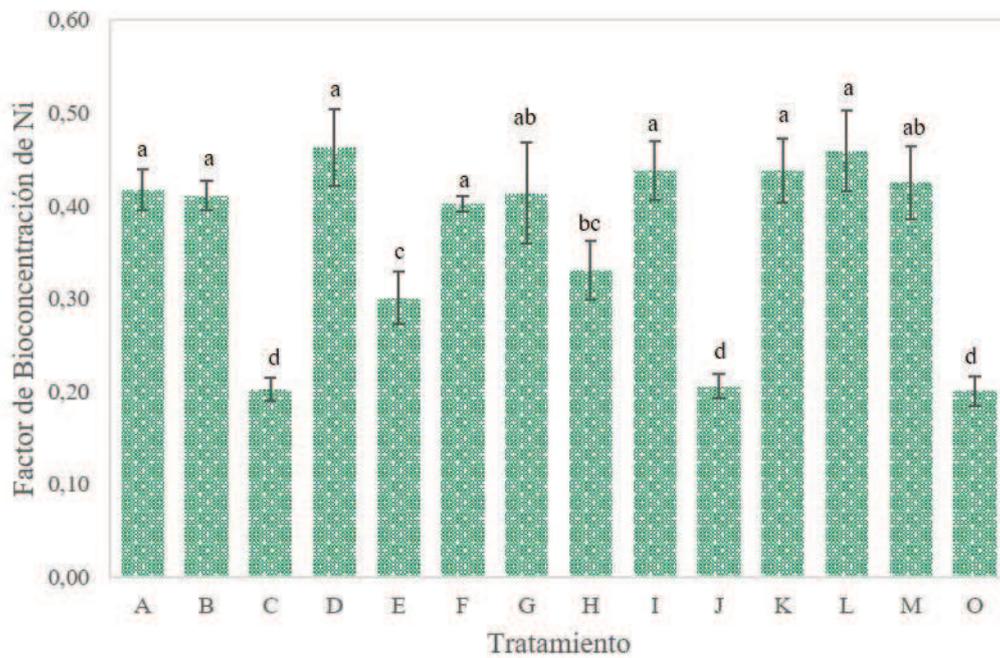


**Figura 5.15. Factores de (a) Translocación y (b) Bioconcentración de Cr en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni**

(a)



(b)



**Figura 5.16. Factores de (a) Translocación y (b) Bioconcentración de Ni en los tratamientos enmendados con lodo bajo diferentes niveles de contaminación por Pb, Cr y Ni**

#### **5.4.4. Evaluación de la extracción de metales pesados a través de la metodología de superficie de respuesta (RSM)**

La acumulación de metales en los tejidos aéreos de *N. alata*, representa la posibilidad de fitoextraer los metales del complejo suelo-lodo a través de la cosecha de las partes aéreas de la planta, ya que son las zonas más fácilmente extraíbles. La evaluación conjunta de la acumulación de metales en estos tejidos y la generación de biomasa aérea permite evaluar la cantidad de metal acumulada en estos tejidos, y que son susceptibles de ser cosechados (Ec. (5.3)). En este apartado se buscó inferir sobre cómo evolucionó la cantidad de metal extraído a través de los tejidos vegetales conforme varió la concentración de metal en el sustrato.

Para ello, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y regresión múltiple y se representaron las superficies de respuesta de cada modelo ajustado, para evaluar la variación de la extracción de cada metal ante cambios en el agregado de Pb, Cr y Ni en los medios de crecimiento.

Las variables respuestas evaluadas fueron la cantidad de cada uno de los MP extraídos (Pb, Cr y Ni, respectivamente) por la planta a través de sus tejidos aéreos ( $\mu\text{g MP planta}^{-1}$ ), y los factores de los modelos, fueron la cantidad de Pb, Cr y Ni en suelo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).

En todos los casos se ajustó un modelo cuadrático, y se incorporaron a la función de respuesta los términos que contribuyeron de manera significativa al modelo (valor  $p < 0,05$ ), evaluando bajo esta metodología los términos lineales, cuadráticos y de interacción (Ec. (5.5)).

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \varepsilon \quad (5.5)$$

Donde  $y$  representa la variable dependiente (extracción de Pb, Cr y Ni en tejidos vegetales para cada caso),  $X_i$  es la variable independiente (concentración de Pb, Cr y Ni en sustrato inicial, respectivamente),  $\beta_0$  es una constante,  $\beta_i$  es el coeficiente de regresión del término lineal,  $\beta_{ii}$  es el coeficiente del término cuadrático,  $\beta_{ij}$  es el término del efecto de interacción, y  $\varepsilon$  es el término de error experimental.

**Tabla 5.4.** Coeficientes estimados y resultados de ANOVA para el ajuste de cada respuesta (extracción de MP en tejidos aéreos)

Término	Respuesta evaluada		
	Pb <sub>extraído</sub>	Cr <sub>extraído</sub>	Ni <sub>extraído</sub>
<b>Modelo</b>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<b>A-Pb</b>	< 0,0001	NS	0,0083
<b>B-Cr</b>	0,0416	0,1553	0,0369
<b>C-Ni</b>	0,2514	0,0034	< 0,0001
<b>Pb × Cr</b>	NS	NS	NS
<b>Pb × Ni</b>	NS	NS	0,0035
<b>Cr × Ni</b>	0,001	NS	NS
<b>A<sup>2</sup></b>	< 0,0001	NS	0,0002
<b>B<sup>2</sup></b>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<b>C<sup>2</sup></b>	< 0,0001	0,0005	0,0121
<b>Falta de ajuste</b>	0,2520	0,3032	0,3143
<b>R<sup>2</sup></b>	0,8154	0,4598	0,8429
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	0,7890	0,4183	0,8205

Se consideró un nivel de confianza del 95% (valor  $p < 0,05$ )

Cuando el modelo resultó estadísticamente significativo y la falta de ajuste fue aceptable (valor  $p > 0,05$ ), se generaron las gráficas de superficie de respuesta para evaluar la variación de la respuesta respecto a los tres factores del experimento (**Figura 5.17**, **Figura 5.18** y **Figura 5.19**). Los valores atípicos fueron identificados a través del test de Cook, y eliminados del análisis de correlación.

En la **Tabla 5.4** se presentan los resultados del análisis de ANOVA para los modelos de cada respuesta. Los términos que resultaron estadísticamente significativos (valor  $p < 0,05$ ) se incorporaron como parte del modelo.

Las ecuaciones resultantes de los modelos para cada una de las respuestas se muestran a continuación (Ecuaciones **(5.6)**, **(5.7)** y **(5.8)**).

$$Pb_{extraido} \left( \frac{\mu g Pb}{planta} \right) = -20,17 + 0,491 \times Pb + 0,296 \times Cr + 0,167 \times Ni + \quad (5.6)$$

$$5,49 \times 10^{-04} \times Cr \times Ni - 9,02 \times 10^{-04} \times Pb^2 - 1,01 \times 10^{-03} \times Cr^2 - 8,56 \times 10^{-04} \times Ni^2$$

$$Cr_{extraido} \left( \frac{\mu g Cr}{planta} \right) = 2,851 + 0,106 \times Cr + 0,095 \times Ni - \quad (5.7)$$

$$2,73 \times 10^{-04} \times Cr^2 - 2,17 \times 10^{-04} \times Ni^2$$

$$Ni_{extraido} \left( \frac{\mu g Ni}{planta} \right) = -105,269 + 0,6998 \times Pb + 0,677 \times Cr + 1,184 \times Ni - \quad (5.8)$$

$$1,17 \times 10^{-03} \times Pb \times Ni - 1,64 \times 10^{-03} \times Pb^2 - 1,83 \times 10^{-03} \times Cr^2 - 1,07 \times 10^{-03} \times Ni^2$$

Como se observa en la **Tabla 5.4**, todos los modelos resultaron estadísticamente significativos. No se evidenciaron faltas de ajuste en ninguno de los casos (valor  $p > 0,05$ ). Los coeficientes de regresión para las tres respuestas presentaron valores aceptables, a excepción del modelo para la extracción de Cr, donde estos valores fueron bajos. Como se observa en la Ec. **(5.6)**, todos los factores representaron una influencia positiva en la extracción de Pb en los tejidos aéreos a concentraciones bajas del metal (término lineal de Pb, Cr y Ni en suelo), con una influencia negativa a concentraciones mayores (términos cuadráticos).

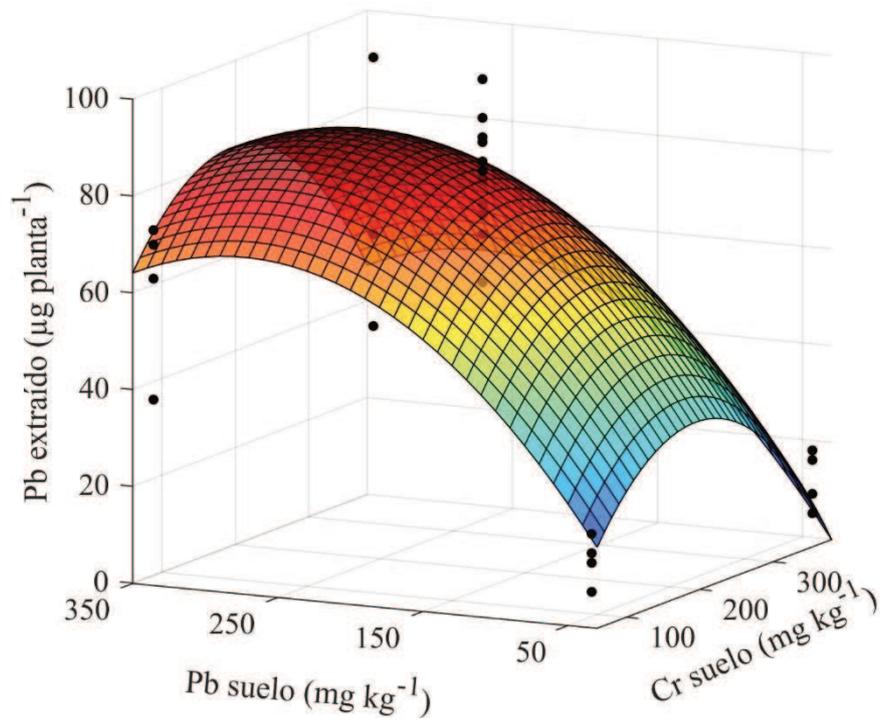
En el caso de la extracción de Pb, el proceso evidenció tener un fuerte impacto del término lineal de Pb, y de los términos cuadráticos del agregado de los tres metales, en segunda medida. Esto se condice con lo observado en forma individual, cuando se analizaron los resultados de las diferentes respuestas por pares de tratamientos similares, por ejemplo, entre B e I, y entre E y F, donde la única diferencia entre ellos es el agregado de Ni (en I y F). En ambos casos, se observó que la acumulación de Pb en los tejidos aéreos fue mayor en los dos tratamientos en donde no se agregó Ni, respecto a los que sí.

La remoción de Cr se vio impactada principalmente, y en forma negativa (**Tabla 5.4** y Ec. (5.7) por el término cuadrático del agregado de Cr. Además, los términos lineales y cuadráticos del agregado de Ni parecieron tener una influencia significativa en el proceso de extracción de Cr. Sin embargo, el  $R^2$  del modelo de regresión fue bajo para este caso (0,4598).

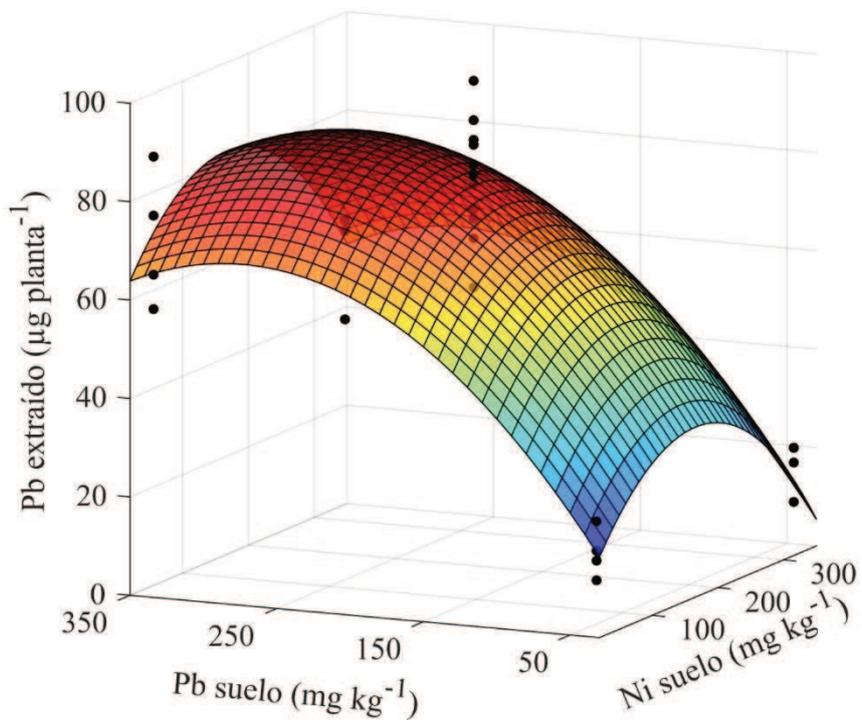
En cuanto a la remoción de Ni, la influencia de su agregado al suelo fue significativamente mayor (valor  $p < 0,0001$ ) que el efecto de la presencia del resto de los metales, y se evidenció una interacción importante entre los niveles de agregado de Pb y Ni (valor  $p = 0,0035$ ).

A partir de las expresiones matemáticas que relacionaron las respuestas con los factores del modelo, se representaron las superficies de respuestas que expresan la cantidad de metal extraído por planta través de los tejidos aéreos (en  $\mu\text{g MP planta}^{-1}$ ) en función de la cantidad de metal en el suelo (**Figura 5.17, Figura 5.18 y Figura 5.19**).

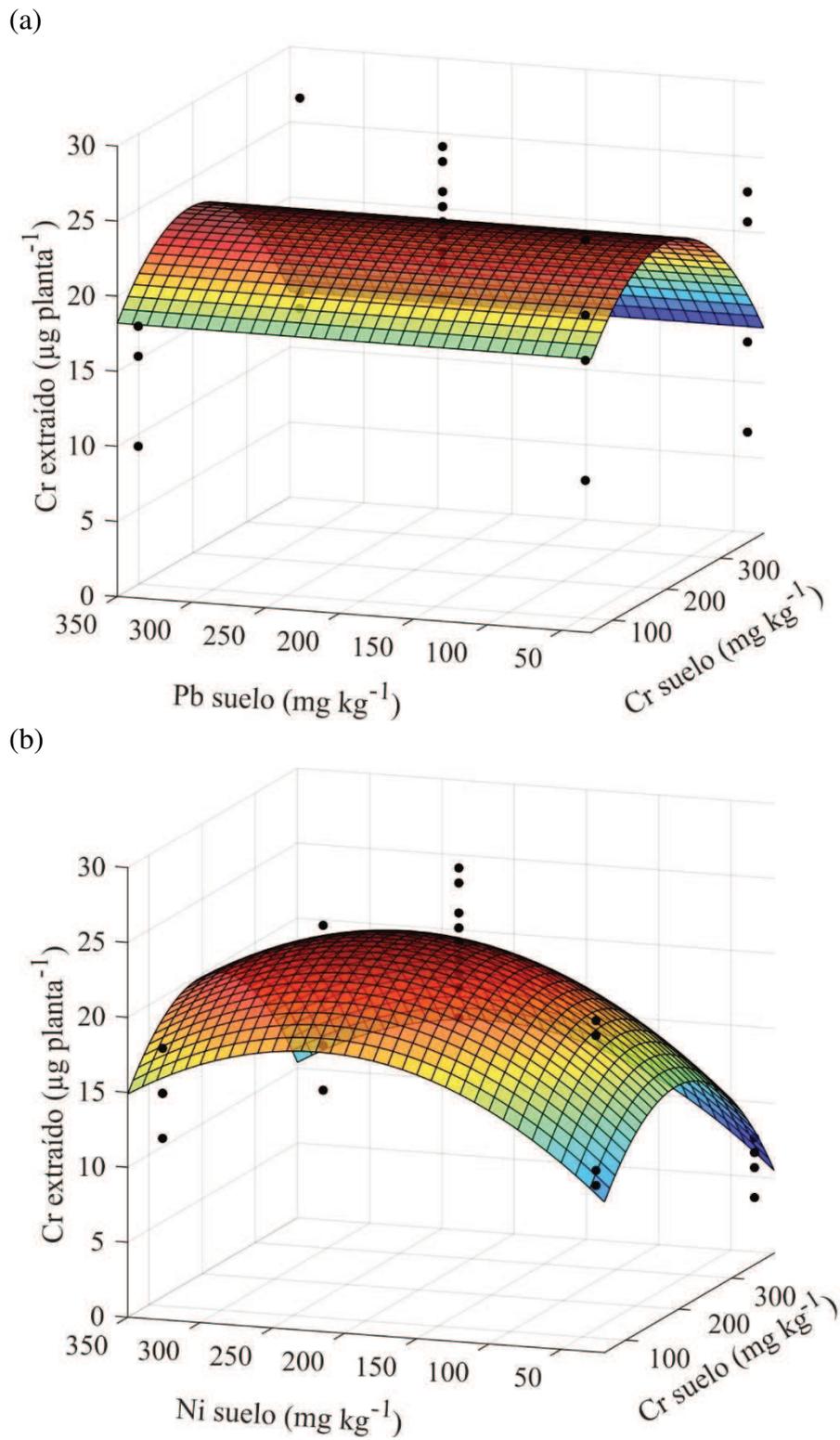
(a)



(b)



**Figura 5.17.** Pb extraído a través de los tejidos aéreos en función de la cantidad de (a) Pb y Cr, y (b) Pb y Ni agregados al medio.



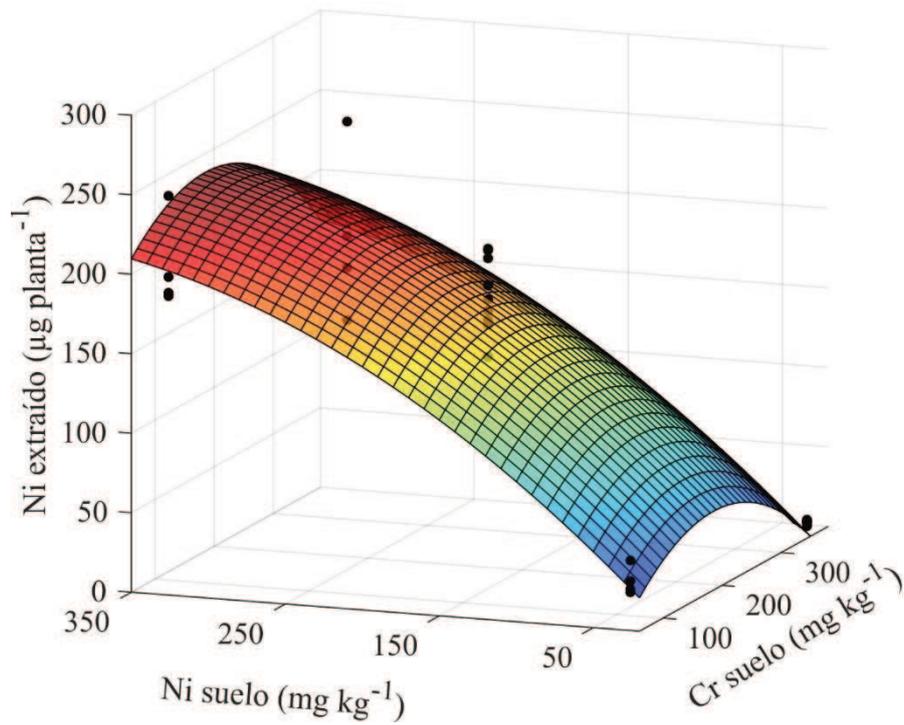
**Figura 5.18.** Cr extraído a través de los tejidos aéreos en función de la cantidad de (a) Cr y Pb, y (b) Cr y Ni agregados al medio.

Como se observa en la **Figura 5.17** a medida que el agregado de Pb fue mayor, la cantidad de Pb extraído a través de los tejidos también se incrementó. Por otro lado, si bien pareciera existir un máximo de extracción dentro de la región experimental planteada, el mismo se encuentra cercano a las fronteras experimentales, por lo que una contaminación mayor podría ser explorada en futuros estudios, de ser necesario.

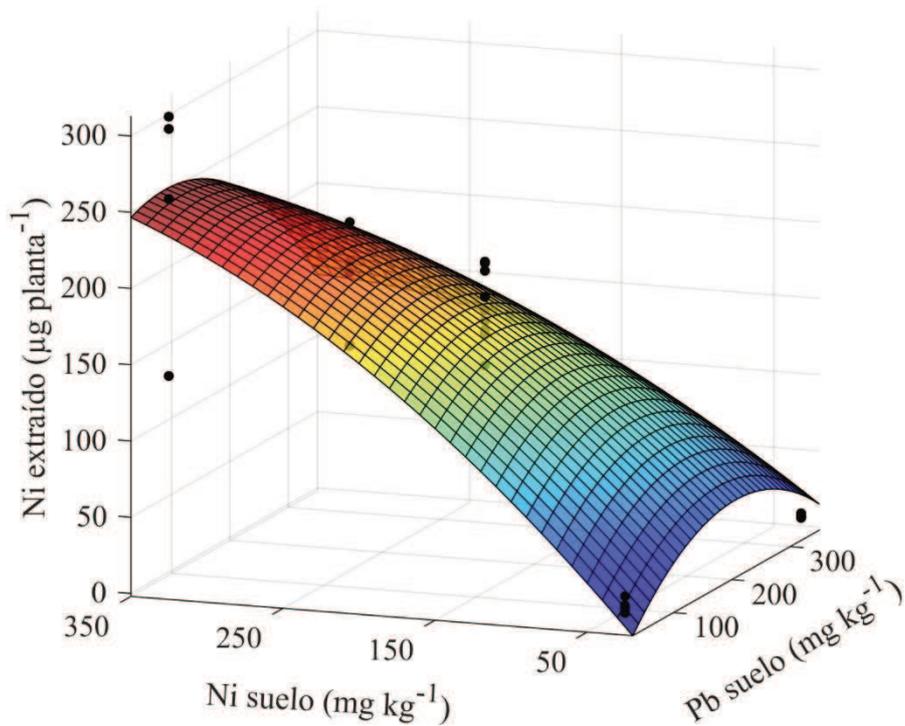
Respecto a la remoción de Cr (**Figura 5.18**), si bien se visualiza una baja correlación de los datos con el modelo también es posible observar que existe una zona de máxima extracción abarcada por las fronteras experimentales estudiadas, por lo que podría predecirse que la planta de *N. alata* no se comportaría en forma diferente aunque se ampliaran los límites de contaminación (de hecho, la tendencia es a reducir la cantidad extraída conforme aumenta el Cr en el medio, posiblemente por los efectos perjudiciales del Cr).

En cuanto a la remoción de Níquel (**Figura 5.19**), los valores y el modelo obtenido mostraron una fuerte dependencia con el agregado de Ni al sustrato, evidenciando que los límites de mayor remoción no fueron alcanzados y que deberían explorarse niveles de contaminación mayores a los evaluados para maximizar la cantidad de metal extraído. Por otro lado, se observa una fuerte interacción del agregado de Ni y Pb, principalmente en niveles altos de contaminación y en sentido negativo. Esto podría deberse a una posible competencia entre estos metales en los mecanismos de absorción o a una disminución en la biomasa aérea a causa de la toxicidad conjunta de los metales.

(a)



(b)



**Figura 5.19.** Ni extraído a través de los tejidos aéreos en función de la cantidad de (a) Ni y Cr, y (b) Ni y Pb agregados al medio.

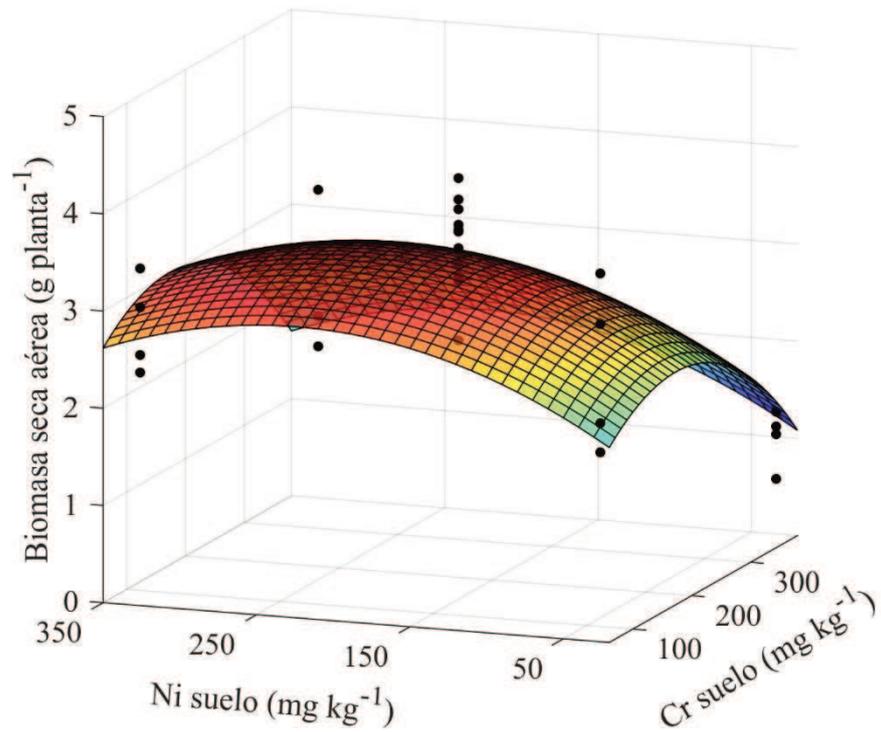
#### **5.4.5. Evaluación de la influencia del agregado de metales en la generación de biomasa**

De la misma forma que con la extracción de metales, se buscó evaluar la influencia de los diferentes niveles de contaminación en la generación de biomasa. Como variable representativa del crecimiento de la planta se evaluó la generación de biomasa total, de raíz y aérea de la planta. Los términos que tuvieron principal influencia en la variación de biomasa aérea y total fueron los términos lineales y cuadráticos de los factores Cr y Ni en suelo. Sin embargo, es importante destacar que no hubo una buena correlación de los datos experimentales con los ajustes de regresión realizados para ninguna de las tres variables analizadas, obteniéndose coeficientes de regresión muy bajos.

En la **Figura 5.20** se muestra el ajuste para la generación de biomasa aérea, que es la variable principal implicada en el proceso de remoción de MP por fitoextracción y la que mejor ajuste exhibió. Los términos lineales de Ni y Cr tuvieron una influencia positiva en la generación de biomasa aérea (expresada en base seca), y los términos cuadráticos influyeron negativamente. De esta forma, valores bajos de Ni y Cr en suelo, promovieron el crecimiento de *N. alata* hasta ciertos niveles, donde un incremento en los mismos generó una inhibición del crecimiento. En función de los valores  $p$  y los coeficientes de regresión obtenidos, podría decirse que los efectos negativos del Cr, fueron mucho más significativos que los de Ni.

Por otro lado, para el caso de la generación de biomasa de tejidos de raíces, sólo fue significativa la influencia del agregado de Cr al suelo, en forma negativa.

(a)



(b)

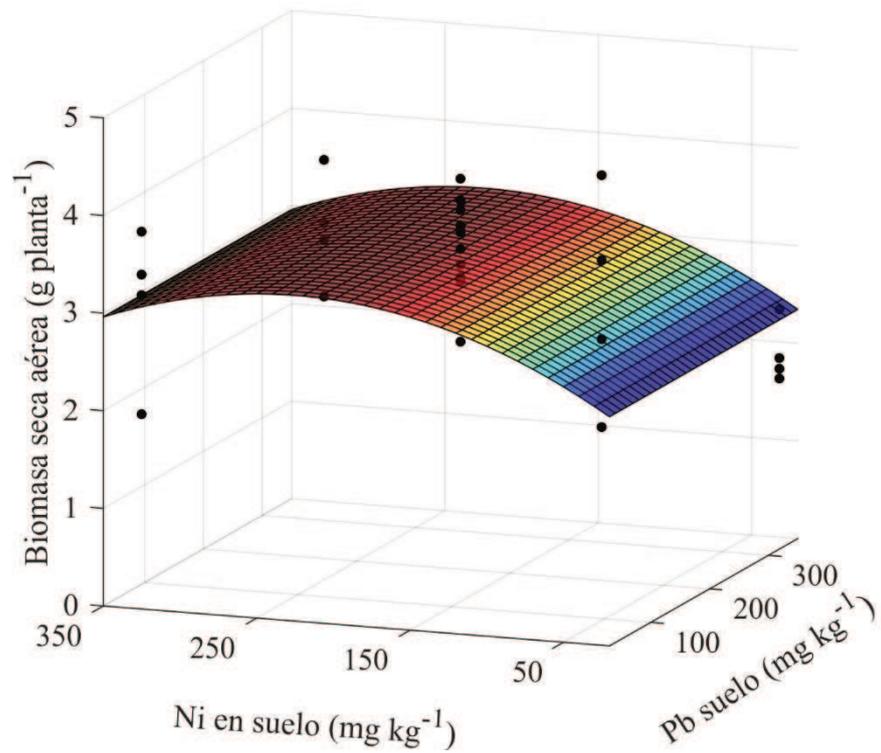


Figura 5.20. Superficie de respuesta de la biomasa seca aérea de *Nicotiana alata* L. en función de Pb, Cr y Ni en suelo

**Tabla 5.5.** Coeficientes estimados y resultados de ANOVA para el ajuste de cada respuesta

<b>Término</b>	<b>PS aéreo</b>	<b>PS planta</b>	<b>PS raíz</b>
<b>Modelo</b>	< 0,0001	< 0,0001	0,0018
<b>A-Pb</b>	NS	NS	NS
<b>B-Cr</b>	0,0073	0,0005	0,0018
<b>C-Ni</b>	0,0084	0,0656	NS
<b>Pb × Cr</b>	NS	NS	NS
<b>Pb × Ni</b>	NS	NS	NS
<b>Cr × Ni</b>	NS	NS	NS
<b>A<sup>2</sup></b>	NS	NS	NS
<b>B<sup>2</sup></b>	0,0004	< 0,0080	NS
<b>C<sup>2</sup></b>	0,0045	0,0410	NS
<b>Falta de ajuste</b>	0,2834	0,4098	0,6602
<b>R<sup>2</sup></b>	0,4259	0,3720	0,1664
<b>R<sup>2</sup> Ajustado</b>	0,3808	0,3217	0,1510

$$PS_{aereo} \left( \frac{g MS}{planta} \right) = 1,277 + 0,01058 \times Cr + 0,01063 \times Ni - 3,06 \times 10^{-05} \times Cr^2 - 2,37 \times 10^{-05} \times Ni^2 \quad (5.9)$$

$$PS_{planta} \left( \frac{g MS}{planta} \right) = 3,001 + 0,0117 \times Cr + 0,0142 \times Ni - 4,213 \times 10^{-05} \times Cr^2 - 3,21 \times 10^{-05} \times Ni^2 \quad (5.10)$$

$$PS_{raiz} \left( \frac{g MS}{planta} \right) = 2,122 - 2,8015 \times 10^{-03} \times Cr \quad (5.11)$$

#### **5.4.6. Evaluación de las respuestas a través del análisis de correlaciones y componentes principales**

En una primera instancia se aplicó un análisis de correlaciones para evaluar si existía una correlación entre las diferentes variables observadas durante el experimento (**Tabla 5.6**).

De dicho análisis se puede destacar la dependencia entre prácticamente todas las variables de crecimiento, donde un incremento, por ejemplo, de la biomasa aérea, tuvo aparejado un incremento de los tejidos radiculares y en al área foliar total de la planta.

Otro aspecto para destacar es la fuerte dependencia de la cantidad de cromo extraído con las variables de crecimiento (coeficientes entre 0,6 y 0,9), más que con la concentración de cromo en el suelo. Esto podría tener relación con la baja acumulación de Cr en los tejidos aéreos para todos los tratamientos en forma indistinta, lo que provocó que la mayor influencia en el proceso de extracción de Cr estuviera relacionada con la capacidad de generación de biomasa por parte de la planta ante las distintas condiciones de contaminación.

Del análisis de correlación entre las respuestas bioquímicas al momento de la cosecha, se observó una correlación entre el contenido de MDA y de la actividad de peroxidasa de guayacol (coeficiente de 0,6).

**Tabla 5.6.** Matriz de correlaciones entre diferentes variables de la planta

	N	H tallo	L raíz	PF R	PF aéreo	AF	CAT	GPX	Clor. Tot.	MDA	AST	PST	Pb aer.	Cr aer.	Ni aer.	Pb R	Cr R	Ni R	Pb ext.	Cr ext.	Ni ext.
N	<b>1,0</b>	0,2	0,2	0,3	0,4	0,4	-0,2	-0,2	-0,1	0,2	-0,3	-0,1	-0,1	-0,2	0,1	-0,2	-0,2	0,0	0,0	0,3	0,1
H tallo	0,2	<b>1,0</b>	0,4	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	0,5	-0,2	0,1	0,1	0,0	-0,1	-0,1	0,0	0,1	0,2	0,1	0,0	0,2	0,3	<b>0,6</b>	0,3
L raíz	0,2	0,4	<b>1,0</b>	0,2	0,2	0,2	-0,2	-0,2	0,0	-0,1	-0,1	-0,1	0,0	0,1	0,3	-0,1	-0,3	0,3	0,2	0,3	0,3
PF R	0,3	<b>0,6</b>	0,2	<b>1,0</b>	<b>0,8</b>	<b>0,8</b>	-0,2	-0,1	-0,1	0,2	-0,4	-0,1	0,0	0,2	0,2	0,0	-0,1	0,1	0,4	<b>0,8</b>	0,4
PF aéreo	0,4	<b>0,6</b>	0,2	<b>0,8</b>	<b>1,0</b>	<b>0,9</b>	-0,1	-0,2	-0,1	0,3	-0,3	-0,1	-0,1	0,2	0,2	-0,1	-0,2	0,1	0,4	<b>0,9</b>	0,4
AF	0,4	0,5	0,2	<b>0,8</b>	<b>0,9</b>	<b>1,0</b>	-0,2	-0,2	-0,1	0,2	-0,4	-0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,5	<b>0,8</b>	0,3
CAT	-0,2	-0,2	-0,2	-0,2	-0,1	-0,2	<b>1,0</b>	0,1	-0,1	0,3	0,4	0,3	-0,1	-0,2	-0,3	-0,2	-0,1	-0,3	-0,2	-0,2	-0,2
GPX	-0,2	0,1	-0,2	-0,1	-0,2	-0,2	0,1	<b>1,0</b>	0,2	<b>0,6</b>	0,0	0,2	0,0	0,2	-0,1	0,1	0,1	0,0	-0,1	-0,1	-0,1
Clor. Tot.	-0,1	0,1	0,0	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	0,2	<b>1,0</b>	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,4	0,1	0,1	0,4	0,0	0,0	0,3
MDA	0,2	0,0	-0,1	0,2	0,3	0,2	0,3	<b>0,6</b>	0,1	<b>1,0</b>	-0,6	0,0	0,2	0,0	0,1	0,2	0,3	0,0	0,2	0,2	0,1
AST	-0,3	-0,1	-0,1	-0,4	-0,3	-0,4	0,4	0,0	0,0	-0,6	<b>1,0</b>	0,2	-0,1	-0,2	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,2	-0,4	-0,1
PST	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,2	0,3	0,2	0,2	0,0	0,2	<b>1,0</b>	-0,1	0,0	0,1	-0,1	0,1	0,1	-0,2	-0,1	0,1
Pb aer.	-0,1	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,1	-0,1	0,0	0,0	0,2	-0,1	-0,1	<b>1,0</b>	0,1	-0,2	<b>0,9</b>	0,3	-0,2	<b>0,8</b>	-0,1	-0,2
Cr aer.	-0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	-0,2	0,2	0,0	0,0	-0,2	0,0	0,1	<b>1,0</b>	0,4	0,1	0,4	0,4	0,2	0,5	0,4
Ni aer.	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	-0,3	-0,1	0,4	0,1	-0,1	0,1	-0,2	0,4	<b>1,0</b>	-0,1	0,0	<b>1,0</b>	0,0	0,4	<b>0,9</b>
Pb R	-0,2	0,1	-0,1	0,0	-0,1	0,1	-0,2	0,1	0,1	0,2	-0,1	-0,1	<b>0,9</b>	0,1	-0,1	<b>1,0</b>	0,6	-0,1	<b>0,7</b>	-0,1	-0,1
Cr R	-0,2	0,0	-0,3	-0,1	-0,2	0,0	-0,1	0,1	0,1	0,3	-0,1	0,1	0,3	0,4	0,0	0,6	<b>1,0</b>	0,1	0,2	0,0	0,0
Ni R	0,0	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	-0,3	0,0	0,4	0,0	-0,1	0,1	-0,2	0,4	<b>1,0</b>	-0,1	0,1	<b>1,0</b>	0,0	0,4	<b>0,9</b>
Pb ext.	0,0	0,3	0,2	0,4	0,4	0,5	-0,2	-0,1	0,0	0,2	-0,2	-0,2	<b>0,8</b>	0,2	0,0	<b>0,7</b>	0,2	0,0	<b>1,0</b>	0,4	0,1
Cr ext.	0,3	<b>0,6</b>	0,3	<b>0,8</b>	<b>0,9</b>	<b>0,8</b>	-0,2	-0,1	0,0	0,2	-0,4	-0,1	-0,1	0,5	0,4	-0,1	0,0	0,4	0,4	<b>1,0</b>	<b>0,6</b>
Ni ext.	0,1	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	-0,2	-0,1	0,3	0,1	-0,1	0,1	-0,2	0,4	<b>0,9</b>	-0,1	0,0	<b>0,9</b>	0,1	<b>0,6</b>	<b>1,0</b>

\*aer.: aéreo; R: en/de raíces; ext.: Extraído a través de los tejidos aéreos; Clor. Tot.: clorofilas totales; PF: peso fresco; H: Altura, L: Longitud; AF: área foliar

Debido a la cantidad de tratamientos, se representaron en forma diferenciada distintos conjuntos de grupos, con el fin de poder evaluar la separación o no entre grupos, y la influencia de las distintas variables en estas separaciones.

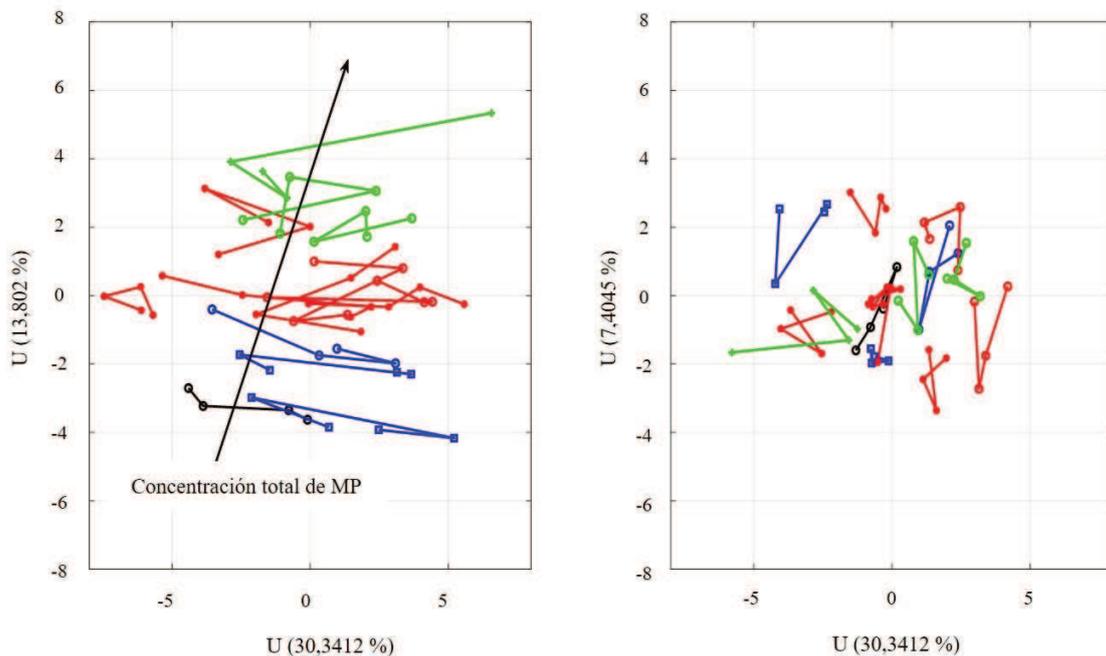
A priori, no se logró observar separaciones entre grupos pertenecientes a distintos tratamientos. Sin embargo, al identificar cada punto muestral en función de la suma total de los agregados individuales de MP, pudo distinguirse una separación entre estos grupos. En la **Figura 5.21** se representa el análisis de componentes principales para todos los grupos, diferenciándolos en función de la cantidad total de metal agregado al sustrato al inicio del experimento, sin diferenciar el tipo de metal. Por consiguiente, los puntos experimentales se dividen en cuatro grandes grupos, con un agregado total de 0, 150, 450 y 750 mg kg<sup>-1</sup> de metales pesados.

Como se puede observar en **Figura 5.21**, la gráfica muestra una separación de estos grupos en la dirección de la segunda componente principal, que explica un 13,8% de la varianza.

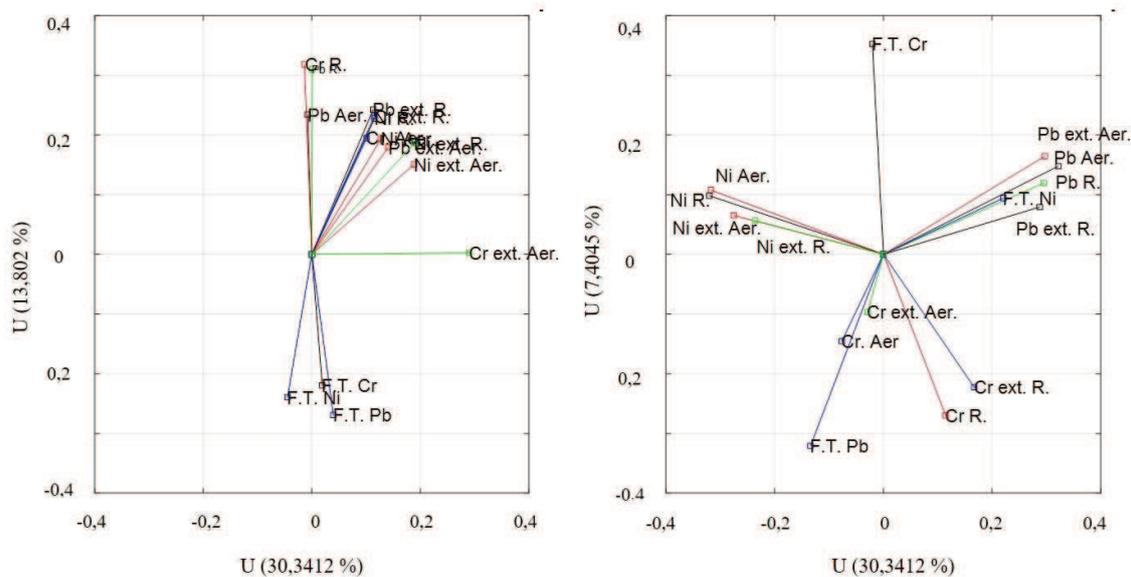
En cuanto a las variables que explican la variabilidad en la segunda componente, se encuentran todas las respuestas relacionadas a la concentración de metal extraído, a excepción del cromo (**Figura 5.22**). Esto podría explicar que, en general, estas variables tuvieron un incremento no sólo respecto al metal evaluado en el suelo, sino que respecto a la concentración total de metales en el suelo. La dependencia negativa de los factores de translocación estaría indicando que la influencia de la cantidad de metales total en el suelo es mayor en los tejidos de raíces que en la parte aérea, a la vez que existe una dependencia positiva con la concentración de metales en los tejidos. Por otro lado, sí se observa una contribución importante a la componente 2 del contenido de pigmentos fotosintéticos, indicando que esta variable se vio especialmente influenciada por la

cantidad de metal en los sustratos (**Figura 5.23**). Otros autores explican la reducción del proceso fotosintético por la disminución del contenido de clorofilas en plantas expuestas a MP (Khan et al, 2020b). En nuestro caso, si bien a nivel de tratamiento individual sólo se observó un efecto claro para el tratamiento "J" con un alto nivel de cromo en el medio de crecimiento, del análisis de correlaciones y ACP, se podría inferir que el incremento conjunto de MP podría tener efectos negativos en su concentración en hojas.

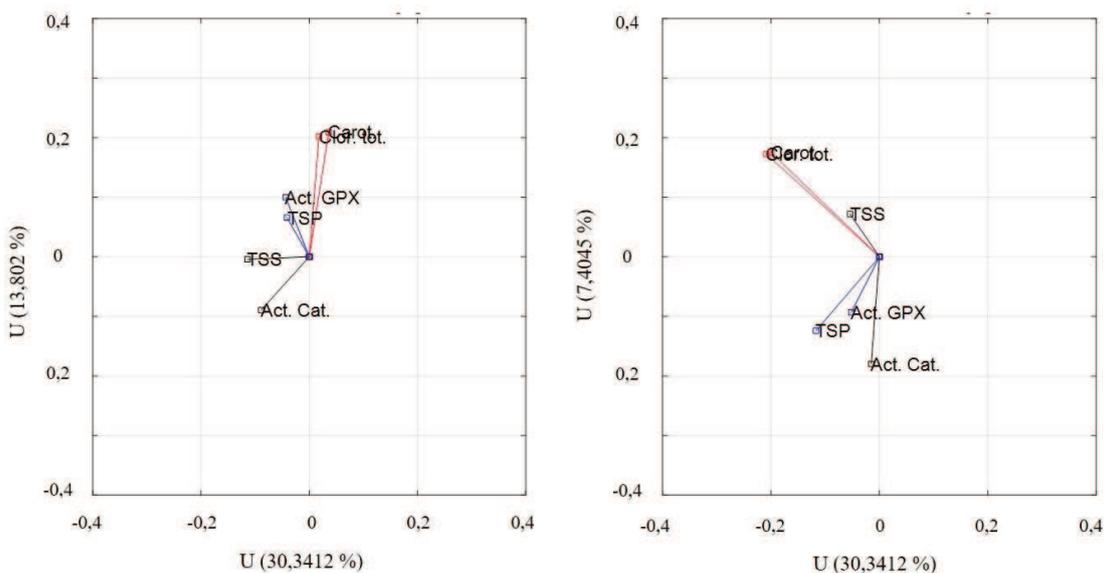
A su vez, la actividad GPX tuvo una contribución positiva a la segunda componente principal, pudiendo relacionar su incremento a un mayor grado de contaminación, que coincide en una correlación con el incremento de contenido de MDA, como posible resultado del daño intracelular de la peroxidación lipídica.



**Figura 5.21. Análisis de la separación de grupos en función de la cantidad total de metales agregados: negro 0, azul: 150, rojo: 450, verde 750 mg kg<sup>-1</sup>**



**Figura 5.22. Incidencia en las componentes principales de las variables relacionadas a la extracción de metales**

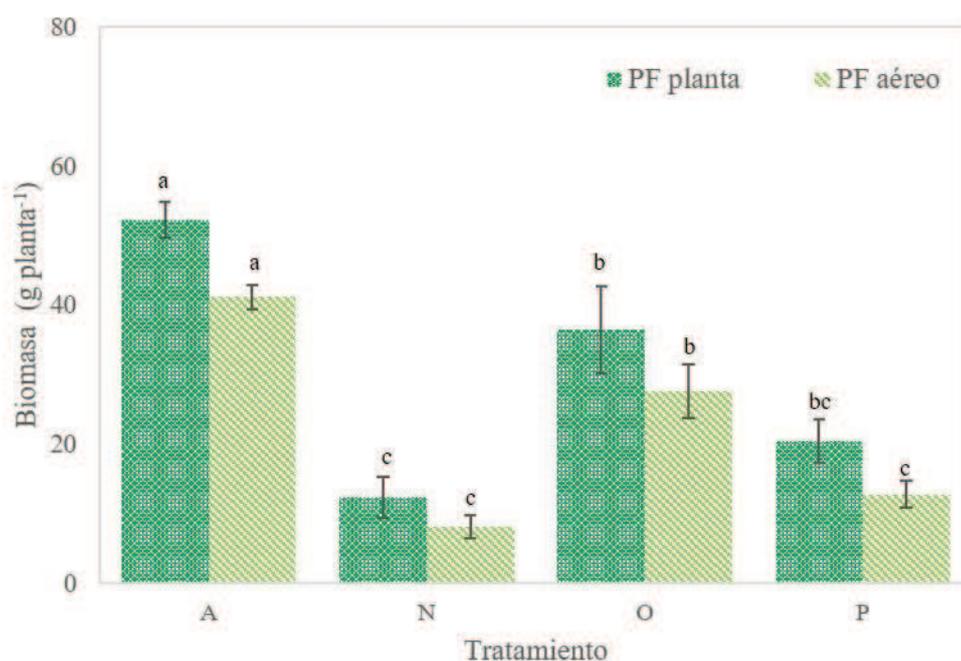


**Figura 5.23. Incidencia en las componentes principales de las variables bioquímicas y relacionadas al estrés en la planta**

#### 5.4.7. Comparación del tratamiento del punto central frente a controles

A fin de evaluar la influencia de la incorporación de lodo y de la adición de contaminantes en forma artificial se compararon los distintos controles frente al

tratamiento A, que representaba el punto central del diseño experimental propuesto. Los resultados se sometieron a un análisis ANOVA de un factor, con un nivel de confianza del 95%, y se aplicó el test de Tukey para realizar comparaciones múltiples con el fin de evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos.



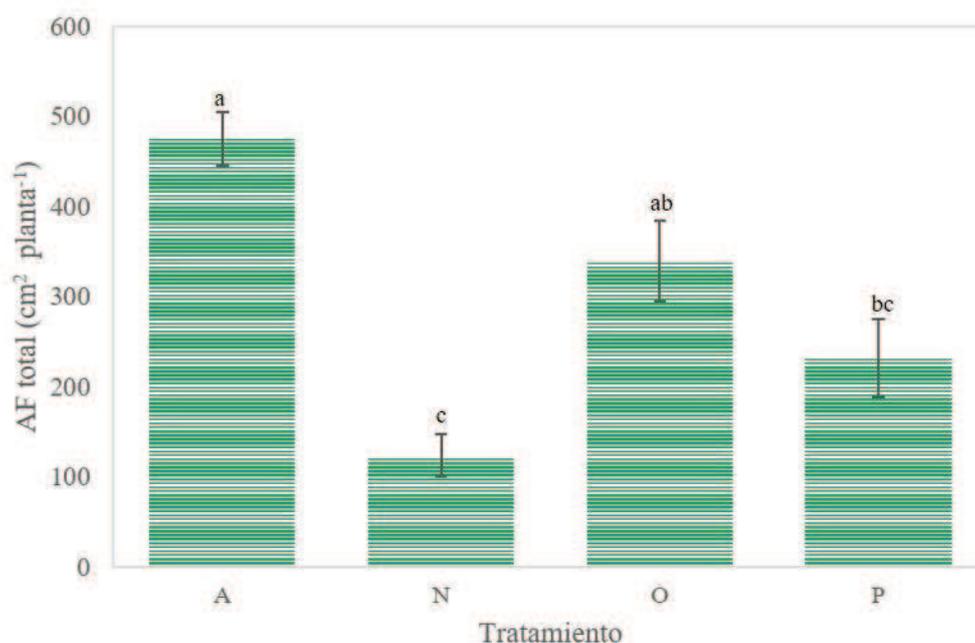
**Figura 5.24. Comparación de variables de crecimiento en sustratos del punto central “A” contra los distintos controles**

La incorporación de lodo a los sustratos, en concordancia con los resultados obtenidos en experiencias anteriores donde se evaluaron las respuestas frente a diferentes niveles de enmienda (Capítulo 4 y Abrile et al., 2021), generó un mayor rendimiento de biomasa vegetal (Figura 5.24). En el Anexo I se ilustra un ejemplar de cada tratamiento previo a la cosecha (Figura A.I.3.). Este crecimiento, asociado a una mayor concentración de metales en los tejidos vegetales aéreos, resultaría en una mejoría en la cantidad de MP finalmente extraídos del suelo. A la vez, el rendimiento de biomasa

también fue mayor en los tratamientos contaminados artificialmente (A y P), respecto a los no contaminados (O y N), aunque el efecto del lodo fue más significativo.

Los metales agregados artificialmente se incorporaron en forma de sales, aportando elementos aprovechables por las plantas como nitrógeno y azufre. Por lo tanto, el agregado de estos elementos podría ser un factor en parte condicionante para la mejora en el crecimiento en los tratamientos A y P, en contraste con lo sucedido en O y N, respectivamente, aunque el aporte de nitrógeno, por ejemplo, es muy inferior en estos casos respecto a lo que representa el agregado del lodo en el sustrato (aproximadamente 0,01% frente 0,6%). Chandrasekhar y Ray (2019) informaron que *Eclipta prostrata* L. generó más biomasa ante el incremento de Pb en los sustratos discutiendo que, si bien podía deberse al aumento en el suministro de N debido a su agregado como Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, también era un indicador de su tolerancia a este metal. En nuestro caso, el incremento en la biomasa podría ser un indicador de la tolerancia o el potencial de *N. alata* para sobrevivir en medios contaminados con estos tres metales. Sin embargo, el efecto positivo del agregado de metales al sustrato podría estar principalmente relacionado al agregado de Ni al medio, ya que el mismo también participa positivamente junto a otros metales esenciales en una serie de procesos biológicos, como parte de las proteínas transportadoras de electrones y como cofactores de numerosas enzimas (Sarwar et al., 2017).

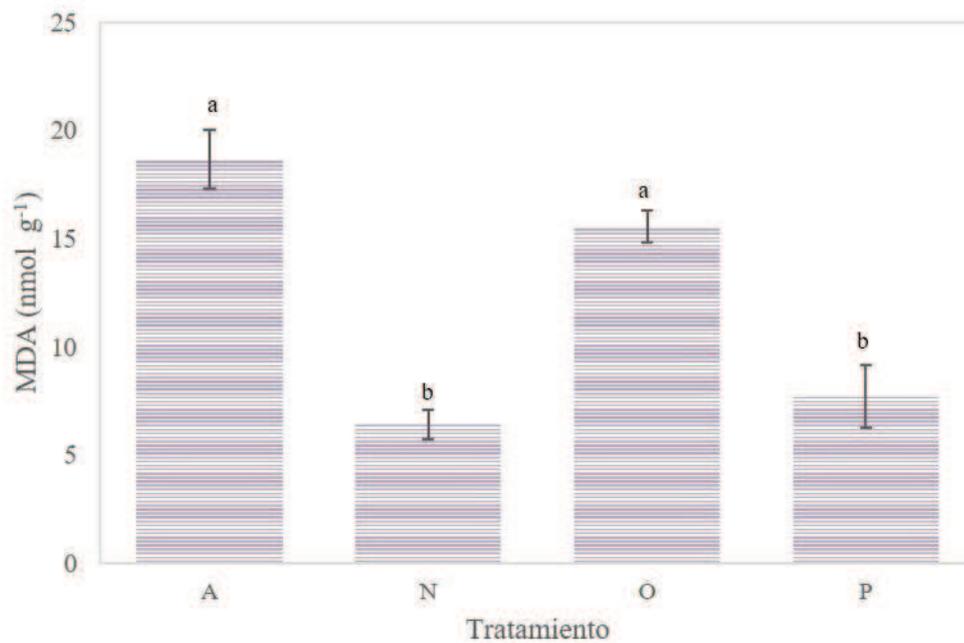
Un comportamiento similar sucedió con el área foliar total de la planta (**Figura 5.25**). Respecto a las clorofilas no se observaron diferencias significativas entre estos cuatro tratamientos.



**Figura 5.25. Comparación de los resultados de área foliar en plantas desarrolladas en sustratos del punto central “A” contra los distintos controles**

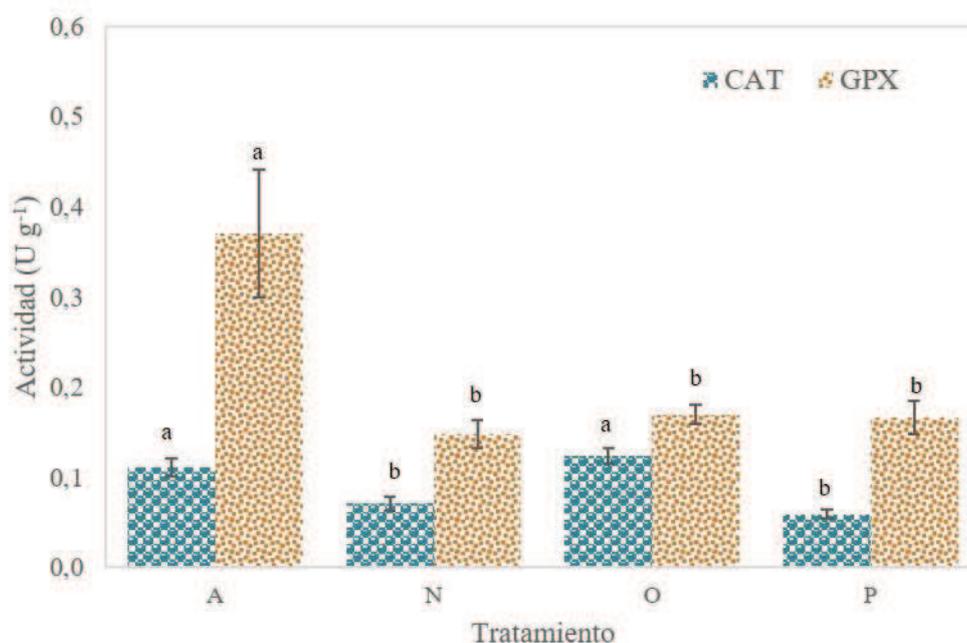
Si bien a nivel rendimiento de biomasa, área foliar y otros parámetros de crecimiento las plantas exhibieron mejor comportamiento en los tratamientos enmendados, los parámetros bioquímicos evaluados expresarían síntomas de estrés y respuestas asociadas a mecanismos de protección frente a condiciones de estrés abiótico. El contenido de MDA, uno de los productos principales derivados de la peroxidación lipídica, se vio incrementado en las plantas que correspondieron a los tratamientos enmendados (**Figura 5.26**). A su vez su contenido también fue mayor en los tratamientos contaminados artificialmente respecto a los que no, aunque en este caso no de forma estadísticamente significativa.

De la misma forma, tanto la actividad enzimática de catalasa (CAT) como la peroxidasa de guayacol (GPX) fueron mayores en los tratamientos enmendados, lo que mostró una respuesta de mecanismos antioxidantes frente a las condiciones de estrés impuestas (**Figura 5.27**).



**Figura 5.26. Comparación de los resultados del contenido de MDA en plantas desarrolladas en sustratos del punto central “A” contra los distintos controles**

En condiciones de estrés, la síntesis de enzimas antioxidantes puede incrementarse como respuesta de protección y cuando las condiciones son muy perjudiciales para la planta, la actividad enzimática puede inhibirse o reducirse. De esta forma, si bien se observaron síntomas de estrés, las condiciones no llegaron a ser lo suficientemente adversas como para inhibir los mecanismos antioxidantes.

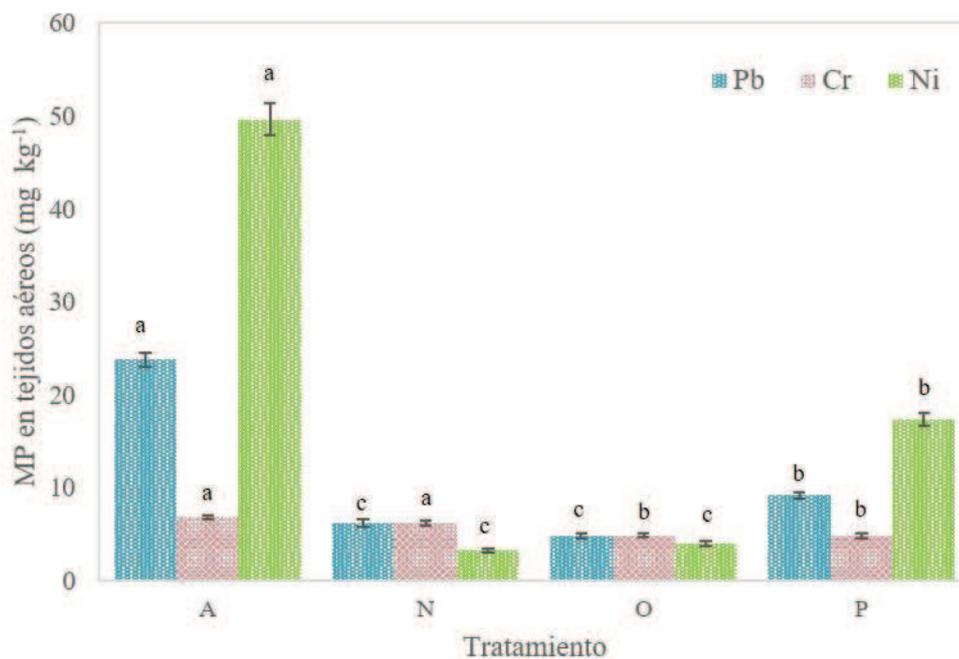


**Figura 5.27. Comparación de las actividades enzimáticas en plantas desarrolladas en sustratos del punto central “A” contra los distintos controles**

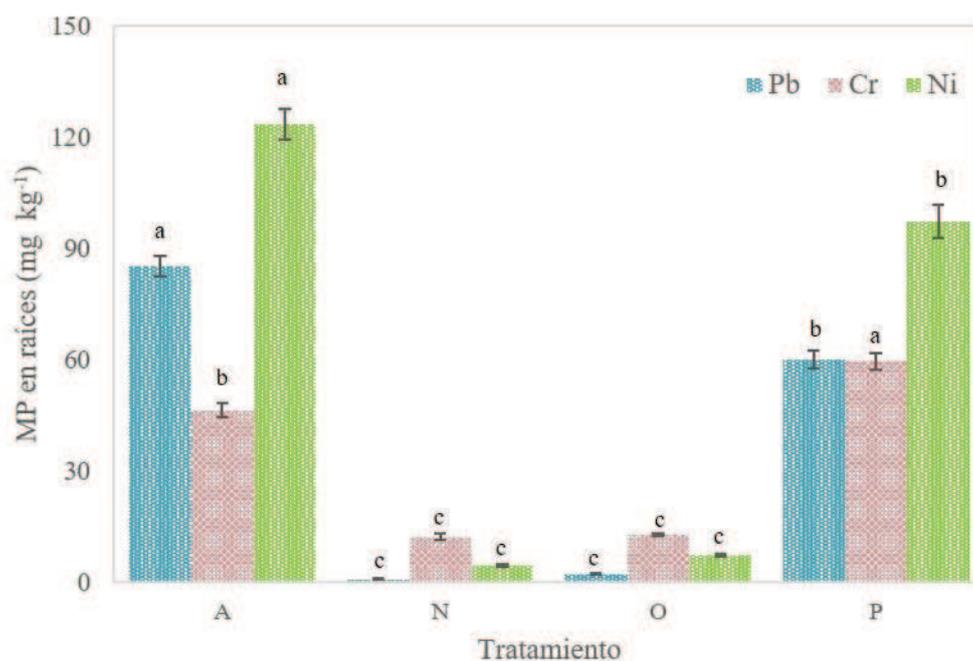
En cuanto a la remoción de metales, tanto el contenido de Ni como de Pb resultaron superiores en los tejidos aéreos y de raíces en los tratamiento enmendados con lodo, cuando estos fueron contaminados artificialmente (A frente a P) (**Figura 5.28** y **Figura 5.29**). Esto podría ayudar a explicar mejor las condiciones de estrés observadas anteriormente en el tratamiento A respecto del tratamiento P, como un mayor contenido de MDA y actividades enzimáticas superiores en las plantas cultivadas en sustratos con lodo. Si bien estas diferencias podrían deberse a la presencia del lodo en particular, también podría estar relacionado a la mayor acumulación de Ni y Pb observada en sus tejidos vegetales. Khan et al. (2019) reportaron que una mayor concentración de metales en los tejidos de *N.alata* indujo a un incremento en los niveles de MDA y de actividades enzimáticas de catalasa y de peroxidasa de guayacol. Amari et al. (2017) sostiene que el Cd, Ni y Pb afectan negativamente la funcionalidad de la membrana e inducen la

peroxidación lipídica, con aumentos en la producción de MDA como biomarcador de este proceso.

Los resultados expuestos respecto a la acumulación diferencial entre las plantas cultivadas en suelos enmendados (A) y en los sin enmendar (P), junto con los mayores rendimientos en biomasa observados en los primeros, muestran que el agregado de LR como enmienda permitiría una mayor extracción de los MP estudiados, no sólo por una concentración incrementada en sus tejidos sino también, por la promoción de un mayor crecimiento. Esto concuerda con lo informado por otros autores, quienes reportaron que la adición de diferentes fuentes de materia orgánica influía positivamente en la extracción de metales a través de los tejidos vegetales (Aihemaiti et al., 2018; Beesley et al., 2010; Schwab et al., 2007).



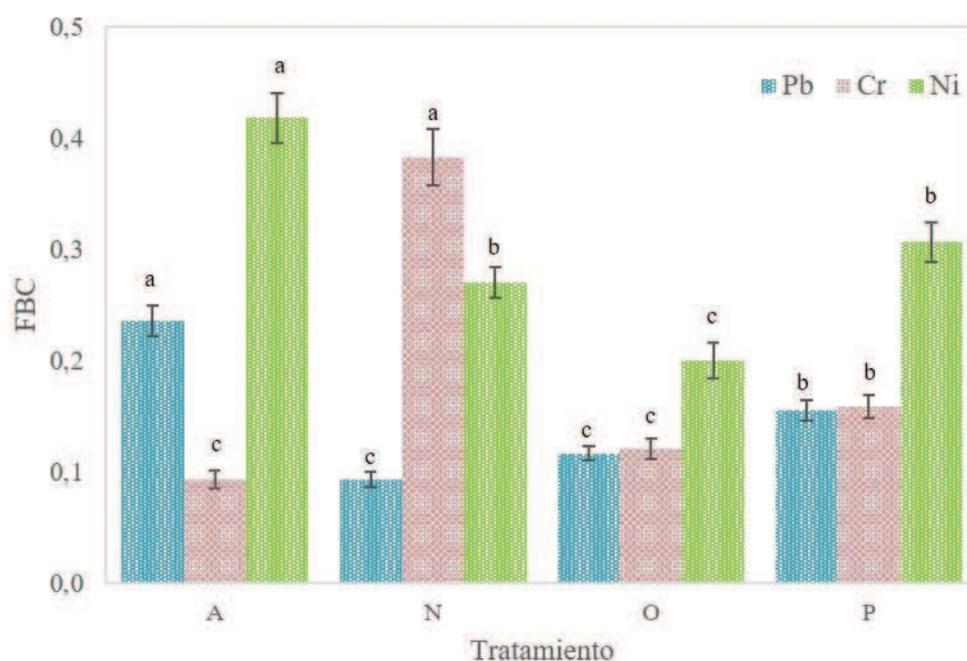
**Figura 5.28. Comparación del contenido de MP en tejidos aéreos de plantas del tratamiento “A” contra los distintos controles**



**Figura 5.29. Comparación del contenido de MP en raíces de plantas del tratamiento “A” contra los distintos controles**

Por otro lado, es importante destacar que, si bien corresponden a un mismo agregado de metales, la concentración final de metales al inicio del experimento es diferente, ya que depende de la carga contaminante del lodo y suelo (**Tabla A.I.1.**). Por este motivo, es importante evaluar el FBC, que relaciona la concentración de metales en los tejidos respecto a la concentración de MP en los suelos. Los resultados de esta variable para el tratamiento A y los controles (**Figura 5.30**) muestran que, efectivamente, la capacidad de absorber y traslocar Pb y Ni fue superior en el tratamiento enmendado, A (agregado de LR+contaminación), respecto a P (contaminado pero sin LR). Lo observado difiere en cuanto al comportamiento en la absorción de Cr, donde el FBC del tratamiento con enmienda y agregado de MP (A), fue menor al tratamiento sin enmienda (P) en forma estadísticamente significativa. Como se discutió en anteriores apartados, otros autores informaron al Cr como uno de los metales con menor movilidad en los suelos en comparación con Pb y Ni (Amari et al., 2017). Por otro lado, esta movilidad pudo haber

sido disminuida aun más en estos tratamientos por el aporte de materia orgánica a través del agregado de enmienda. Con su incorporación, se podría inducir a cambios en su estado de oxidación, a la formación de complejos con compuestos orgánicos y su adsorción a la superficie de partículas del sustrato, disminuyendo su movilidad y su biodisponibilidad (Chu et al., 2018; Deng et al., 2023).

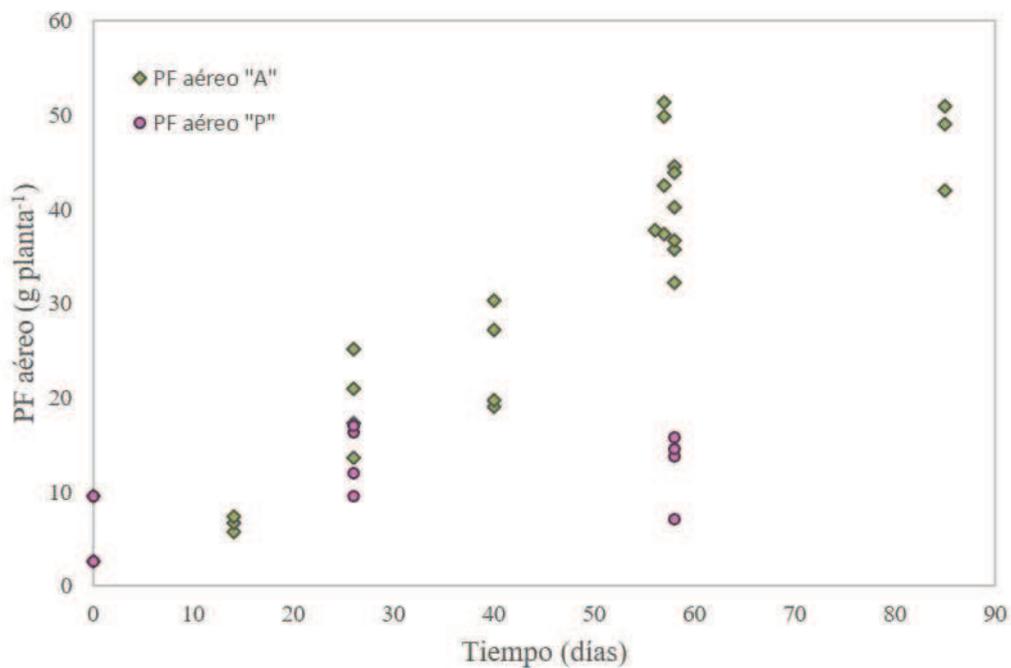


**Figura 5.30. Comparación del FBC de plantas del tratamiento “A” contra los distintos controles**

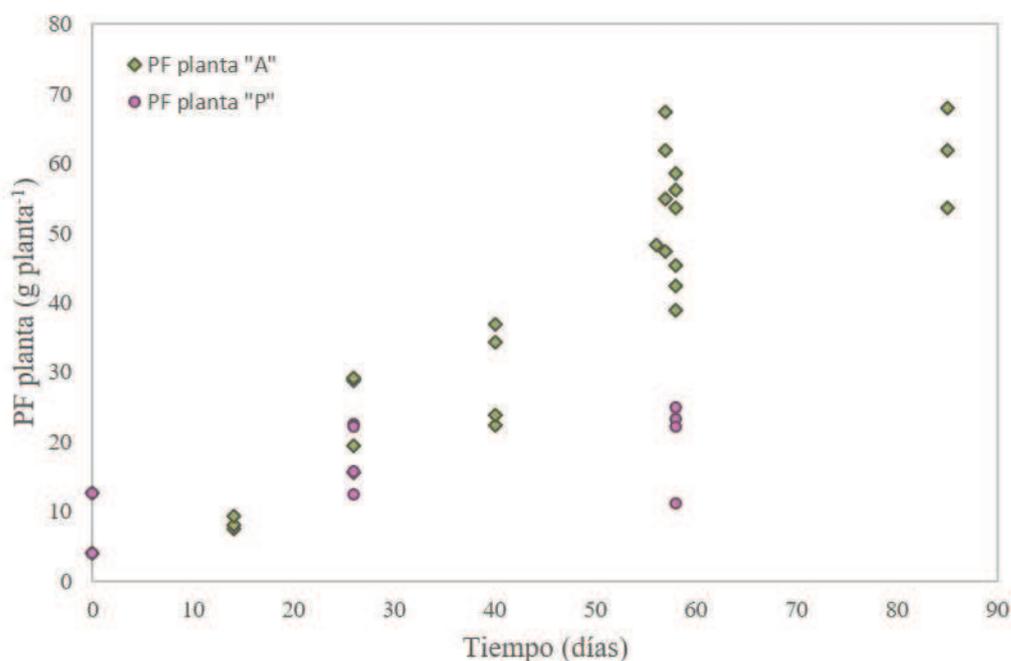
#### **5.4.8. Evolución de la biomasa vegetal y el contenido de MP en los tejidos a través del tiempo**

La evolución de generación de biomasa de *N. alata* se puede visualizar en las **Figuras 5.31 a 5.32**. Como se observa, el crecimiento de *N. alata* en el tratamiento A (20% de LR y agregado de Pb=150, Cr=150 y Ni=150 mg kg<sup>-1</sup> correspondiendo al punto central), se produjo hasta la cosecha del día 58, llegando a valores de tejido aéreo por encima de los 50 g planta<sup>-1</sup>, para luego permanecer en valores relativamente constantes

hasta el día 85 (**Figura 5.31**). Por otro lado, cuando se analizó la evolución de las plantas cultivadas bajo el tratamiento P (0% de LR y agregado de Pb=150, Cr=150 y Ni=150 mg kg<sup>-1</sup>), los valores de peso aéreo alcanzados fueron menores (aproximadamente la mitad), y la biomasa máxima se alcanzó en la cosecha de los 26 días, no encontrándose diferencias entre los muestreos a la 4ta y 8va semana.



**Figura 5.31. Evolución de la biomasa aérea en peso fresco de las plantas en los tratamientos A y P**



**Figura 5.32. Evolución de la biomasa total en peso fresco de las plantas en los tratamientos A y P**

Por otro lado, en las diferentes cosechas, se realizaron determinaciones de los MP en los tejidos vegetales, tal como se ilustra en las **Figuras 5.33 y 5.34**. Como se observa en las mismas, la concentración de metales pesados presentó variaciones a través del tiempo en los diferentes tejidos.

Cabe aclarar que, debido al poco material vegetal generado por las plantas en los tiempos intermedios de cosecha, el mismo se unificó en una sola muestra para cada tiempo y se realizó una única medida de concentración. Por otro lado, las concentraciones representadas como iguales a cero corresponden a determinaciones donde los resultados fueron menores a los límites de detección de la técnica aplicada.

En general, la concentración de MP en los tejidos aéreos aumentó hasta los 40 días, para luego estabilizarse en valores relativamente constantes. Cabe resaltar que las concentraciones representan ejemplares diferentes, ya que las plantas fueron cosechadas

en forma completa para cada determinación, encontrándose importantes dispersiones en los resultados.

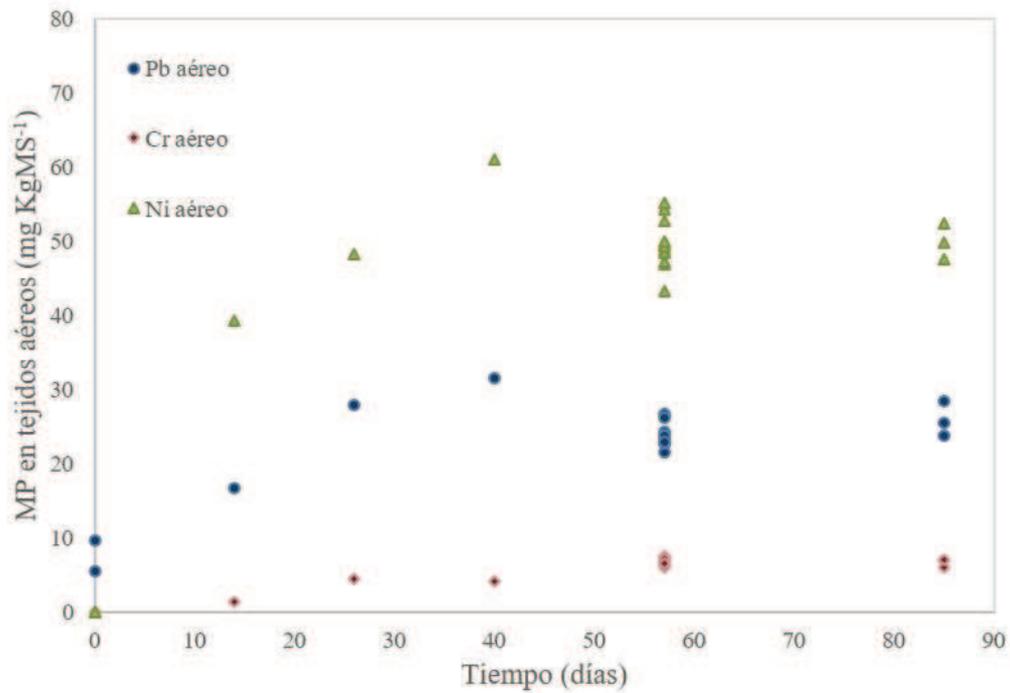


Figura 5.33. Evolución de los MP en los tejidos aéreos de las plantas bajo el tratamiento central A (agregado de Pb=150, Cr=150 y Ni=150 mg kg<sup>-1</sup>)

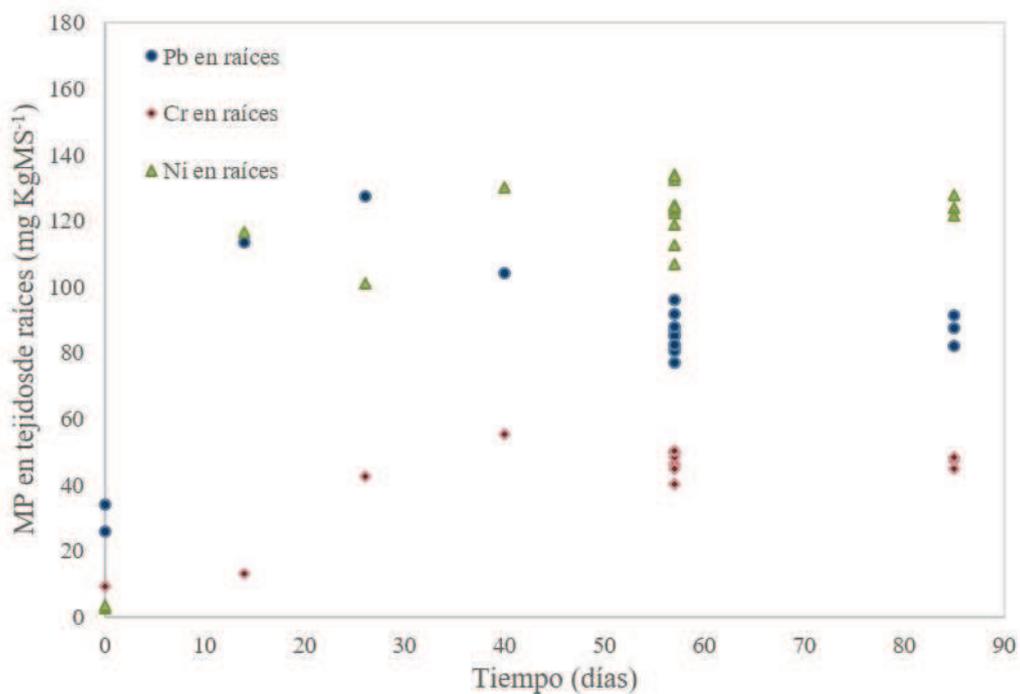


Figura 5.34. Evolución de los MP en las raíces de las plantas bajo el tratamiento central A (agregado de Pb=150, Cr=150 y Ni=150 mg kg<sup>-1</sup>)

Por otro lado, al tratarse de plantas germinadas previamente en sustratos diferentes, el tiempo “cero” hace referencia al momento de trasplante, por lo que la concentración inicial de cada uno de los metales, así como la biomasa de las plantas a ese tiempo, corresponden a las condiciones en las que se encontraban al momento del trasplante, post crecimiento en semilleros de sustrato comercial. Se puede observar que en los tejidos aéreos y de raíces, se detectaron niveles de Pb, a diferencia del Cr y Ni.

## 5.5. Conclusiones

La presencia de metales en concentraciones variables hace que la evaluación del proceso de fitorremediación requiera de la contemplación de estos posibles escenarios diferentes. En los experimentos desarrollados durante este capítulo se buscó evaluar la capacidad de fitorremediación de *N. alata* en suelos enmendados con lodos de relleno sanitario, ante distintos escenarios de contaminación por los principales metales pesados encontrados en el efluente (Pb, Cr y Ni).

De las respuestas evaluadas se pudo observar que las variables relacionadas a la extracción de metales estuvieron íntimamente relacionadas a la concentración de metal en el suelo. Se observaron efectos de interacción entre estos diferentes contaminantes, resaltando la importancia de su evaluación en conjunto, y no mediante análisis unidimensionales, muy presentes en la gran mayoría de los trabajos de la bibliografía relevada.

De los análisis de acumulación en los diferentes tejidos y de los factores de bioconcentración, que permiten tener en consideración el contenido de metales en el suelo a la hora de realizar interpretaciones, se podría indicar que, en general, *Nicotiana alata*

L. tuvo mayor afinidad para extraer y translocar Ni en sus tejidos, seguido por el Pb y por último Cr. Estas diferencias podrían estar relacionadas con determinadas funciones biológicas que efectivamente cumple el Ni en las plantas haciendo que exista cierta preferencia por su absorción. Además, esto podría estar también influenciado por la movilidad de cada uno de los metales en los suelos, reportándose en diferentes publicaciones que dicho movimiento en sustratos generalmente es Ni>Pb>Cr.

Por otra parte, también se puede resaltar la fuerte influencia de los distintos niveles de contaminación en el desarrollo vegetal, en particular el contenido de Cr y Ni, afectando principalmente a la biomasa aérea, relacionada a la capacidad de fitoextracción de la planta.

Los resultados expuestos respecto a la acumulación diferencial de MP entre los tratamientos correspondientes a suelos enmendado (A) y los sin enmendar (P), junto con los mayores rendimientos en biomasa observados en los tratamientos con enmienda, muestran que el agregado de LR como enmienda permitiría una mayor extracción de los MP estudiados, no sólo por una concentración mejorada en sus tejidos sino también, por la promoción de un mayor crecimiento.

Los resultados de las diferentes cosechas mostraron un crecimiento sostenido hasta el día 60, y una variación en la acumulación de MP en los tejidos hasta el día 40. Por otro lado, se pudo observar una evolución diferencial entre las plantas que crecieron en el tratamiento con enmienda, respecto al suelo solo.

## **Capítulo 6. Análisis del proceso de fitoextracción de Pb, Cr y Ni de *Nicotiana alata* L. en suelos enmendados**

### **6.1. Introducción**

El propósito del modelado es predecir la transferencia de contaminantes del suelo a las plantas (Pedron et al., 2017).

Durante el ciclo de vida de las plantas, existen distintas fases de crecimiento. En gran parte de los casos, se pueden distinguir tres fases: de aceleración temprana o crecimiento exponencial, fase lineal y fase de saturación para la maduración o de senescencia.

Como se describió en capítulos anteriores, la fitoextracción de metales pesados en suelos no sólo depende de la capacidad de la planta de bioacumularlos en sus tejidos, sino también de su rendimiento en biomasa en las condiciones de contaminación. Es por ello que el estudio de la generación de biomasa resulta una componente clave en la evaluación de la fitoextracción de MP.

Zhao et al. (2019) desarrollaron un modelo sigmoide para describir la absorción de metales pesados, utilizando el factor de bioconcentración (FBC) de las plantas, la tasa de generación de biomasa y la concentración de metales pesados en el suelo. Este estudio se basó en la hipótesis teórica de que la masa de metales pesados extraídos por planta es proporcional a la biomasa de la misma y, por lo tanto, la acumulación de metales pesados puede predecirse combinando la función de crecimiento sigmoide y el factor de bioacumulación. Los autores demostraron que el modelo fue útil en la predicción de la

absorción de metales en girasoles cultivados en suelos contaminados con Cd, Ni, Pb y Zn.

Por otro lado, la velocidad de una reacción química puede proporcionar información importante sobre el mecanismo y el comportamiento en el que se producen las interacciones biológicas en los sistemas vivos (Emiliani et al., 2020). Yaashikaa et al. (2019) evaluaron tres modelos cinéticos en la remoción de cromo mediante el cultivo de sorgo bicolor. Los modelos evaluados fueron de pseudo primer orden, pseudo segundo orden y el modelo cinético de Elovich, presentados con anterioridad en la sección 2.5.6. Se encontró que todos los modelos describieron bien la captación del metal, siendo el modelo de pseudo segundo orden el que mejor representó los resultados en el tiempo. Alaribe y Agamuthu (2019) estudiaron la remediación de suelos contaminados con distintas concentraciones de plomo (adicionado artificialmente) y suplementados con distintas enmiendas, ajustando un modelo cinético de primer orden.

En el equilibrio, los modelos lineales de factores de bioconcentración y translocación son ampliamente utilizados en los estudios de la remoción de metales a través de la fitorremediación. Sin embargo, no permiten incorporar la influencia de diferentes concentraciones de metales en suelo que sí ejercen un efecto en las respuestas. La expresión matemática del modelo de Freundlich desarrollado para fenómenos de adsorción se ha utilizado para evaluar la absorción de metales pesados por las plantas, en suelos que presentan concentraciones de contaminantes significativamente diferentes (Jaskulak et al., 2020; Pedron et al., 2017). Considera que la absorción se da en forma no lineal y tiene en cuenta las diferencias entre las especies de plantas, lo que ayuda durante el proceso de selección de las especies más adecuadas para un área determinada. Al mismo tiempo, es un modelo matemático simple, haciendo su implementación a escala

real fácil de aplicar (Jaskulak et al., 2020; Yaashikaa et al., 2019). En el proceso evaluado mediante la fitorremediación, la captación del MP involucra un organismo vivo con un mecanismo fisiológico de transporte de contaminantes, que depende por ejemplo del tipo de planta. Por lo tanto, la ecuación de tipo Freundlich puede usarse como una herramienta operativa para planificar la fitorremediación, sin atribuir significación termodinámica a los parámetros del modelo, usándolos exclusivamente para una indicación de la aplicabilidad de la fitorremediación en las condiciones específicas del sitio contaminado bajo examinación (Pedron et al., 2017).

## 6.2. Objetivos

Uno de los objetivos del presente capítulo fue ajustar un modelo que represente los cambios en la acumulación de metales pesados en plantas de *Nicotiana alata* L. a través del tiempo, desde su trasplante hasta la cosecha. Para ello se propuso desarrollar un modelo matemático de absorción de metales pesados que considere los cambios en la generación de biomasa a través de una función sigmoide y la acumulación de metales pesados en los tejidos cosechables de la planta en el tiempo.

Por otro lado, en función de los resultados obtenidos siguiendo el primer objetivo y de las relaciones observadas en el capítulo anterior ante distintos escenarios de contaminación, se buscó integrar en un modelo las distintas expresiones halladas para así representar la extracción de Pb, Cr y Ni bajo diferentes niveles de concentración de metal en suelo, considerando la variación individual y conjunta de los MP en el suelo. La búsqueda de la expresión del proceso de acumulación de MP considerando la variación individual de cada metal se llevó a cabo a través del ajuste del modelo matemático de

Freundlich. Cabe aclarar que esta expresión matemática fue desarrollada para procesos de adsorción y en este caso sólo se aplica como modelo matemático, ya que se están estudiando procesos de absorción y no se están considerando fenómenos superficiales. Por ese motivo, de ahora en más será nombrado como modelo “tipo” Freundlich. Estos análisis se llevaron a cabo a fin de evaluar si la extracción de cada metal dependía únicamente de su concentración en el sustrato y se podía efectivamente independizar del contenido de los otros dos metales. Finalmente, se ajustaron modelos de extracción de Pb, Cr y Ni que contemplaran el contenido de los tres metales en conjunto, incorporando los términos significativos que se identificaron en los análisis estadísticos del **Capítulo 5**.

### **6.3. Metodología experimental**

De los modelos provistos por la bibliografía, y los resultados observados de la experiencia de contaminación (**Capítulo 5**) se formularon expresiones que pudieran representar la evolución de la extracción de metales por *Nicotiana alata* L. en el tiempo, y bajo diferentes niveles de contaminación, en las condiciones experimentales estudiadas.

#### **6.3.1. Evaluación temporal de la extracción de MP por *Nicotiana alata* L.**

Como se discutió anteriormente, algunos autores proponen integrar modelos de captación de metal, con el de crecimiento vegetal.

Como se presentó en el sección **2.5.5**. Zhao et al. (2019) desarrollaron un modelo simple, relacionando la absorción de metales pesados a través del factor de bioconcentración (FBC) de las plantas, la concentración en el suelo y un modelo de

generación de biomasa utilizando una función sigmoide. La función sigmoide que representó el crecimiento de biomasa se indica a continuación en la Ec. (6.1).

$$M_{planta} = \frac{M_{max}}{1 + e^{-k_M(t-t_{0,5,M})}} \quad (6.1)$$

Con el objetivo de obtener la expresión para el crecimiento en biomasa de *N. alata*, los resultados correspondientes al peso (g) de biomasa total y aéreo, se ajustaron al modelo de tipo sigmoide presentado a fin de caracterizar matemáticamente su evolución temporal, como insumo para hallar una expresión que caracterice la extracción de MP por parte de *N. alata* en el tiempo. Los parámetros se hallaron aplicando el método de ajuste por mínimos cuadrados mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt utilizando el software Origin (versión 2019).

La función finalmente aplicada por Zhao et al. (2019) para estudiar la remoción de metales en el tiempo, resultado de combinar una predicción del crecimiento de biomasa junto con el FBC se indica en la siguiente expresión, ya presentada con anterioridad (2.6):

$$M_{MP,planta} = \frac{M_{max}}{1 + e^{-k_M(t-t_{0,5,M})}} \times C_{MP,suelo} \times FBC_{MP}$$

Donde  $M_{MP,planta}$  es la cantidad de metal extraído por la planta (mg seco),  $C_{MP,suelo}$  es la concentración del metal en el suelo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ),  $FBC_{MP}$  es el factor de bioconcentración que relaciona la concentración del metal en la planta y en el suelo,  $M_{max}$  es la biomasa máxima generada por la planta,  $k_M$  es una constante que determina la curvatura del patrón de crecimiento sigmoide,  $t$  es el tiempo de crecimiento y  $t_{0,5,M}$  es el tiempo en el que la tasa de crecimiento alcanza la mitad del valor máximo.

Sin embargo, esta expresión considera que la extracción de metal en el tiempo sólo se modifica en función de las variaciones de biomasa, y considera la concentración de

metal en los tejidos, constante e independiente del tiempo. Como se observó en el capítulo anterior, el contenido de metales pesados presentó variaciones en los tejidos en las diferentes cosechas. Por este motivo, se consideró que la expresión anterior no era adecuada para representar la extracción de metal en el tiempo, y se procedió a un análisis cinético de los mismos, aplicando los modelos relevados en la bibliografía.

Como se discutió anteriormente, algunos autores han ajustado modelos de pseudo primer orden, pseudo segundo orden y el modelo cinético de Elovich, cuyas expresiones ya fueron presentadas con anterioridad en la sección 2.5.6 y se transcriben a continuación:

$$\text{Modelo de pseudo primer orden: } q_t = q_e(1 - \exp(-k_1 t))$$

$$\text{Modelo de pseudo Segundo orden: } q_t = \frac{q_e^2 k_2 t}{1 + q_e k_2 t}$$

$$\text{Modelo cinético de Elovich: } q_t = (1 + \beta_E) \ln(1 + \alpha_E \beta_E t)$$

Donde  $q_e$  es concentración de metal en la planta en el equilibrio,  $q_t$  es la concentración de metal en la planta al tiempo  $t$ ,  $t$  es el tiempo,  $k_1$  es la constante de velocidad cinética de pseudo primer orden,  $k_2$  es la constante de velocidad de pseudo segundo orden,  $\alpha_E$  es la tasa de sorción inicial del MP y  $\beta_E$  es la constante de desorción.

Cabe mencionar, que estos modelos ignoran la posibilidad de que en los tejidos exista una concentración preexistente al experimento de contaminación. Como en el presente estudio las plantas fueron trasplantadas desde un primer sustrato comercial, las ecuaciones fueron modificadas de la siguiente manera, incorporando un término que represente la posible concentración inicial de MP en la planta:

$$\text{Modelo de pseudo primer orden modificado: } q_t = q_0 + q_{in,e}(1 - \exp(-k t)) \quad (6.2)$$

$$\text{Modelo de pseudo Segundo orden modificado: } q_t = q_0 + \frac{q_{in,e}^2 k t}{1 + q_{in,e} k t} \quad (6.3)$$

Donde  $q_{in,e}$  es el incremento en la concentración de MP en las condiciones de equilibrio, respecto a la condición inicial. Es decir, cuando  $t$  corresponde al tiempo en que se alcanzan las condiciones de equilibrio:

$$q_t = q_0 + q_{in,e}$$

$$\text{Modelo cinético de Elovich modificado: } q_t = q_0 + (1 + \beta_E) \ln(1 + \alpha_E \beta_E t) \quad (6.4)$$

De esta forma, se evaluó la concentración de MP en los tejidos vegetales, con el fin de expresar su evolución mediante una función, que conjuntamente con la de crecimiento, permitiera formular las ecuaciones de extracción de Pb, Cr y Ni. Con este objetivo, se evaluaron los distintos modelos descriptos anteriormente, ajustando los datos de concentración de metal en los tejidos aéreos a cada una de las expresiones presentadas anteriormente, aplicando el método del algoritmo de Levenberg-Marquardt.

Finalmente, se buscó integrar ambas funciones en una única, que expresara la extracción de metales durante el tiempo de crecimiento, en las condiciones evaluadas.

### **6.3.2. Estudio individual de la extracción de MP por *Nicotiana glauca* L. en el equilibrio**

La variación en los valores de FBC observados para los distintos tratamientos (**Figura 5.14- Figura 5.16**) podrían expresar la necesidad de evaluar la concentración de MP en los tejidos vegetales como función no lineal de su contenido en suelo, aplicando modelos, como se describió anteriormente no lineales como el modelo tipo Freundlich, que contemple la absorción de metales pesados en suelos que presentan concentraciones

de contaminantes significativamente diferentes (Jaskulak et al., 2020; Pedron et al., 2017).

El modelo podía ser descripto siguiendo la ecuación (2.5) presentada en el **Capítulo 2**:

$$q_e = C_e^{\frac{1}{n}} \times K$$

Su forma lineal se representa de la siguiente forma:

$$\text{Log } q_e = \frac{1}{n} \text{Log } C_e + \text{Log } K \quad (6.5)$$

En la ecuación tipo Freundlich,  $K$  puede considerarse como la capacidad de sorción (una  $K$  mayor indica una capacidad incrementada), mientras que el valor de  $1 / n$  es indicativo de la fuerza de sorción (Alaribe y Agamuthu, 2019; Pedron et al., 2017). Los valores más grandes de  $n$  implican fuertes interacciones entre sorbentes e iones metálicos (Alaribe y Agamuthu, 2019).

El modelo descripto se ajustó a los datos experimentales de Pb, Cr y Ni en los tejidos vegetales en función del contenido de cada uno de ellos en el suelo, aplicando el método de ajuste por mínimos cuadrados mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt. Cabe aclarar que, como se indicó anteriormente, estas expresiones sólo se aplican a nivel matemático, ya que no es correcto atribuir significados termodinámicos al proceso, siendo que no se están evaluando procesos de adsorción.

### 6.3.3. Estudio de la extracción conjunta de los diferentes MP por *Nicotiana alata* L.

A partir de lo desarrollado en los apartados anteriores y en conjunto con lo observado en el **Capítulo 5** respecto a los términos de importancia en la extracción de cada uno de los metales, se planteó una modificación de las expresiones anteriores a fin de integrarlas en una ecuación que pudiera representar el comportamiento observado en una única expresión para cada metal.

Los datos obtenidos para cada variable se ajustaron al modelo aplicando el método de ajuste por mínimos cuadrados mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt.

## 6.4. Resultados y discusión

### 6.4.1. Evolución de la extracción de metales en el tiempo

Los datos obtenidos de peso seco para cada una de las cosechas se ajustaron al modelo sigmoide presentado en la ecuación (6.1), aplicando el método de ajuste por mínimos cuadrados mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt. Este tratamiento de datos se realizó tanto para la evolución temporal de la biomasa total como de la parte aérea, debido al interés en evaluar la extracción de MP a través de estos tejidos. En la **Figura 6.1** y **Figura 6.2**, se representa la biomasa aérea y total de la planta en función del tiempo, respectivamente, y la gráfica del modelo sigmoide resultante del ajuste para cada caso, según se indicó anteriormente. En la **Tabla 6.1** se indican los valores tomados por los parámetros para el ajuste que minimizó el error entre el modelo y los datos experimentales, junto con los valores de  $R^2$  y  $R^2$  ajustado, para las variables evaluadas.

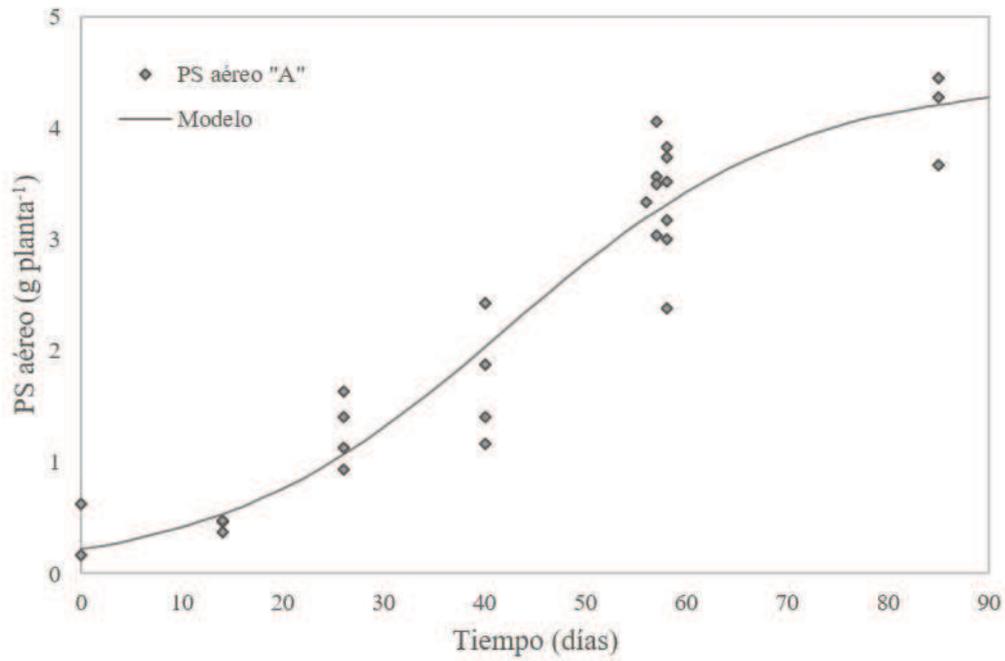


Figura 6.1. Generación de biomasa aérea de *Nicotiana alata* L. en tratamiento central A y ajuste modelo sigmoide

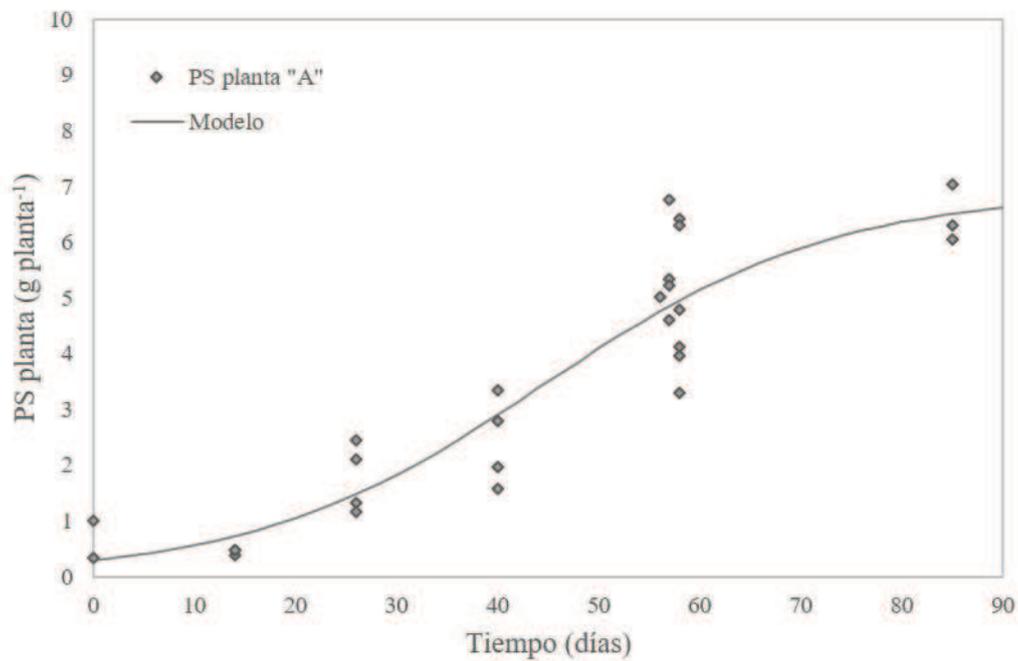


Figura 6.2. Crecimiento de *Nicotiana alata* L. en tratamiento central A y ajuste modelo sigmoide

Como se observa en la **Tabla 6.1**, se puede decir que los datos se ajustaron adecuadamente al modelo de crecimiento sigmoide. Por otro lado, las constantes variaron muy poco entre sí cuando se realizaron los ajustes del modelo a la variable de biomasa aérea y a la biomasa total, a excepción del parámetro de biomasa máxima que, como es de esperar, fue superior en el ajuste de la biomasa total. Cabe destacar que el tiempo “0” representa el momento del trasplante de *N. alata* a los sustratos de tratamiento, y que las biomásas medidas corresponden a distintos ejemplares sometidos al mismo tratamiento, ya que la medición de biomasa seca y concentración requirió de la cosecha total del ejemplar. Los valores de  $k_M$  fueron similares a los reportados por Zhao et al. (2019) para plantas de girasol.

**Tabla 6.1. Parámetros de modelo sigmoide de crecimiento para *Nicotiana alata* L.**

	$M_{max}$ (g planta <sup>-1</sup> )	$k_M$ (d <sup>-1</sup> )	$t_{1/2,M}$ (d)	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> adj
PS aéreo A	4,42 ± 0,36	0,07 ± 0,01	42,30 ± 3,38	0,9062	0,8984
PS planta A	6,89 ± 0,72	0,07 ± 0,01	44,58 ± 4,06	0,8616	0,8501

De esta forma, podríamos reescribir el modelo de crecimiento para las plantas cultivadas en el tratamiento A, de la siguiente forma:

$$M_{aérea}(t) = \frac{4,42 \text{ g planta}^{-1}}{1 + e^{-0,07d^{-1} \times (t(d) - 42,30d)}}$$

$$M_{total}(t) = \frac{6,89 \text{ g planta}^{-1}}{1 + e^{-0,07d^{-1} \times (t(d) - 44,58d)}}$$

Como se indicó anteriormente, con el objetivo de evaluar la extracción de MP en el tiempo se buscó ajustar la evolución de la concentración de metales en los tejidos vegetales. Los resultados del ajuste de los tres modelos anteriormente presentados con sus modificaciones se ilustran en las **Figuras 6.3, 6.4 y 6.5** junto con los datos experimentales, los cuales ya habían sido presentados en la sección **5.4.8**. Los correspondientes parámetros de ajuste obtenidos se presentan en la **Tabla 6.2**.

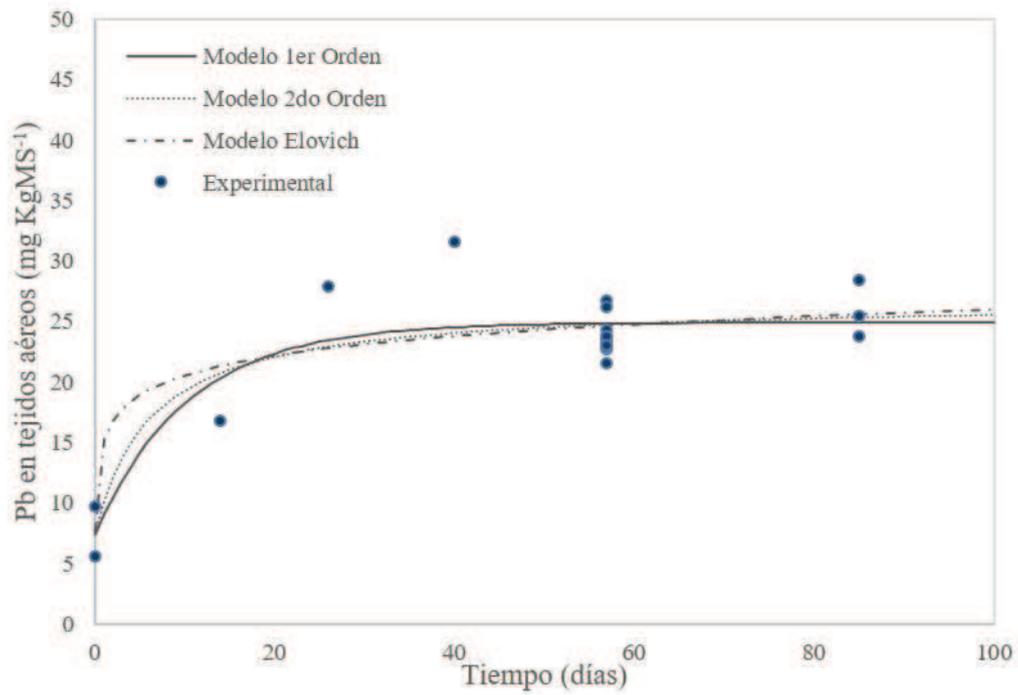


Figura 6.3. Pb en tejidos aéreos en el tiempo y modelos cinéticos de ajuste

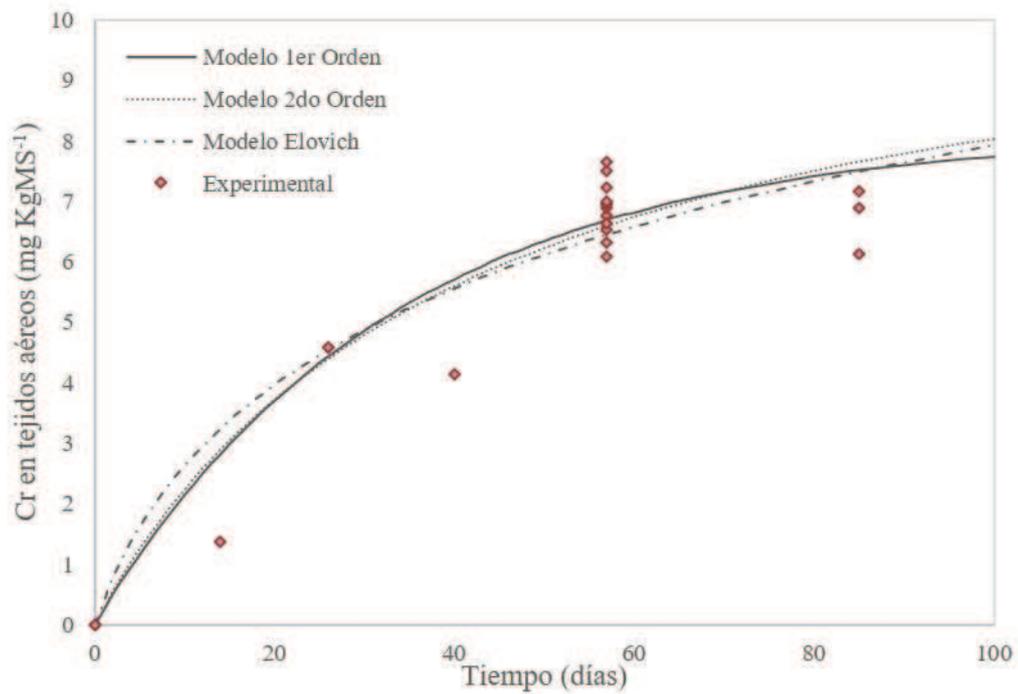


Figura 6.4. Cr en tejidos aéreos en el tiempo y modelos cinéticos de ajuste

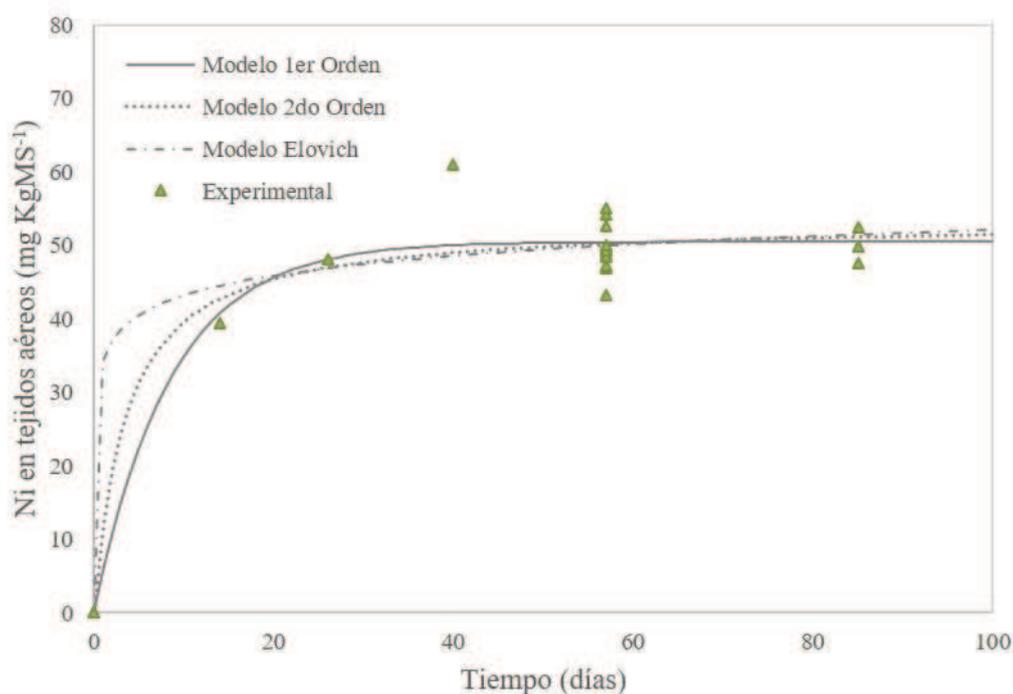


Figura 6.5. Ni en tejidos aéreos en el tiempo y modelos cinéticos de ajuste

Tabla 6.2. Parámetros de los modelos cinéticos ajustados a los MP en tejidos aéreos

	Modelo 1er Orden			Modelo 2do Orden			Modelo Elovich		
	Pb	Cr	Ni	Pb	Cr	Ni	Pb	Cr	Ni
$q_0$ (mg kg <sup>-1</sup> )	7,42	0,00	0,00	7,58	0,00	0,00	7,65	0,00	0,00
$q_{in,e}$ (mg kg <sup>-1</sup> )	17,49	8,13	50,49	19,09	11,34	53,26			
$k$ (d <sup>-1</sup> )	0,10	0,03	0,12	0,008	0,002	0,005			
$\alpha_E$							16,77	0,08	2272
$\beta_E$							1,37	1,86	2,89
$R^2$	0,795	0,911	0,946	0,779	0,901	0,939	0,768	0,889	0,934
$R^2_{adj}$	0,770	0,900	0,939	0,752	0,889	0,931	0,739	0,875	0,925

En todos los casos el modelo que mejor ajuste presentó fue el de primer orden siendo, además, el de más sencilla aplicación, aunque las diferencias en los valores de los parámetros no fueron muy significativas. Los mejores resultados se obtuvieron en la evaluación del contenido de Ni en los tejidos aéreos. Como se observa en los parámetros, para el caso del Pb el parámetro  $q_0$  fue diferente de cero. Esto se debe, como fue comentado en la sección 5.4.8, a una concentración de Pb en los tejidos de las plántulas

preexistente al momento del trasplante en los sustratos del tratamiento, posiblemente debido a la presencia de este metal en el medio de crecimiento utilizado en los semilleros (valores no determinados).

De esta forma, asumiendo como modelo aplicable la cinética de primer orden en los tres casos, y el modelo sigmoide de generación de biomasa vegetal de los tejidos aéreos, la expresión de extracción de metales podría representarse de la siguiente forma (Ec. (6.6)), considerando la biomasa aérea junto con la concentración de MP en estos tejidos, correspondientes a un tiempo determinado:

$$MP_{ext,planta} = \frac{M_{max}}{1 + e^{-k_M(t-t_{0.5,M})}} \times (q_0 + q_{in,e}(1 - \exp(-k t))) \quad (6.6)$$

Si consideramos que la concentración inicial de cada metal en la planta es despreciable respecto a la cantidad extraída en condiciones de equilibrio (válido en nuestro caso sobre todo para el estudio de Cr y Ni), la concentración de equilibrio corresponde al incremento desde la situación inicial hasta estas condiciones ( $q_e = q_{in,e}$ ). Considerando el Factor de Bioconcentración para la parte aérea, como la relación entre la concentración de equilibrio en los tejidos aéreos de la planta y la concentración de metal pesado en suelo ( $q_e/C_{suelo}$ ), entonces la expresión anterior podría representarse de la siguiente forma:

$$MP_{ext,planta} = \frac{M_{max}}{1 + e^{-k_M(t-t_{0.5,M})}} \times FBC_{aéreo} \times C_{MP,suelo}(1 - \exp(-k t)) \quad (6.7)$$

Considerando el  $FBC_{aéreo}$  obtenido para el ensayo del tratamiento A, y la concentración de MP en el suelo correspondiente, se graficaron los resultados de los modelos obtenidos para cada caso, en conjunto con los datos experimentales medios (Figura 6.6, Figura 6.7 y Figura 6.8).

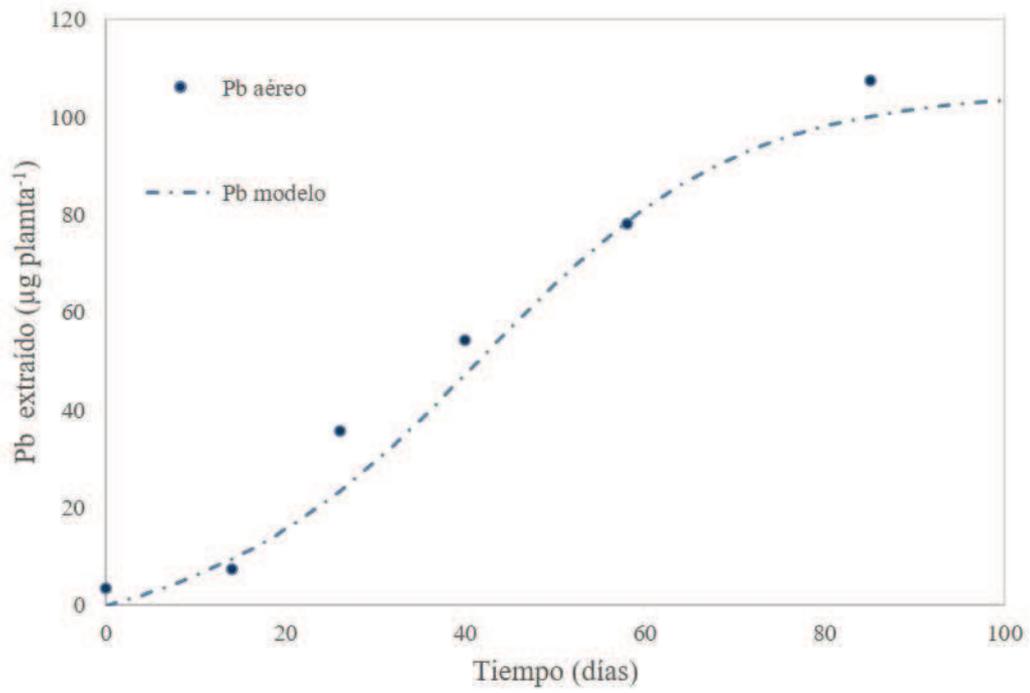


Figura 6.6. Extracción de Pb en los tejidos aéreos en el tiempo

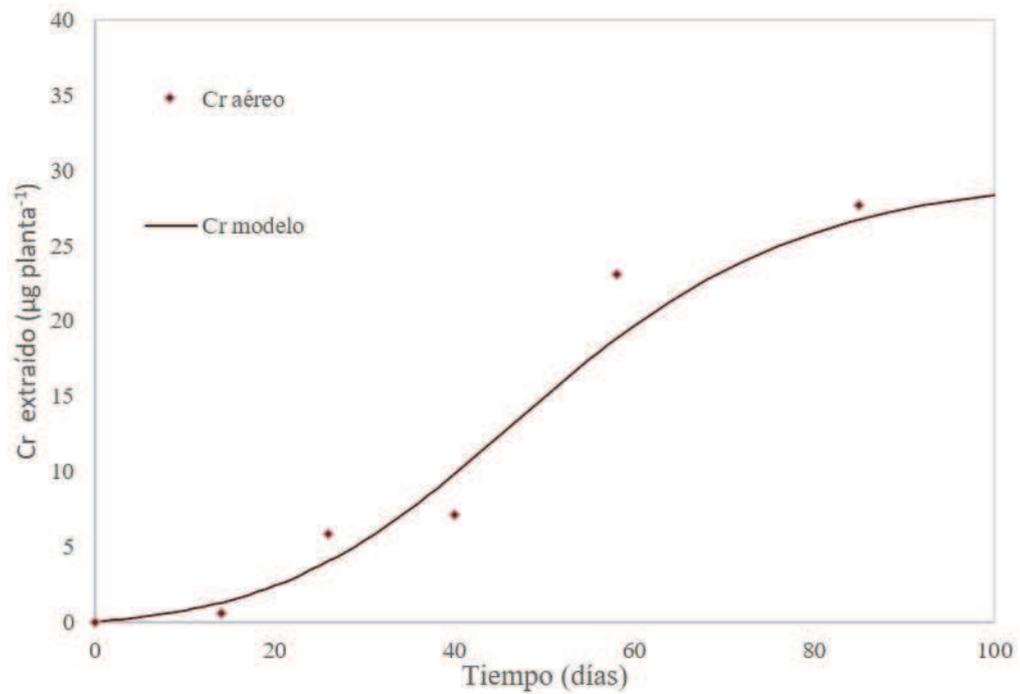
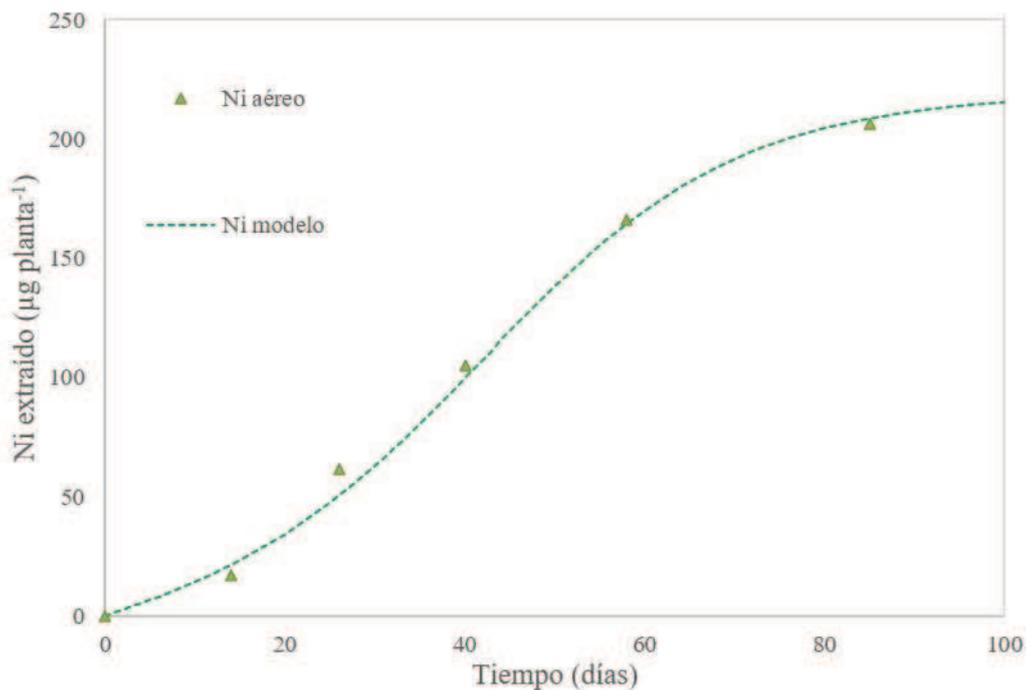


Figura 6.7. Extracción de Cr en los tejidos aéreos en el tiempo



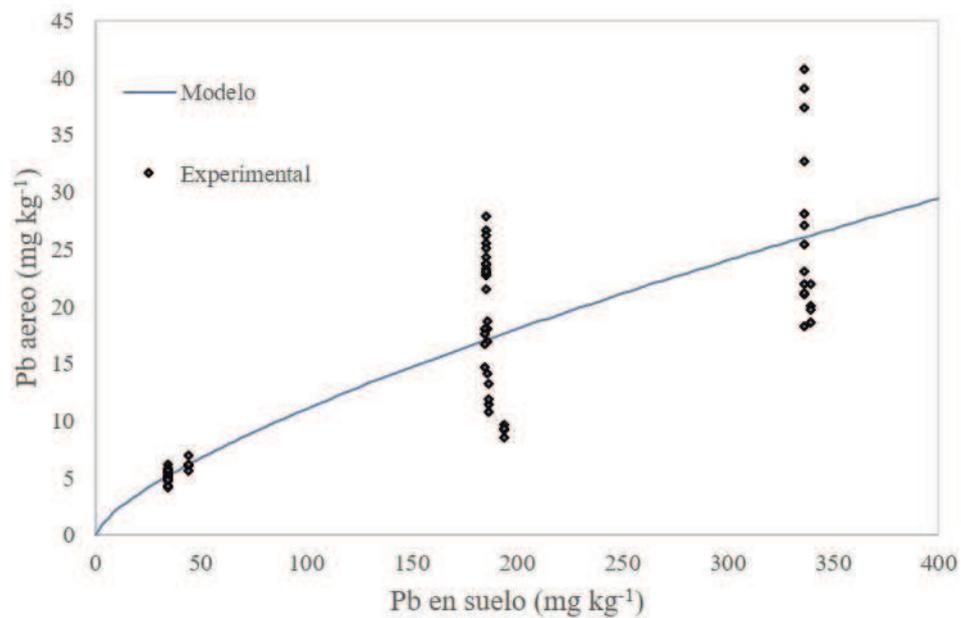
**Figura 6.8.** Extracción de Ni en los tejidos aéreos en el tiempo

El modelo obtenido describe en forma aceptable la evolución de la extracción de Pb y Ni a través de los tejidos aéreos, considerando las desviaciones experimentales. Sin embargo, para el caso del Cr, el modelo sobreestima la cantidad de metal extraído por la planta a través de los tejidos cuando se acerca al final del experimento o en las condiciones de equilibrio.

#### **6.4.2. Estudio individual de la extracción de MP por *Nicotiana alata* L. en el equilibrio**

En las gráficas (**Figura 6.9** a **Figura 6.17**) se muestran los resultados del ajuste de los modelos de captación de metales de tipo Freundlich presentados con anterioridad, a los resultados experimentales obtenidos para cada metal estudiado, en los distintos tejidos de la planta (aéreo, radicular y biomasa total). En la **Tabla 6.3** se presentan los parámetros de los modelos ajustados junto con los valores de  $R^2$  correspondientes. Como puede

observarse, los ajustes obtenidos para el modelo tipo Freundlich fueron, en general, muy buenos para el caso de Pb y Ni en todos los tejidos (con valores de  $R^2$  entre 0,838 y 0,955 y de 0,920 a 0,987, respectivamente). En el caso de Cr se obtuvo un resultado aceptable cuando se evaluó su contenido en raíces y en la planta en forma completa ( $R^2 > 0,691$ ). Sin embargo, el modelo no es capaz de otorgar un buen ajuste para los tejidos aéreos ( $R^2 < 0,1$ ), donde en general, no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos.



**Figura 6.9. Pb en tejidos aéreos en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich**

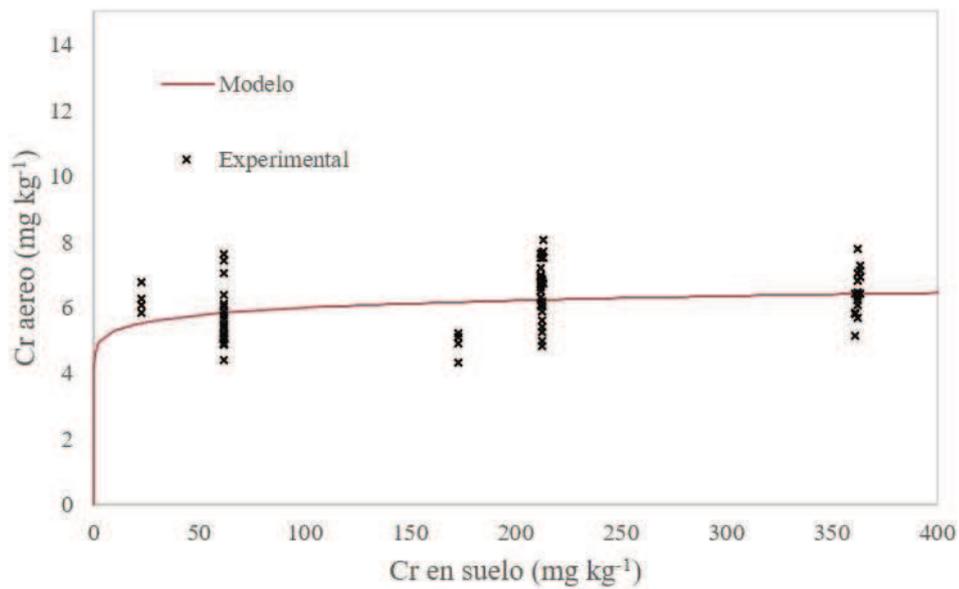


Figura 6.10. Cr en tejidos aéreos en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich

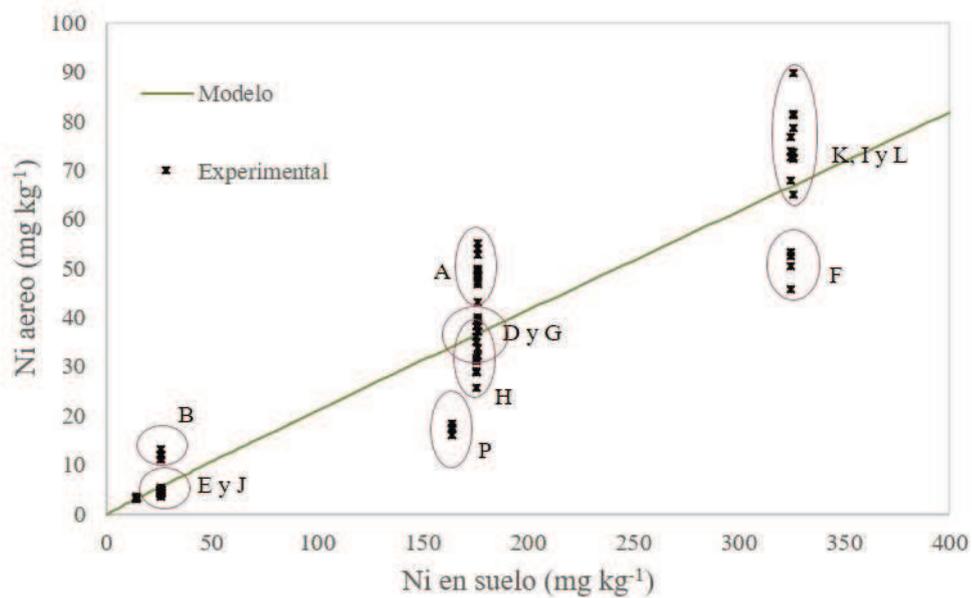


Figura 6.11. Ni en tejidos aéreos en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich

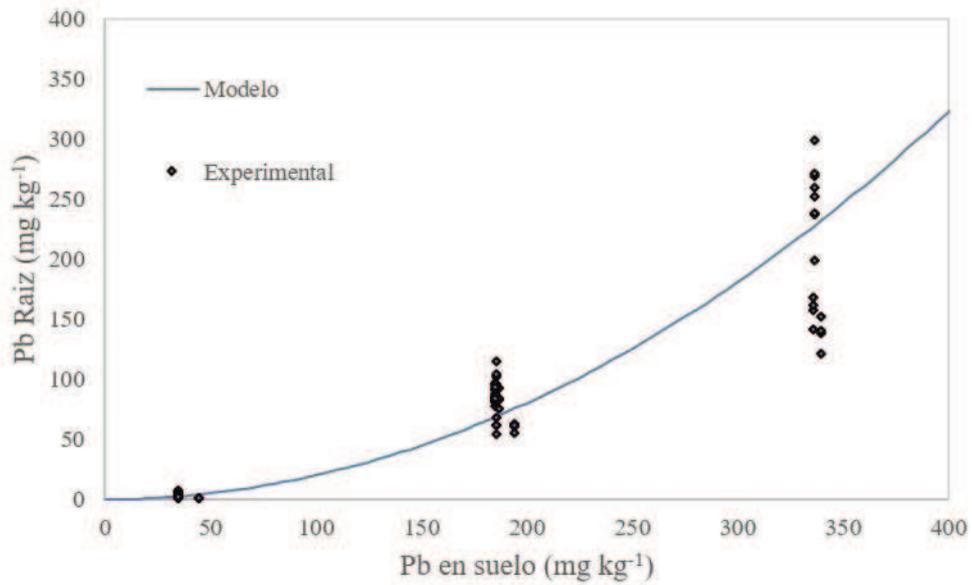


Figura 6.12. Pb en raíces en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich

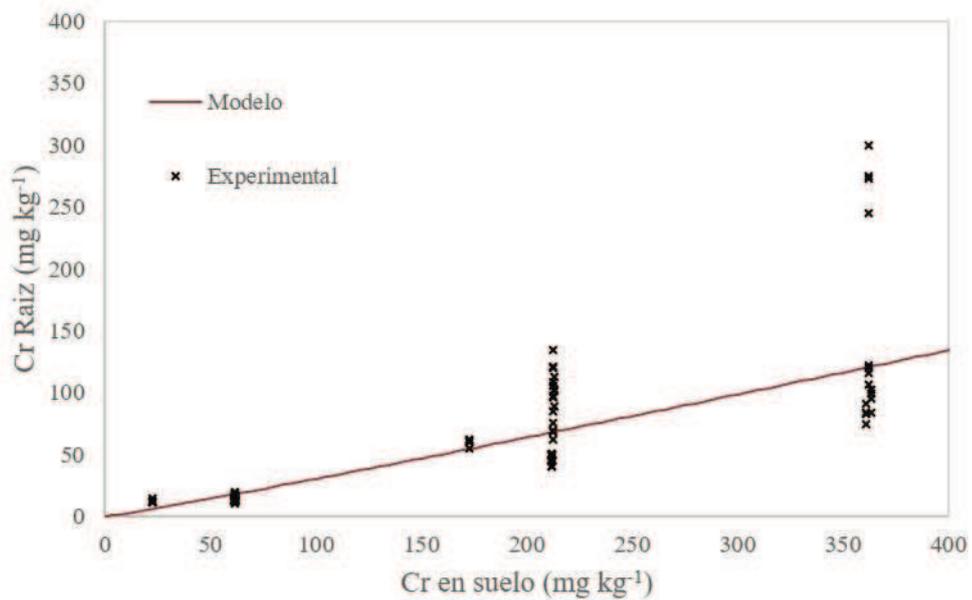


Figura 6.13. Cr en raíces en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich

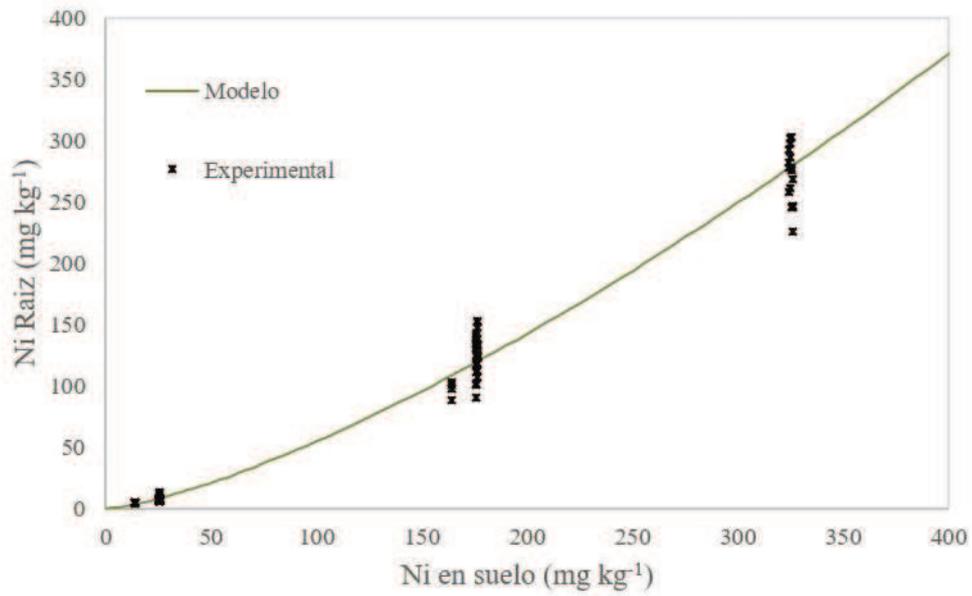


Figura 6.14. Ni en raíces en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich

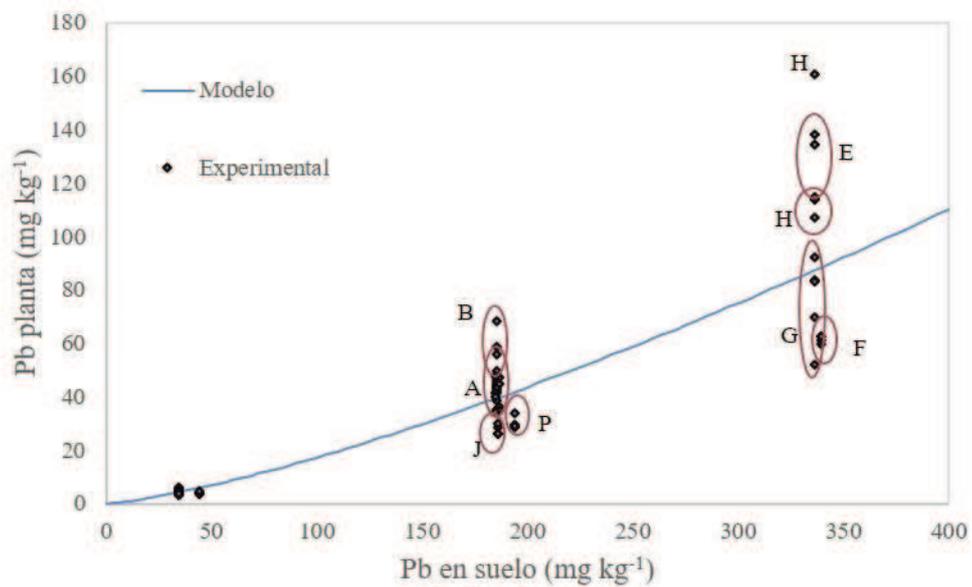


Figura 6.15. Pb en planta total en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich

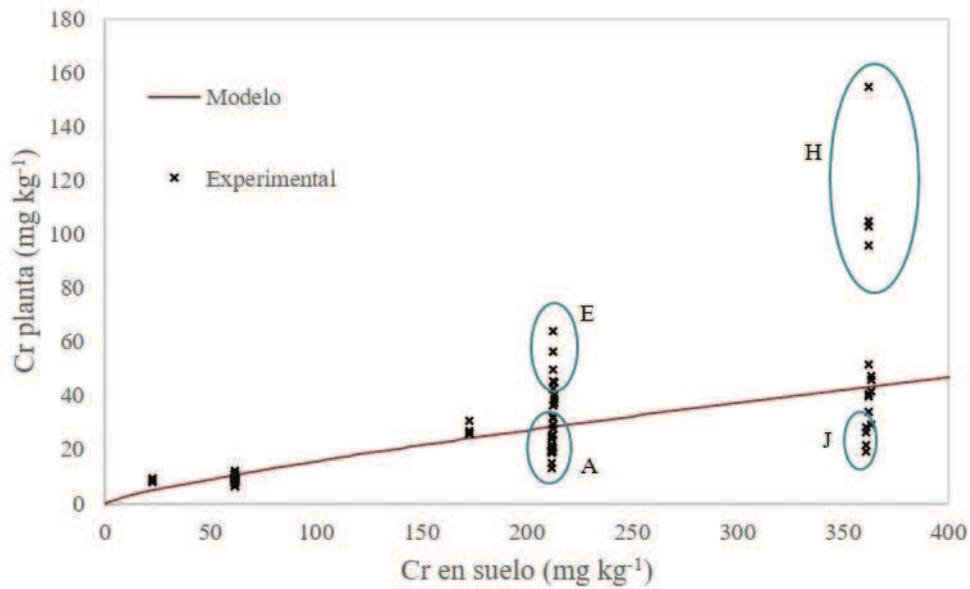


Figura 6.16. Cr en planta total en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich

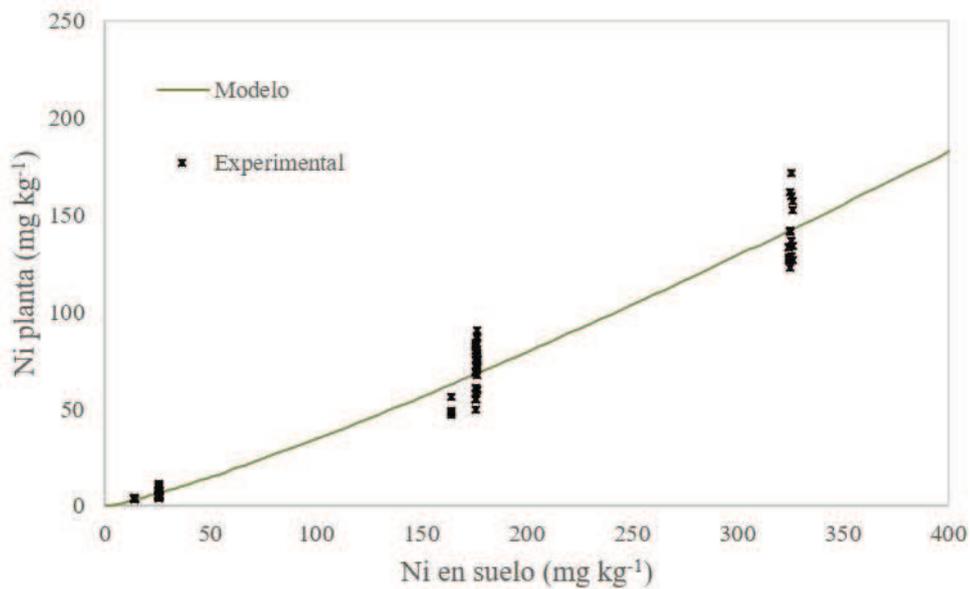


Figura 6.17. Ni en planta total en función de la concentración en el suelo y ajuste modelo tipo Freundlich

Algunos autores afirman que una ventaja de este tipo de modelos es que, aunque no se puedan realizar interpretaciones termodinámicas relacionadas a los procesos de adsorción para los cuales fue concebido el modelo, sí presentan un potencial para la

interpretación del proceso de fitoextracción. Krauss et al. (2002) y Pedron et al. (2017) sugieren que los parámetros del modelo se encuentran relacionados con la capacidad de las plantas para regular el contenido de metales pesados en sus tejidos. Pedron et al. (2017) concluyen que el parámetro  $K$  está relacionado directamente con la capacidad de absorción de un metal por la planta, y que la misma puede depender del acondicionamiento del medio (como el agregado de fosfato en el caso de dicha investigación). Por otro lado, el parámetro  $n$ , podría interpretarse como un índice de la capacidad de la planta para controlar la acumulación de metal, y no estaría particularmente afectado por el acondicionamiento del medio, sino que dependería de la especie vegetal considerada.

**Tabla 6.3. Parámetros del modelo tipo Freundlich linealizado ajustados al contenido de MP en cada uno de los tratamientos**

Parámetro	Análisis en planta			Análisis en parte aérea			Análisis en raíz		
	Pb	Cr	Ni	Pb	Cr	Ni	Pb	Cr	Ni
<b>K (kgV kgS)*</b>	0,037	0,421	0,136	0,426	4,694	0,233	0,002	0,216	0,095
<b>n</b>	0,749	1,270	0,832	1,414	18,797	1,022	0,497	0,932	0,725
<b>R<sup>2</sup></b>	0,955	0,691	0,976	0,838	0,083	0,920	0,931	0,827	0,987

\*kgV: kg de biomasa vegetal; kgS: kg de suelo

Si bien los valores de  $K$  fueron mayores para el Cr que para el resto de los MP en todos los casos, también lo fue el valor del parámetro  $n$ . Esto reflejaría una alta afinidad entre este metal y el sustrato, posiblemente favorecido por la incorporación de materia orgánica al suelo mediante el agregado de lodo, disminuyendo el movimiento del Cr hacia los tejidos vegetales respecto a los otros metales (Alaribe y Agamuthu, 2019). Esto concuerda con lo observado anteriormente mediante los FBC, donde se discutió sobre la menor movilidad del Cr respecto al Pb y Ni.

Por otro lado, se calcularon los parámetros de ajuste del modelo tipo Freundlich para la planta, separando los datos entre aquellos tratamientos que fueron suplementados con lodo y los que no, a fin de evaluar su influencia en los mismos (**Tabla 6.4**). Como puede observarse, la influencia de la aplicación de lodo en el parámetro  $n$  fue menor, en términos relativos, que su influencia en el parámetro  $K$ . Los valores del parámetro  $K$  para el caso del Pb en planta aumentaron con el agregado de lodo al sustrato. Para el caso de Cr y Ni, ocurrió lo opuesto. Sin embargo, en ambos casos se observó a la vez una variación de  $n$  más pronunciada respecto a  $K$ , disminuyendo en valor, lo cual indicaría un decrecimiento en la afinidad del metal por el sustrato y promoviendo su migración hacia la planta. Esto se correspondería con la mayor acumulación de estos metales observada experimentalmente en las plantas que crecieron en sustratos enmendados respecto a las cultivadas en suelo sin lodo.

**Tabla 6.4.** Parámetros ajustados al contenido de MP en planta de tratamientos con y sin lodo

Tratamientos:	20% de lodo			Sin agregado de lodo		
	Pb	Cr	Ni	Pb	Cr	Ni
<b>K</b>	0,042	0,193	0,122	0,025	1,469	0,235
<b>n</b>	0,759	1,074	0,816	0,744	1,761	0,951

Finalmente, se puede destacar en la mayoría de las gráficas una gran dispersión de los puntos muestrales. Sin embargo, al identificar los puntos experimentales según el tratamiento al que pertenecen se consigue observar en muchos casos (se identificó gráficamente a través de círculos, varios grupos en las **Figuras 6.11, 6.15 y 6.16**) un agrupamiento en función de los mismos (es decir, según el agregado de los otros dos metales). Esto podría indicar que existe una dependencia o interacción entre la extracción

de cada metal con la presencia y grado de contaminación de los otros dos metales, como se evidenció en diferentes observaciones del **Capítulo 5**.

Por otro lado, observando las formas de las curvas puede verse que, tanto para el Ni como para el Pb, las funciones adoptan una tendencia diferente a la típica del modelo de tipo Freundlich donde ocurre una saturación del proceso de captación de los contaminantes. Esto podría deberse, sobre todo en aquellos casos donde el ajuste fue aceptable y pueden realizarse interpretaciones, a que los límites de saturación del sistema no han sido estudiados, aspecto que también fue remarcado en la **sección 5.4.4**. a partir de los análisis de superficie de respuesta. Posiblemente *N. alata* pueda ser expuesta a concentraciones más altas de Pb y Ni e incrementar los niveles de absorción de estos metales en sus tejidos vegetales.

#### **6.4.3. Estudio de la extracción conjunta de los diferentes MP por *Nicotiana alata* L.**

Como se discutió en la sección anterior, se puede destacar que existe una gran dispersión de los puntos experimentales, sobre todo cuando se agrupan por nivel de contaminación considerando un metal a la vez. Más allá de las posibles diferencias experimentales, esta dispersión puede deberse a que los puntos corresponden a tratamientos diferentes donde la concentración de los otros dos metales puede tener influencia, aspecto que no es abarcado en el análisis. Esto es reforzado por el estudio de variación de carga contaminante por metales pesados llevado a cabo en el **Capítulo 5**, donde se observó una dependencia entre la concentración de MP en los tejidos y de la biomasa generada con la carga contaminante a un mismo tiempo evaluado (final del

experimento). Estas influencias en conjunto con lo desarrollado anteriormente, se intentan integrar en el análisis que procede a continuación.

Cuando el tiempo es grande, lo que implicaría que ha transcurrido el suficiente para llegar a la concentración de equilibrio en los tejidos vegetales y alcanzar la máxima biomasa vegetal (aunque es importante recalcar que en este tipo de ensayos, un tiempo mayor a los estudiados podría implicar la muerte vegetal, y los análisis llevados a cabo no serían válidos), la ecuación de extracción presentada en los análisis temporales (Ec. (6.7)) se simplificaría a la siguiente forma:

$$MP_{ext,planta} = M_{max} \times FBC_{aéreo} \times C_{MP,suelo} \quad (6.8)$$

Donde  $MP_{ext,planta}$  es la cantidad de metal extraído por planta (a través de los tejidos aéreos),  $FBC_{aéreo}$  es el factor de bioconcentración aéreo y  $C_{MP,suelo}$  es la concentración del metal en el suelo. Debido a que en el estudio de variación de carga contaminante por metales pesados (**Capítulo 5**) se observó una dependencia entre la concentración de MP en los tejidos y de la biomasa generada, con la carga contaminante de Pb, Cr y Ni, la expresión se reescribe considerando a los parámetros  $M_{max}$ , y  $FBC_{aéreo}$ , como términos dependientes de estas condiciones experimentales, según los términos significativos vistos en cada análisis estadístico.

$$Pb_{extraido} = \frac{M_{max}(f(Cr_{suelo}, Ni_{suelo}))}{1 + e^{-k_M(t-t_{0,5M})}} \quad (6.9)$$

$$\times FBC_{aéreo} \left( f(Pb_{suelo}, Cr_{suelo}, Ni_{suelo}, Pb_{suelo}) \right)$$

$$\times Cr_{suelo}, Cr_{suelo} \times Ni_{suelo}, \sum MP_{suelo} \Big) \times Pb_{suelo} \times (1 - \exp(-k t))$$

$$Cr_{extraido} = \frac{M_{max}(f(Cr_{suelo}, Ni_{suelo}))}{1 + e^{-k_M(t-t_{0,5,M})}} \quad (6.10)$$

$$\times FBC_{aéreo} \left( f \left( Cr_{suelo}, Ni_{suelo}, Pb_{suelo} \times Cr_{suelo}, \sum MP_{suelo} \right) \right)$$

$$\times Cr_{suelo} \times (1 - \exp(-k t))$$

$$Ni_{extraido} = \frac{M_{max}(f(Cr_{suelo}, Ni_{suelo}))}{1 + e^{-k_M(t-t_{0,5,M})}} \quad (6.11)$$

$$\times FBC_{aéreo} \left( f \left( Pb_{suelo}, Ni_{suelo}, Pb_{suelo} \times Ni_{suelo}, \sum MP_{suelo} \right) \right)$$

$$\times Ni_{suelo} \times (1 - \exp(-k t))$$

Al considerar la biomasa máxima y el factor de bioconcentración de cada metal, como una combinación lineal de la concentración de metales en el suelo en función de los términos significativos observados en los análisis de ANOVA (secciones 5.4.4 a 5.4.6), las ecuaciones se pueden expresar nuevamente de las siguientes formas:

$$Pb_{extraido} = \frac{[m_0 + m_2 Cr_{suelo} + m_3 Ni_{suelo} + m_{22} Cr_{suelo}^2 + m_{33} Ni_{suelo}^2]}{1 + e^{-k_M(t-t_{0,5,M})}} \quad (6.12)$$

$$\times [p_0 + p_1 Pb_{suelo} + p_2 Cr_{suelo} + p_3 Ni_{suelo} + p_{12} Pb_{suelo} \times Cr_{suelo}$$

$$+ p_{23} Cr_{suelo} \times Ni_{suelo} + p_{11} Pb_{suelo}^2 + p_{22} Cr_{suelo}^2 + p_{33} Ni_{suelo}^2]$$

$$\times Pb_{suelo} \times (1 - \exp(-k_{pb} t))$$

$$Cr_{extraido} = \frac{[m_0 + m_2 Cr_{suelo} + m_3 Ni_{suelo} + m_{22} Cr_{suelo}^2 + m_{33} Ni_{suelo}^2]}{1 + e^{-k_M(t-t_{0,5,M})}} \quad (6.13)$$

$$\times [c_2 Cr_{suelo} + c_3 Ni_{suelo} + c_{22} Cr_{suelo}^2 + c_{33} Ni_{suelo}^2 + c_4 \sum MP_{suelo}]$$

$$\times Cr_{suelo} \times (1 - \exp(-k_{Cr} t))$$

$$Ni_{extraido} = \frac{[m_0 + m_2 Cr_{suelo} + m_3 Ni_{suelo} + m_{22} Cr_{suelo}^2 + m_{33} Ni_{suelo}^2]}{1 + e^{-k_M(t-t_{0,5,M})}} \quad (6.14)$$

$$\times \left[ n_0 + n_1 Pb_{suelo} + n_2 Cr_{suelo} + n_3 Ni_{suelo} + n_{13} Pb_{suelo} \times Ni_{suelo} \right.$$

$$+ n_{23} Cr_{suelo} \times Ni_{suelo} + n_{11} Pb_{suelo}^2 + n_{22} Cr_{suelo}^2 + n_{33} Ni_{suelo}^2$$

$$\left. + n_4 \sum MP_{suelo} \right] \times Ni_{suelo} \times (1 - \exp(-k_{Ni} t))$$

Tomando como tiempo final los 58 días (momento en el cual se cosecharon todos los tratamientos), se procedió a realizar el ajuste de las expresiones a los datos experimentales obtenidos previamente, utilizando los parámetros cinéticos obtenidos del ajuste correspondiente ( $t_{0,5,M}$ ,  $k_M$  y  $k_{Pb/Cr/Ni}$ ).

Los parámetros de cada una de las expresiones anteriores se variaron aplicando el ajuste por mínimos cuadrados mediante el algoritmo de Levenberg-Marquardt. Como resultado de este ajuste a los datos experimentales, se definieron los parámetros del modelo como se indica en la **Tabla 6.5**.

**Tabla 6.5. Parámetros de los modelos de extracción de MP ajustados**

	$M_{aérea}$		$Pb_{extraido}$		$Cr_{extraido}$		$Ni_{extraido}$
$k_M$	0,07	$k_{Pb}$	0,1	$k_{Cr}$	0,03	$k_{Ni}$	0,12
$t_{0,5,M}$	42,3	$p_0$	0,041	$c_2$	$3,8 \times 10^{-4}$	$n_0$	0,21
$m_0$	2,1767	$p_1$	$4,83 \times 10^{-4}$	$c_3$	$4 \times 10^{-5}$	$n_1$	$8,45 \times 10^{-5}$
$m_2$	0,0141	$p_2$	$9,5 \times 10^{-5}$	$c_{22}$	$-1 \times 10^{-6}$	$n_2$	$4,9 \times 10^{-5}$
$m_3$	0,0103	$p_3$	$9,5 \times 10^{-6}$	$c_{33}$	$-7 \times 10^{-8}$	$n_3$	$5,5 \times 10^{-5}$
$m_{22}$	$-4,1 \times 10^{-5}$	$p_{12}$	$4,8 \times 10^{-7}$	$c_4$	$9 \times 10^{-6}$	$n_{13}$	$-1,21 \times 10^{-6}$
$m_{33}$	$-2,4 \times 10^{-5}$	$p_{23}$	$1 \times 10^{-9}$			$n_{23}$	$7,6 \times 10^{-7}$
		$p_{11}$	$-1,7 \times 10^{-6}$			$n_{11}$	$-3,9 \times 10^{-7}$
		$p_{22}$	$-9 \times 10^{-8}$			$n_{22}$	$-6,5 \times 10^{-7}$
		$p_{33}$	$-1 \times 10^{-9}$			$n_{33}$	$-5,5 \times 10^{-7}$
						$n_4$	$1,3 \times 10^{-4}$

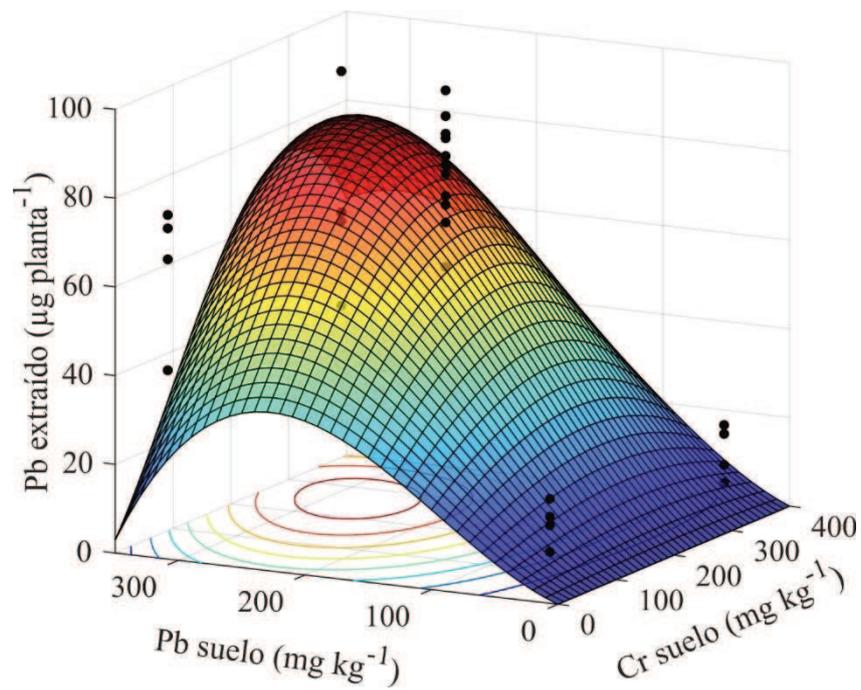


Figura 6.18. Modelo de extracción de Pb en función del contenido de Pb y Cr en suelo

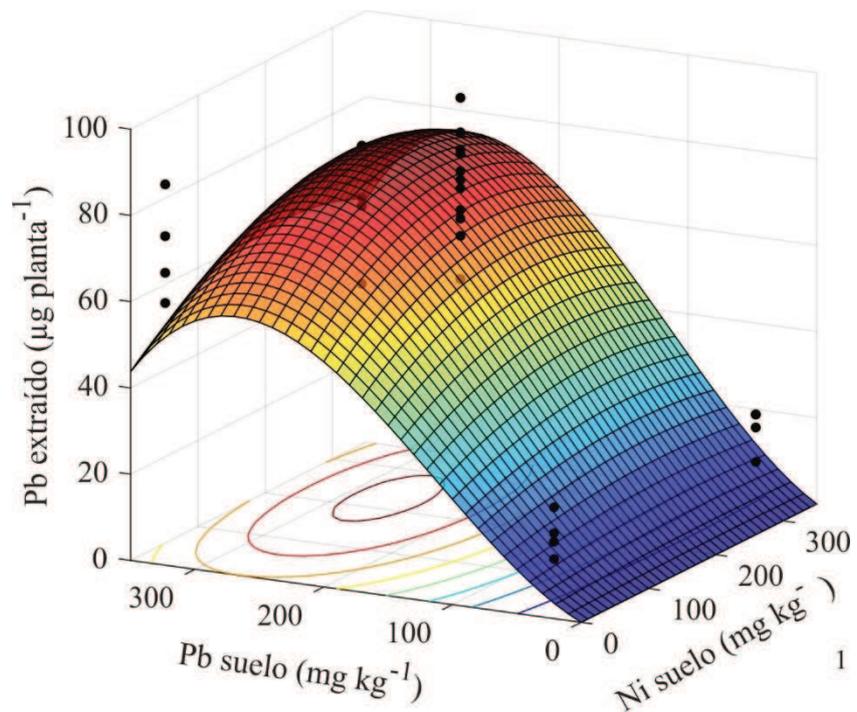


Figura 6.19. Modelo de extracción de Pb en función del contenido de Pb y Ni en suelo

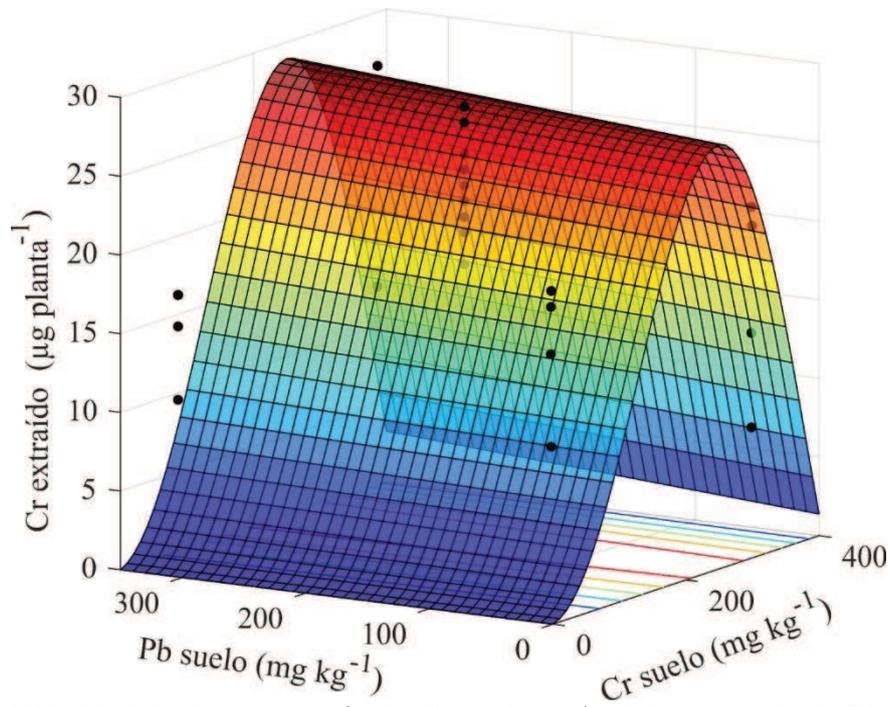


Figura 6.20. Modelo de extracción de Cr en función del contenido de Pb y Cr en suelo

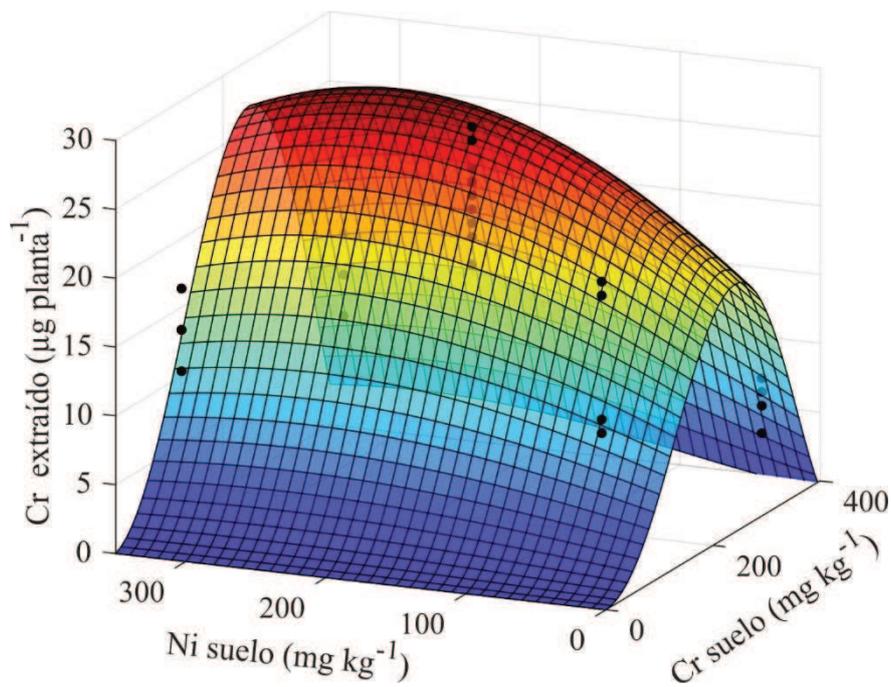


Figura 6.21. Modelo de extracción de Cr en función del contenido de Ni y Cr en suelo

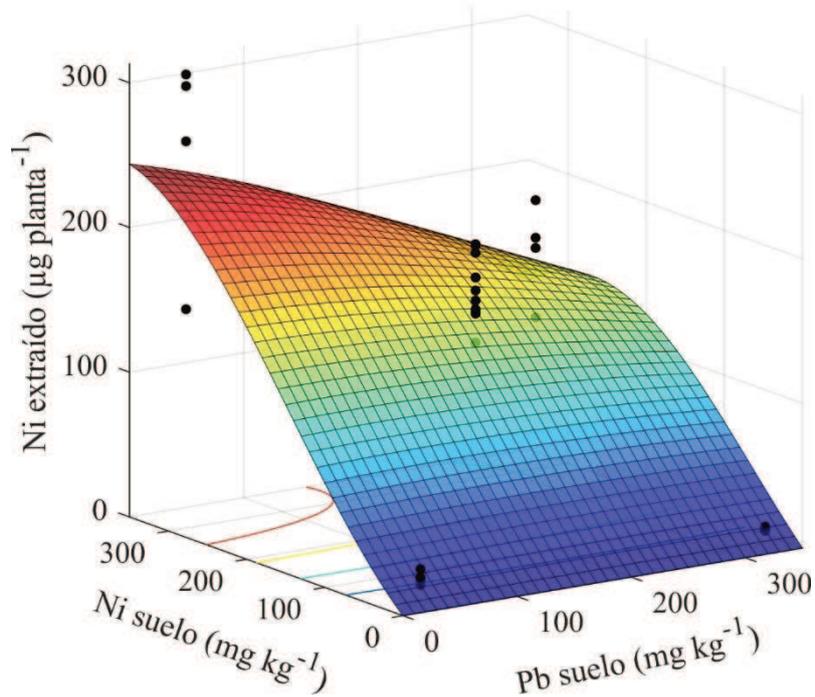


Figura 6.22. Modelo de extracción de Ni en función del contenido de Ni y Pb en suelo

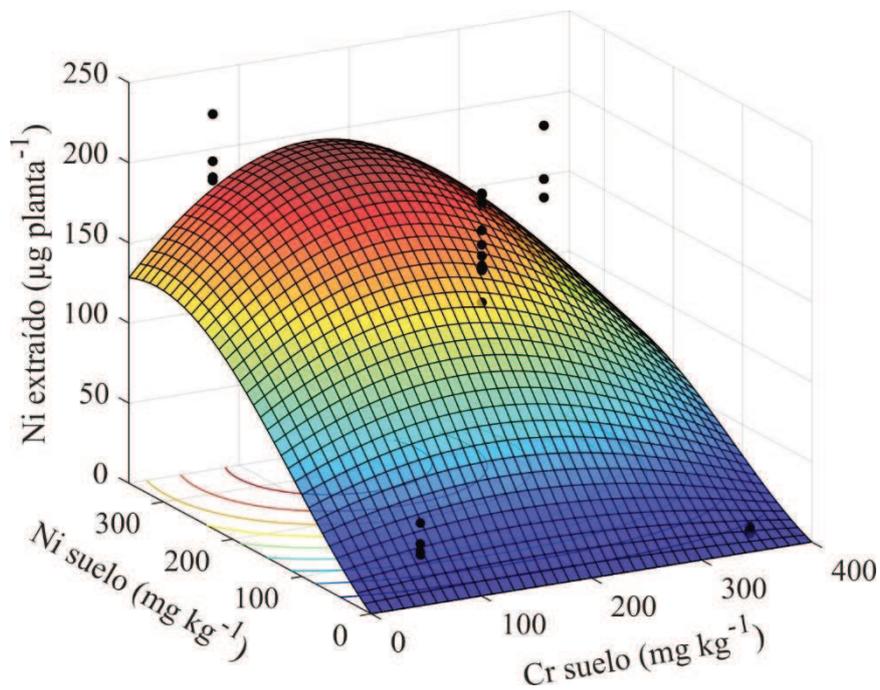


Figura 6.23. Modelo de extracción de Ni en función del contenido de Ni y Cr en suelo

De los ajustes llevados a cabo se puede decir que en general se logró mostrar la tendencia de los resultados experimentales bajo los modelos descriptos, aunque también

existe una importante dispersión de los resultados experimentales. En general, la extracción de cada metal tuvo una fuerte dependencia con la concentración del mismo en el suelo, y los efectos del resto de los metales se pudo evidenciar sobre todo para el caso de la extracción de Ni, donde la concentración de Pb influyó en forma significativa disminuyendo el poder de extracción de Ni a mayores concentraciones de Pb. Por el contrario, el contenido de Ni mostró una influencia aumentando la extracción de Cr, posiblemente por sus efectos positivos en el crecimiento vegetal, que toman mayor relevancia en la evaluación del Cr ya que los niveles de extracción obtenidos son, en general, bajos.

Por otro lado, se podría decir que, en los niveles estudiados, se habría alcanzado la capacidad máxima de extracción por planta que se podría lograr para el caso Pb y Cr, ya que en todas las superficies de respuesta se observa zonas de máximos dentro del rango experimental. Por el contrario, se observa que, en el caso del Ni, los niveles extraídos podrían ser aún mayores, encontrándose los máximos en las fronteras del rango experimental evaluado.

### **6.5. Estimación de la extracción de MP bajo un escenario de Co-plantación con *Lolium perenne* L.**

Como se discutió anteriormente en la sección **2.3.7** la presencia de varias especies vegetales en conjunto no sólo suele ser recurrente en los suelos silvestres, sino que puede resultar en diferentes ventajas para el proceso de fitorremediación, mejorando en muchos casos el espectro de metales efectivamente absorbidos (ya que diferentes plantas pueden acumular de manera preferencial ciertos MP), aumentando la resistencia y tolerancia a

los contaminantes presentes en el suelo, mejorando el rendimiento de biomasa (y por ende la cantidad de MP extraído), entre otros (Shen et al., 2022; Wu et al., 2021). Como se expuso anteriormente, especies como *Lolium perenne* L. (césped) se suelen encontrar en los rellenos sanitarios durante el proceso de restauración, habiendo sido además, estudiadas como especies con capacidad fitoextractora de MP (Bidar et al., 2009; Brutti, L. N., Beltrán, M. J., & Giardina, 2015; Hough et al., 2005; Padmavathiamma y Li, 2012; Pandey y Bajpai, 2019; Riffo, 2016; Song, 2018).

En la presente sección se buscó evaluar el comportamiento de *Nicotiana alata* L. en conjunto con *Lolium perenne* L. a fin de inferir sobre la posible aplicación real de este sistema como cobertura vegetal en los RS, en suelos enmendados con los lodos bajo evaluación (LR). Se realizó un experimento con 3 cultivos diferentes, en sustratos con un 20% de lodo, y una contaminación cercana al del tratamiento central de la experiencia anterior (agregando 150 mg kg<sup>-1</sup> de cada MP). Las concentraciones cuantificadas experimentalmente de Pb, Cr y Ni en el sustrato resultaron en 215, 184 y 205 mg kg<sup>-1</sup> de Pb, Cr y Ni, respectivamente.

Los tratamientos se detallan a continuación:

- Tratamiento 1: *Nicotiana alata* L. en monocultivo.
- Tratamiento 2: *Lolium perenne* L. en monocultivo.
- Tratamiento 3: *N. alata* y *L. perenne* en co-plantación.

Se utilizaron macetas rectangulares de 3 litros en donde se trasplantaron dos ejemplares de *N. alata* y se sembraron 8 gr de semillas de *L. perenne*. Al cabo de los 60 días de tratamiento, las plantas se cosecharon y se determinó la biomasa aérea y de raíz de ambas especies para cada uno de los tratamientos. Debido a la falta de disponibilidad

de los equipos de cuantificación de MP al momento de finalizar la cosecha, la concentración de MP en los tejidos vegetales no pudo ser determinada, por lo que no se logró evaluar la influencia de co-plantación en este aspecto. Por lo tanto, la estimación de extracción de metales se centró en la evaluación de generación de biomasa de cada especie observada experimentalmente, en la utilización del modelo obtenido en la sección anterior para la predicción de Pb, Cr y Ni en los tejidos de *N. alata* y la utilización de datos experimentales de otros autores para la estimación de MP en los tejidos de *L. perenne*.

A fin de estimar la extracción de MP por parte de *L. perenne*, se realizó un relevamiento de bibliografía para obtener valores medios de factores de bioconcentración para la parte aérea de *L. perenne*, relacionando los valores informados de contenido de cada metal en estos tejidos respecto al suelo. Los valores de  $FBC_{aéreo}$  estimados fueron de 0,13, 0,17 y 0,08 para Pb, Cr y Ni, respectivamente (Bidar et al., 2009; Li et al., 2020; Miceli et al., 2014; Riffo, 2016).

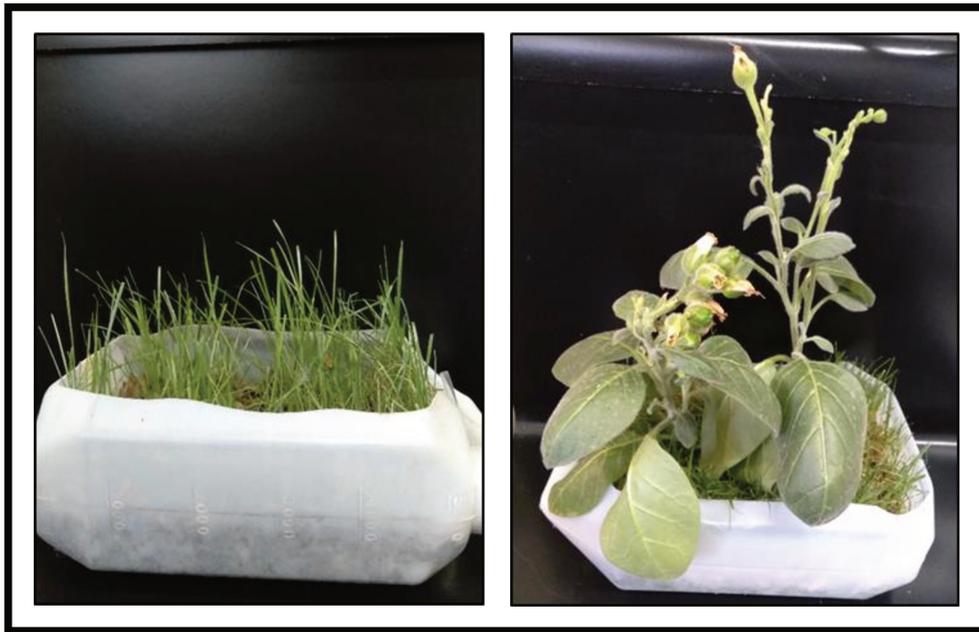
La concentración estimada para la condición buscada resultaría de la siguiente expresión:

$$C_{MP,lotium} = FBC_{aéreo,lotium} \times C_{MP,suelo}$$

La extracción efectiva de los MP por parte de *L. perenne* resultaría de la combinación de la estimación anterior, con la generación de biomasa estimada experimentalmente para dichas condiciones:

$$MP_{ext,lotium} = M_{lotium} \times C_{MP,lotium}$$

Debido a la dificultad de evaluar el crecimiento de una planta en forma individual, se evaluó en función de un área determinada, dada por la superficie de maceta.

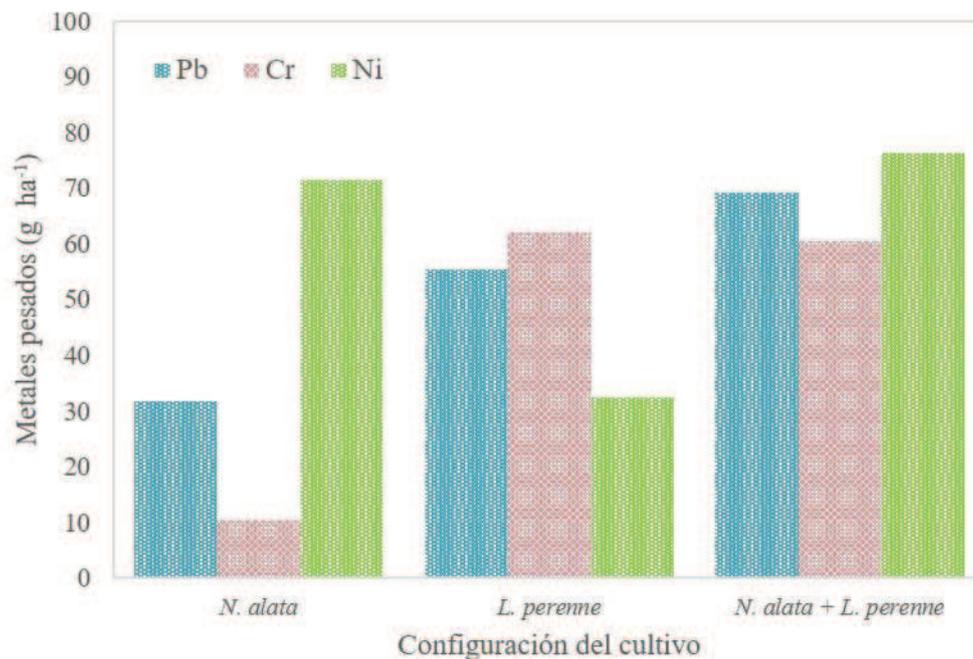


**Figura 6.24. Imágenes experimentales de los sistemas en monocultivo y de co-plantación**

En la **Figura 6.24** se muestran dos ejemplares de los cultivos al momento previo de la cosecha final. Los resultados experimentales en cuanto a la generación de biomasa aérea fueron para *N. alata* de  $3,68 \pm 0,40$  g planta<sup>-1</sup> en monocultivo y  $2,49 \pm 0,70$  g planta<sup>-1</sup> en co-plantación. En el caso del rendimiento de *L. perenne* fue de  $10,0 \pm 2,7$  y  $8,6 \pm 1,0$  g maceta<sup>-1</sup> en monocultivo y en co-plantación, respectivamente. Aunque los valores medios en los cultivos de co-plantación resultaron menores para ambas especies respecto al monocultivo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

La extracción de MP por parte de *N. alata* se estimó utilizando el modelo propuesto anteriormente y considerando la biomasa obtenida en forma experimental. Por otro lado, la extracción por parte de *L. perenne* se calculó utilizando los factores de bioconcentración estimados a partir de la bibliografía junto con los rendimientos en biomasa experimentales.

La proyección de la extracción efectiva de cada MP estimada para la superficie de una hectárea se representa en la **Figura 6.25**.



**Figura 6.25. Extracción de Pb, Cr y Ni por hectárea estimadas para las diferentes configuraciones de cultivo**

De la observación de la **Figura 6.25** se puede decir que si bien el rendimiento en biomasa es menor para cada cultivo en co-plantación como se expresó anteriormente, la cantidad de Pb extraído para el conjunto bajo esta configuración sería mayor que en cualquiera de los dos monocultivos. Luego, al comparar el cultivo mixto únicamente frente al monocultivo de *N. alata*, se observa que la contribución de *L. perenne* a la eficiencia de extracción en el sistema de co-plantación, sería realmente importante en el caso del Cr, donde la absorción de *N. alata* es muy inferior en comparación con los otros metales. Esto se debe por un lado a una mayor generación de biomasa considerando el conjunto de ambas especies, y por otro a la complementariedad entre ellos para acumular preferentemente uno u otro metal, en función de lo aportado por la bibliografía. Por otro lado, *L. perenne* también se ha reportado como extractora de metales como Cu, Cd y Zn

(Bidar et al., 2009; Riffo, 2016; Zhang et al., 2019) ampliando de esta forma el espectro de MP de absorción en caso de suelos contaminados también con estos metales, y mejorando la eficiencia, como se expresó en los resultados, de su extracción de MP en el conjunto respecto a los monocultivos.

La generación total de biomasa por hectárea resultó en 2694 kg de materia seca para la cual se debe considerar una disposición final adecuada, debido a la acumulación de los contaminantes en estos tejidos. Como se discutió en el **Capítulo 2**, dentro de las diferentes posibilidades se encuentra la reducción en biomasa por ignición, y en dicho caso representaría una cantidad aproximada de 520 kg de material (según pruebas de pérdida de biomasa por ignición de la cosecha de *N. alata* y *L. perenne*, que estiman una reducción a un 20,1% en base seca), o también el compostaje, que en general puede llegar hasta una reducción en un 70% en peso (Silbert et al., 2018).

## 6.6. Conclusiones

Del análisis de la evolución de la biomasa y extracción de metales en el tiempo por parte de *Nicotiana alata* L. se puede decir que el mismo se pudo ajustar a través de un modelo de tipo sigmoide, a la vez que se lo complementó con expresiones físicas y cinéticas de extracción de MP, para hallar la extracción efectiva de metales en el tiempo. Sin embargo, cabe recordar que los mismos fueron realizados para un solo nivel de contaminación y, como se vio anteriormente en el **Capítulo 5**, la generación de biomasa y la acumulación de MP efectivamente se ven afectadas por los diferentes grados de contaminación por MP.

Los ajustes de modelos en el equilibrio, que consideraron los efectos individuales de cada metal en su extracción, se vieron limitados por la no incorporación de los efectos conjuntos del resto de los metales presentes. El desarrollo de las expresiones que incorporaron los efectos conjuntos, fue un avance en este sentido, pudiendo formular matemáticamente la influencia del contenido de todos los metales estudiados en la expresión final de extracción de cada metal, tanto por su aporte a la variación de la biomasa generada, como por la influencia en la acumulación de cada uno de ellos.

Finalmente, la utilización de los modelos provistos junto con información obtenida de la bibliografía, permitió inferir sobre posibles escenarios de remediación en sistemas de co-plantación, con una especie como *L. perenne*, frecuentemente encontrada en las coberturas de rellenos sanitarios durante las etapas de re-vegetación y recuperación de estos sitios. En contraposición con lo sucedido en el monocultivo de *N. alata*, la práctica de cultivos mixtos ampliaría el espectro de MP que se extraen, a la vez que mejoraría la extracción neta de Pb, Cr y Ni.

## Capítulo 7. Conclusiones y/o recomendaciones

Este trabajo de tesis se enmarcó en la búsqueda de una solución integral a un problema real, la restauración de un sitio altamente impactado como un relleno sanitario, implementando procedimientos que promuevan la reutilización o aprovechamiento de las corrientes generadas en las propias instalaciones, en el marco de respuesta dentro de lo que se propende como economía circular.

En cuanto a los avances particulares, se realizó una investigación evaluando el uso de un sustrato “residuo” como enmienda para suelos infértiles, a la vez que se estudió cómo se llevaría a cabo el proceso de fitorremediación del sustrato conformado como resultado del agregado del lodo al suelo, por parte de una especie particular (*Nicotiana alata* L.).

Finalmente, ya que uno de los mayores retos de la utilización de lodos como mejoradores de suelos es enfrentar la carga contaminante que traen consigo, así como la ya presente en los suelos degradados, se estudió la evolución de estos contaminantes en el sistema vegetal implementado. Cabe aclarar que gran parte de los trabajos relevados enfrenta el estudio de la remoción de metales de forma individual, sin contemplar la contaminación conjunta ejercida por varios MP a la vez, sobre todo aquellos estudios donde se realiza un control sobre las concentraciones experimentales (estableciendo niveles de contaminación de manera artificial). Por otro lado, en gran parte de las publicaciones analizadas, cuando se evalúan experimentos donde están presentes más de un metal, se aplican análisis de forma independiente, sin considerar la influencia de la contaminación o remoción conjunta. En el presente estudio se buscó evaluar la remoción

de los principales contaminantes en forma conjunta, analizando las posibles interacciones, utilizando para ello herramientas estadísticas apropiadas.

Como conclusiones de los estudios realizados se pueden destacar:

- La aplicación del lodo como enmienda orgánica mejoró significativamente los parámetros de crecimiento de *Nicotiana glauca* L. evaluados como masa seca total, área foliar de la planta, y las respuestas biológicas como contenido de proteínas y de pigmentos fotosintéticos totales. Esta mejora general se expresó a través de un alto índice de tolerancia para cada tratamiento enmendado.
- Las variables estudiadas han reportado una dependencia estadísticamente significativa con la dosis de lodo aplicada.
- La presencia de metales en concentraciones variables hace que la evaluación del proceso de fitorremediación requiera de la contemplación de estas posibles variaciones en las condiciones del suelo. En los experimentos desarrollados se buscó evaluar la capacidad de fitorremediación de la especie vegetal *N. glauca* en suelos enmendados con lodos de relleno sanitario, ante distintos escenarios de contaminación por los principales metales pesados encontrados en el efluente (Pb, Cr y Ni).
- Las respuestas evaluadas, principalmente las variables relacionadas a la extracción de metales, estuvieron íntimamente relacionadas a la concentración de metal en el suelo. Se observaron efectos de interacción entre estos distintos contaminantes, resaltando la importancia de su evaluación en conjunto. De esta manera, esta tesis aporta una metodología superadora al análisis individual de la extracción de metales pesados por especies vegetales, muy presentes en la gran mayoría de los trabajos de la bibliografía relevada. Por otra parte, también se puede resaltar la fuerte influencia de los distintos

niveles de contaminación en el desarrollo vegetal, afectando principalmente a la biomasa y por lo tanto a la eficiencia final de fitoextracción.

- De los diferentes análisis llevados a cabo se podría indicar que, en general, *Nicotiana glauca* L. tuvo mayor afinidad para extraer y translocar Ni en sus tejidos, seguido por el Pb y por último Cr. Estas diferencias podrían estar relacionadas con determinadas funciones biológicas que efectivamente cumple el Ni en las plantas haciendo que exista cierta preferencia por su absorción. Esto podría estar también influenciado por la movilidad de cada uno de los metales en los suelos, reportándose en diferentes publicaciones que dicho movimiento en sustratos generalmente es Ni>Pb>Cr. Además, se puede inferir sobre un importante efecto del agregado de materia orgánica, aportada a través del lodo, en la movilidad del Cr generando una disminución en su acumulación respecto al suelo sin lodo.
- De los resultados se podría además concluir que el agregado de LR como enmienda permitiría una mayor extracción de los MP estudiados, no sólo por una concentración incrementada en los tejidos vegetales (principalmente para el caso de Pb y Ni) sino también, por la promoción de un mayor crecimiento.
- En el desarrollo de esta tesis, se ajustaron modelos que pudieran representar la evolución del proceso en el tiempo y bajo diferentes condiciones de contaminación. La incorporación del análisis de la influencia conjunta de los metales en la extracción de cada uno de ellos resultó adecuada frente al análisis individual. Sin embargo, es necesario recalcar la dependencia de los resultados a las condiciones experimentales dadas, como el rango acotado de contaminación por Pb, Cr y Ni (asociado a los valores que se encontraron en los LR), experimentos llevados a cabo en condiciones de invernadero, y experimentos cinéticos llevados a cabo para un único nivel de contaminación.

- De la inferencia del proceso en condiciones de co-plantación con *L. perenne*, una especie frecuentemente encontrada en las coberturas de rellenos sanitarios durante las etapas de re-vegetación y recuperación de estos sitios, y en contraposición con lo sucedido en el monocultivo de *N. alata*, la práctica de cultivos mixtos ampliaría el espectro de MP que se extraen a la vez que mejoraría la extracción neta de Pb, Cr y Ni.
- Los lodos estudiados resultan de interés por su importante contenido en nutrientes que, en presencia de metales pesados, podrían favorecer y mejorar su fitoextracción. Sin embargo, debido al riesgo potencial de contaminación por MP presentes en el residuo, el uso de estos lodos sólo se recomienda dentro del vertedero, como material de cobertura y en actividades de revegetación.
- La caracterización de los lodos estudiados indicó la presencia de MP y patógenos en niveles inferiores a los valores de referencia encontrados en la legislación argentina de biosólidos de aguas residuales e industriales (Ministerio de Desarrollo Social y Medio Ambiente, 2018). Además, en la misma se prevé la utilización de lodos como material de cobertura para operaciones de cierre de rellenos sanitarios y vegetación. Sin embargo, como se discutió en el texto, algunas barreras operativas, como la necesidad de aplicar tratamientos de estabilización previas a su uso, (compostaje, digestión anaeróbica termofílica, etc.), deberían ser abordadas previo al planteo de su aplicación efectiva en los suelos de cobertura.
- Es necesario tener en cuenta que este trabajo de investigación se realizó en condiciones de invernadero. El LR utilizado se deshidrató en las instalaciones del vertedero, sin tratamiento de estabilización. Es por esto que se plantea como perspectiva futura continuar estudiando diferentes pretratamientos para su aplicación, como la co-digestión con otros residuos tales como la corriente orgánica de los residuos sólidos urbanos, y el

estudio de la aplicación de los lodos en condiciones de campo para las operaciones de cierre del relleno sanitario.

## Anexo I. Datos complementarios

**Tabla A.I.1. Concentración inicial en los sustratos de los tratamientos contaminados**

Nombre Tratamiento	Pb agregado (mg kg <sup>-1</sup> )	Cr agregado (mg kg <sup>-1</sup> )	Ni agregado (mg kg <sup>-1</sup> )
A	184,1	211,8	174,4
B	187,2	60,1	23,7
C	34,5	212,5	25,5
D	32,3	61,9	176,3
E	333,4	212,7	25,7
F	339,4	213,0	324,5
G	336,0	61,7	175,8
H	336,5	362,1	174,7
I	186,7	60,5	325,9
J	185,8	361,0	25,7
K	184,9	362,4	324,7
L	33,5	212,4	322,5
M	32,4	363,4	173,9
<b>Tratamientos controles</b>			
N	44,4	22,7	14,1
O	34,5	61,7	25,7
P	191,9	171,6	160,2

**Tabla A.I.2. Caracterización promedio del suelo utilizado**

Parámetro	Valor
pH <sup>(1)</sup>	6,5 ± 0,1
CE <sup>(1)</sup> (μS cm <sup>-1</sup> )	1438 ± 80
N (%) <sup>(2)</sup>	0,58 ± 0,08
P (%) <sup>(2)</sup>	0,36 ± 0,07
ST (%) <sup>(2)</sup>	71,1 ± 4,5
MO (%) <sup>(2)</sup>	17,5 ± 2,9

<sup>(1)</sup> Solución 1:5 (p:v), en relación al peso seco del lodo. MO: materia orgánica. ST: sólidos totales. <sup>(2)</sup> ST, N (Nitrógeno total de Kjeldahl), P (Fósforo total) y MO son expresados en % en base seca (g 100gMS<sup>-1</sup>).



Figura A.I.1. Imágenes de plantas iniciales de los tratamientos J (150, 300 y 0 mg kg<sup>-1</sup> de agregado Pb, Cr y Ni) y K (150, 300 y 300 mg kg<sup>-1</sup> de agregado Pb, Cr y Ni)

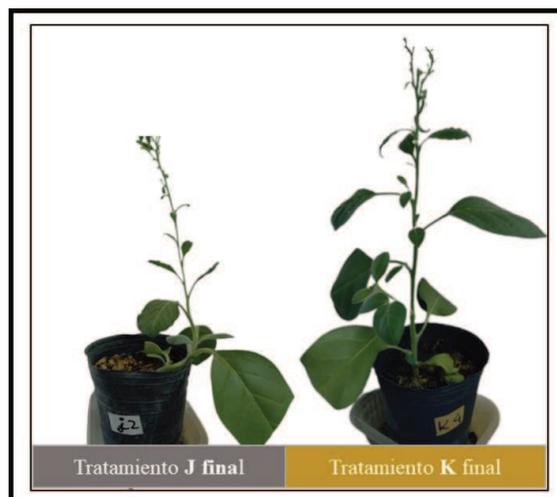


Figura A.I.2. Imágenes de ejemplares de plantas finales de los tratamientos J (150, 300 y 0 mg kg<sup>-1</sup> de agregado Pb, Cr y Ni) y K (150, 300 y 300 mg kg<sup>-1</sup> de agregado Pb, Cr y Ni)

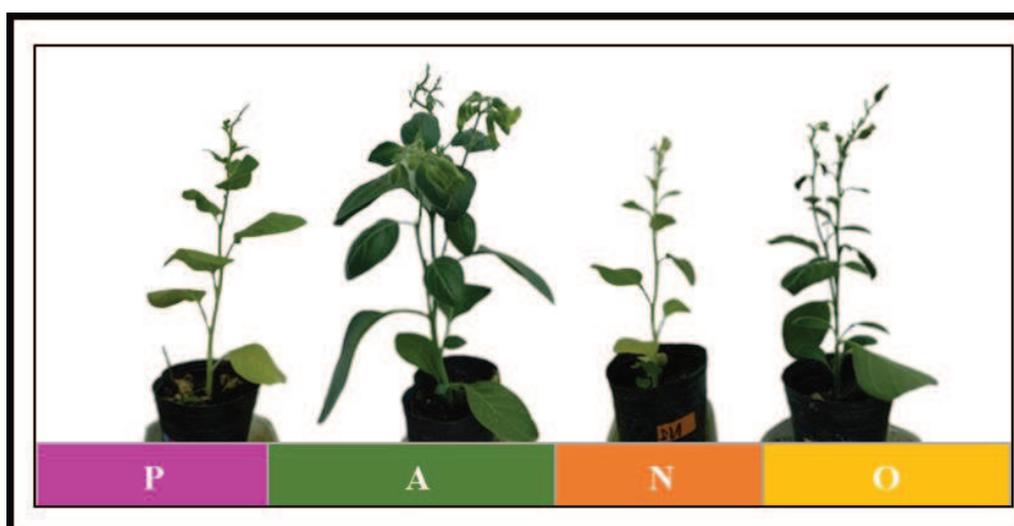


Figura A.I.3. Imágenes de ejemplares de plantas finales de los tratamientos P (%LR=0) y A (%LR=20%) ambos con MP (150, 150 y 150 mg kg<sup>-1</sup> de agregado Pb, Cr y Ni, sin y con LR) y N (%LR=0) y O (%LR=20%), ambos sin agregado de MP

---

## Anexo II. Publicaciones en revistas científicas

1- Fiasconaro, M.L., Abrile, M.G., Hintermeister, L., Antolin, M. del C., Lovato, M.E., 2022. Application of different doses of compost as a substitution of the commercial substrate in nursery for pepper and tomato seedlings. *Int. J. Recycl. Org. waste Agric.*

2- Abrile, M.G., Fiasconaro, M.L., Orecchia, D.S., Manzo, R.M., Lovato, M.E., 2021. Utilization of sludge derived from landfill leachate treatment as a source of nutrients for the growth of *Nicotiana glauca* L. *J. Environ. Manage.* 289, 112488.

3- Abrile, M.G., Fiasconaro, M.L., Gervasio, S., Antolín, M.C., Lovato, M.E., 2021. Evaluation of the sensitivity and production of flowers in *Tagetes erecta* L. exposed to high doses of sodium from irrigation with landfill leachates. *Int. J. Recycl. Org. waste Agric.* 10, 63–75.

4- Abrile, M.G., Ciucio, M.M., Demarchi, L.M., Bono, V.M., Fiasconaro, María Laura Lovato, M.E., 2020. Degradation and mineralization of the emerging pharmaceutical pollutant Sildenafil by ozone and UV radiation using Response Surface Methodology. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11717-9>

5- Abrile, M.G., Fiasconaro, M.L., Lovato, M.E., 2020. Optimization of Reactive Blue 19 dye removal using ozone and ozone/UV employing response surface methodology. *SN Appl. Sci.* 2, 995.

6- Lovato, M., Buffelli, J.R., Abrile, M., Martín, C., 2019. Kinetics and efficiency of ozone for treatment of landfill leachate including the effect of previous microbiological treatment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 4474–4487.

---

## Anexo III. Participación en congresos y eventos científicos-tecnológicos

### Trabajos publicados en libros de resúmenes

1- Abrile, M G, Fiasconaro, M.L., Orecchia D.S., Lovato, M.E., 2022. “Evaluación de la fitoextracción de metales pesados en suelos enmendados con lodos de lixiviados, utilizando plantas de Tabaco Jasmín (*Nicotiana alata* L.)”. Libro de Resúmenes del VIII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental. Lugar: Mar del Plata. ISBN: 978-987-811-035-6.

2- Abrile, M G, Fiasconaro, M.L., Lovato, M.E., 2022. “Evaluación del biopotencial de productos derivados de descartes de zanahoria desde una perspectiva de economía circular”. Libro de Resúmenes del VIII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental. Lugar: Mar del Plata. ISBN: 978-987-811-035-6.

3- Orecchia D.S., Abrile, M G, Fiasconaro, M.L., Lovato, M.E., 2021. “Utilización de lodos derivados del tratamiento de lixiviados de un Relleno Sanitario como fuente de nutrientes para el crecimiento de *Nicotiana alata* L.”. Libro de Resúmenes de la XXVIII Jornada de Jóvenes Investigadores de AUGM Generación de conocimientos desde el sur para el mundo post pandemia. Lugar: Santiago de Chile (Chile). ISBN: 978-9974-8553-8-0.

4- Abrile, M.G., Fiasconaro, M.L., Gervasio, S., Lovato, M.E., 2020. “Evaluación del uso de lixiviados como agua de riego en plantas ornamentales con capacidad fitorremediadora: *Tagetes erecta* L.”. Libro de Trabajos Completos del IV Congreso

Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiente y Desarrollo desde una perspectiva territorial. Lugar: Florencio Varela. ISBN: 978-987-811-035-6.

### **Trabajo en congresos y eventos científicos-tecnológicos**

1- V Congreso Argentina y Ambiente 2023 (AA2023). Título del trabajo: “Evaluación de los factores de translocación y de extracción de metales pesados de *Nicotiana alata* L. en suelos enmendados con lodos de relleno sanitario”. Autores: Abrile, Mariana G.; Osorio Julia; Fiasconaro, María Laura; Lovato, María Eugenia. Lugar: Potrero de los Funes, San Luis, 2023.

2- V Congreso Argentina y Ambiente 2023 (AA2023). Título del trabajo: “Compostaje de las fracciones sólidas de las “aguas rojas y verdes” provenientes de un frigorífico regional y evaluación de su aplicación en cultivos forrajeros”. Autores: Abrile, Mariana G.; Fiasconaro, María Laura; Manzo, Ricardo M.; Lovato, María Eugenia. Lugar: Potrero de los Funes, San Luis, 2023.

3- V Congreso Argentina y Ambiente 2023 (AA2023). Título del trabajo: “Lodos de lixiviados: caracterización fisicoquímica, microbiológica y enzimática para el diseño de estrategias de biorremediación”. Autores: Dayub, S.; Folmer M., Araujo Sola E.; Abrile M.; Frisón L.; Manzo, R.; Lovato M.E. Lugar: Potrero de los Funes, San Luis, 2023.

4- Expositora en VIII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental. Título del trabajo: “Evaluación de la fitoextracción de metales pesados en suelos enmendados con lodos de lixiviados, utilizando plantas de Tabaco Jasmín

(*Nicotiana glauca* L.)”. Autores: Abrile, M G, Fiasconaro, M.L., Orecchia D.S., Lovato, M.E. Lugar: Mar del Plata, 2022.

5- Expositora en VIII Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental. Título del trabajo: “Evaluación del biopotencial de productos derivados de descartes de zanahoria desde una perspectiva de economía circular”. Autores: Abrile, M G, Fiasconaro, M.L., Lovato, M.E. Lugar: Mar del Plata, 2022.

6- Expositora en XXXIII Argentinian meeting of Plant Physiology. Título del trabajo: “*Nicotiana glauca* L. growth in soils amended with leachate sludge under different heavy metal loads”. Autores: Abrile, M G, Fiasconaro, M.L., Orecchia D.S., Lovato, M.E. Lugar: Santa Fe, 2021.

7- XXXIII Argentinian meeting of Plant Physiology. Título del trabajo: “*Application of different doses of compost for partial or total substitution of the commercial substrate in nursery. Case study on pepper and tomato seedlings*”. Autores: Fiasconaro, M.L., Abrile, M.G., Hintermeister, L., Antolín, M.C., Lovato, M.E. Lugar: Santa Fe, 2021.

8- Expositora en IV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiental. Título del trabajo: “Evaluación del uso de lixiviados como agua de riego en plantas ornamentales con capacidad fitorremediadora: *Tagetes Erecta* L.”. Autores: Abrile, Mariana, Fiasconaro, María Laura; Gervasio, Susana; Lovato, María Eugenia. Lugar: Florencio Varela, 2019.

9- XV Congreso Latinoamericano de Fisiología Vegetal. Título del trabajo: “Role of proline accumulation on fruit quality of pepper (*Capsicum Annuum* L.) grown with a k-rich compost under drought conditions”. Autores: Fiasconaro, M.L.; Lovato, M.E.; Abrile, M.G.; Martin, C.; Gervasio, S.; Antolín, M.C. Lugar: Córdoba, 2018.

10- VII Jornadas de Economía Ecológica. La sustentabilidad frente al neoextractivismo y la reprimarización en Latinoamérica. Miradas transdisciplinares y la construcción de alternativas- Título del trabajo: “La Huella Hídrica como herramienta para la educación ambiental- Su cálculo en una escuela de la ciudad de Santa Fe”. Autores: Grand ML; Rotondi F; Prodolliet J; Espindola C; Abrile MG. Lugar: Rosario, 2017.

---

## Anexo IV. Informes Técnicos

1- [2022] Lovato, M.E., Fiasconaro, M.L., Abrile M.G., Manzo R., Gervasio S.; Clementi L., Gilliard M.B. Informe técnico de avance Nro.2 “Desarrollo y aplicación de una tecnología sustentable para la remediación y aprovechamiento de nutrientes de efluentes provenientes del Frigorífico FRIAR”. En el marco del Convenio de cooperación técnica Convenio específico de cooperación entre la Empresa F.I.A.R. y la Universidad Nacional del Litoral a través del INTEC (UNL-CONICET).

2- [2021] Lovato, M.E., Fiasconaro, M.L., Abrile, M.G., Orecchia, D.S., Gervasio, S.; Clementi, L., Gilliard, M.B. Informe técnico de avance “Utilización de lodos derivados del tratamiento de Lixiviados como fuente de nutrientes para el crecimiento de plantas de *Nicotiana affinis* L.” En el marco del Convenio de cooperación técnica Convenio específico de cooperación entre la Empresa MILICIC y la Universidad Nacional del Litoral a través del INTEC (UNL-CONICET).

3- [2019] Lovato, M.E., Fiasconaro, M.L., Abrile M.G., Manzo R., Gervasio, S.; Clementi, L., Gilliard, M.B. Informe técnico de avance Nro.1 “Desarrollo y aplicación de una tecnología sustentable para la remediación y aprovechamiento de nutrientes de efluentes provenientes del Frigorífico FRIAR”. En el marco del Convenio de cooperación técnica Convenio específico de cooperación entre la Empresa F.I.A.R. y la Universidad Nacional del Litoral a través del INTEC (UNL-CONICET).

4- [2017] Abrile, M.G., Martín C.A. Informe de Factibilidad Tecnológica (Etapa I) del “Estudio de la Degradación Aeróbica de Biosólidos de Pelambre y Grasas Empresa Curtiembre Arlei”.

## GLOSARIO Y LISTADO DE SÍMBOLOS

AF	Área foliar
As	Arsénico
AST	Azúcares solubles totales
Cd	Cadmio
Ca	Calcio
Cu	Cobre
CE	Conductividad Eléctrica
SC	Contenido del lodo en los sustratos, expresado como porcentaje (%)
CH	Contenido hídrico del suelo o los tejidos vegetales
Cr	Cromo
DE	Desviación estándar
SE	Error estándar
P	Fósforo
IG	Índice de germinación
IT	Índice de tolerancia
LR	Lodos generados en el proceso de tratamiento del lixiviado del relleno sanitario de la ciudad de Santa Fe, y con los cuales se realizaron los diferentes ensayos experimentales.
Mg	Magnesio
MDA	Malondialdehído
MS	Masa seca
MO	Materia Orgánica
Sustrato	Medio de cultivo, conformado por tierra o tierra más lodo en función del experimento. Sustrato, suelo o medio de crecimiento para la especie vegetal.
Hg	Mercurio
MP	Metales Pesados
Ni	Níquel
N	Nitrógeno
Pb	Plomo
K	Potasio

PST	Proteínas solubles totales
RS	Relleno sanitario
Na	Sodio
ST	Sólidos totales de una muestra
Tierra comercial	Tierra utilizada como co-sustrato para los medios de cultivo experimentales.
$\mu$	Valor medio
Zn	Zinc

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrile, M.G., Fiasconaro, M.L., Orecchia, D.S., Manzo, R.M., Lovato, M.E., 2021.

Utilization of sludge derived from landfill leachate treatment as a source of nutrients for the growth of *Nicotiana glauca* L. *J. Environ. Manage.* 289, 112488.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112488>

Aihemaiti, A., Jiang, J., Li, D., Liu, N., Yang, M., Meng, Y., 2018. The interactions of

metal concentrations and soil properties on toxic metal accumulation of native plants in vanadium mining area. *J. Environ. Manage.* 222, 216-226.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.05.081>

Alaboudi, K.A., Ahmed, B., Brodie, G., 2018. Phytoremediation of Pb and Cd

contaminated soils by using sunflower (*Helianthus annuus*) plant. *Ann. Agric. Sci.*

63, 123-127. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2018.05.007>

Alaribe, F.O., Agamuthu, P., 2019. *Lantana camara*—an Ecological Bioindicator Plant

for Decontamination of Pb-Impaired Soil Under Organic Waste-Supplemented

Scenarios. *Pedosphere* 29, 248-258. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60365-](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60365-5)

5

Alaribe, F.O., Agamuthu, P., 2015. Assessment of phytoremediation potentials of

*Lantana camara* in Pb impacted soil with organic waste additives. *Ecol. Eng.* 83,

513-520. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.07.001>

Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and

applications. *Chemosphere* 91, 869-881.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>

- Almasi, A., Mohammadi, M., Mosavi, S.A., Eghbali, S., 2019. Phytoremediation potential of sewage sludge using native plants: *Gossypium hirsutum* L. and *Solanum lycopersicum* L. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 16, 6237-6246.  
<https://doi.org/10.1007/s13762-018-2030-2>
- Álvarez-Robles, M.J., Bernal, M.P., Sánchez-Guerrero, A., Sevilla, F., Clemente, R., 2020. Major As species, lipid peroxidation and protein carbonylation in rice plants exposed to increasing As(V) concentrations. *Heliyon* 6.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04703>
- Amari, T., Ghnaya, T., Abdelly, C., 2017. Nickel, cadmium and lead phytotoxicity and potential of halophytic plants in heavy metal extraction. *South African J. Bot.* 111, 99-110. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.03.011>
- Arunbabu, V., Indu, K.S., Ramasamy, E. V, 2017. Leachate pollution index as an effective tool in determining the phytotoxicity of municipal solid waste leachate. *Waste Manag.* 68, 329-336. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.012>
- Aslani borj, M., Etesami, H., Alikhani, H.A., 2022. Rhizosphere Silicon improves the effect of phosphate-solubilizing bacterium and arbuscular mycorrhizal fungus on phosphorus concentration of salinity-stressed alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Rhizosphere* 24, 100619. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100619>
- Bailey, W.A., 2014. Effect of nitrogen rate on growth, yield, quality, and leaf chemistry of dark tobacco. *Tob. Sci.* 51, 13-22.
- Baird, R., Eaton, A., Rice, E. (Eds.), 2017. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23.a ed. Water Environment Federation, American Public Health Association, American Water Works Association.

- Baxter, A.A., Poon, I.K.H., Hulett, M.D., 2017. The plant defensin NaD1 induces tumor cell death via a non-apoptotic, membranolytic process. *Cell Death Discov.* 3, 1-11. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.102>
- Beesley, L., Moreno-jiménez, E., Gomez-eyles, J.L., 2010. Effects of biochar and greenwaste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. *Environ. Pollut. J.* 158, 2282-2287. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.02.003>
- Benimeli, M., Plasencia, A., Corbella, R.D., Andina Guevara, D., Sanzano, A., Sosa, F.A., Fernández de Ullivari, J., 2019. El nitrógeno del suelo. *Edafologia.Org* 1-11.
- Bidar, G., Pruvot, C., Garçon, G., Verdin, A., Shirali, P., Douay, F., 2009. Seasonal and annual variations of metal uptake, bioaccumulation, and toxicity in *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal-contaminated field. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 42-53. <https://doi.org/10.1007/s11356-008-0021-4>
- Brutti, L. N., Beltrán, M. J., & Giardina, E., 2015. Biorremediación de suelos afectado por residuos, en: *Biorremediación de suelos afectado por residuos*.
- Brutti, L., Beltrán, M., García de Salamone, I., 2018. *Biorremediación de los Recursos Naturales*, 1ra ed. Ediciones INTA, HURLINGHAM.
- Caliz, J., Montserrat, G., Martí, E., Sierra, J., Cruañas, R., Antonia Garau, M., Triadó-Margarit, X., Vila, X., 2012. The exposition of a calcareous Mediterranean soil to toxic concentrations of Cr, Cd and Pb produces changes in the microbiota mainly related to differential metal bioavailability. *Chemosphere* 89, 494-504. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.002>
- Campitelli, P., Ceppi, S., 2008. Chemical, physical and biological compost and

- vermicompost characterization: A chemometric study. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 90, 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2007.08.001>
- Carvalho Mendes, N.A., Oliveira Cunha, M.L., Bosse, M.A., Silva, V.M., Lima Moro, A., Agathokleous, E., Vicente, F.E., Rodrigues dos Reis d, A., 2023. Plant Physiology and Biochemistry Physiological and biochemical role of nickel in nodulation and biological nitrogen fixation in *Vigna unguiculata* L. Walp. *Plant Physiol. Biochem.* 201. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107869>
- Chandrasekhar, C., Ray, J.G., 2019. Lead accumulation, growth responses and biochemical changes of three plant species exposed to soil amended with different concentrations of lead nitrate. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 171, 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.058>
- Chávez Porras, Á., Pinzón Uribe, L.F., Velasquez Castiblanco, Y.L., 2017. Análisis comparativo de ensayos de Fito-remediación en lodos de lixiviado aplicando Análisis Envolvente de Datos. *Inge Cuc* 13, 79-83. <https://doi.org/10.17981/ingecuc.13.2.2017.07>
- Cheng, C.Y., Chu, L.M., 2011. Fate and distribution of nitrogen in soil and plants irrigated with landfill leachate. *Waste Manag.* 31, 1239-1249. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2011.01.028>
- Chouteau, J., Fauconnier, D., 1993. Fertilizando para alta calidad y rendimiento. Tabaco. Basilea, Suiza.
- Chu, Z., Wang, X., Wang, Y., Liu, G., Dong, Z., Lu, X., Chen, G., Zha, F., 2018. Effects of coal spoil amendment on heavy metal accumulation and physiological aspects of ryegrass (*Lolium perenne* L.) growing in copper mine tailings. *Environ.*

- Monit. Assess. 190. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6400-x>
- Costa, A.M., Alfaia, R.G. de S.M., Campos, J.C., 2019. Landfill leachate treatment in Brazil – An overview. *J. Environ. Manage.* 232, 110-116.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.11.006>
- Council., N.R., 1996. Use of Reclaimed Water and Sludge in Food Crop Production, Soil, Crop, and Ground Water Effects. National Academies Press.
- Daghan, H., 2019. Transgenic Tobacco for Phytoremediation of Metals and Metalloids, en: *Transgenic Plant Technology for Remediation of Toxic Metals and Metalloids*. Elsevier Inc., Eskisehir, pp. 279-297. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814389-6.00013-4>
- Delgadillo-López, A.E., González-Ramírez, C.A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J.R., Acevedo-Sandova, O., 2011. Phytoremediation: An alternative to eliminate pollution. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* 14, 597-612.
- Deng, L., Liu, F., Ding, Z., Liang, Y., Shi, Z., 2023. Effect of natural organic matter on Cr (VI ) reduction by reduced nontronite. *Chem. Geol.* 615, 121198.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2022.121198>
- Diez, J., Toncovich, M.E., Rodríguez, M.B., 2014. Fecha de trasplante y requerimientos de nutrientes (N-P-K) en lotes tabacaleros de Salta (Argentina ). *Cienc. del suelo* 32, 209-218.
- Dinu, C., Vasile, G., Buleandra, M., Ungureanu, E., 2020. Translocation and accumulation of heavy metals in *Ocimum basilicum* L. plants grown in a mining-contaminated soil. *J. Soils Sediments* 2141-2154.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11368-019-02550-w>

- Dracatos, P.M., Van Der Weerden, N.L., Carroll, K.T., Johnson, E.D., Plummer, K.M., Anderson, M.A., 2014. Inhibition of cereal rust fungi by both class I and II defensins derived from the flowers of *Nicotiana glauca*. *Mol. Plant Pathol.* 15, 67-79. <https://doi.org/10.1111/mpp.12066>
- Droppelmann, C. V., Oettinger, M., 2009. Tratamiento en lodo activado del lixiviado de un relleno sanitario. *Inf. Tecnol.* 20, 11-19. <https://doi.org/10.1612/inf.tecnol.3916it.07>
- Drzewiecka, K., Piechalak, A., Goliński, P., Gąsecka, M., Magdziak, Z., Szostek, M., Budzyńska, S., Niedzielski, P., Mleczek, M., 2019. Differences of *Acer platanoides* L. and *Tilia cordata* Mill. Response patterns/survival strategies during cultivation in extremely polluted mining sludge – A pot trial. *Chemosphere* 229, 589-601. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.051>
- Duan, B., Feng, Q., 2022. Risk Assessment and Potential Analysis of the Agricultural Use of Sewage Sludge in Central Shanxi Province. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 19. <https://doi.org/10.3390/ijerph19074236>
- Eid, E.M., Alrumman, S.A., Galal, T.M., El-Bebany, A.F., 2019. Regression models for monitoring trace metal accumulations by *Faba sativa* Bernh. plants grown in soils amended with different rates of sewage sludge. *Sci. Rep.* 9, 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41807-9>
- Eissa, M., Elgharably, G., Ghoneim, M., AbdElRazek, M., 2011. Phytoremediation of Cadmium, Lead and Nickel from the Contaminated Soils by Halophyte Species. *Assiut J. Agric. Sci.* 42, 529-543.
- El-Mahrouk, E.S.M., Eisa, E.A.H., Hegazi, M.A., Abdel-Gayed, M.E.S., Dewir, Y.H.,

- El-Mahrouk, M.E., Naidoo, Y., 2019. Phytoremediation of cadmium-, copper-, and lead-contaminated soil by *Salix mucronata* (Synonym *Salix safsaf*). *HortScience* 54, 1249-1257. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14018-19>
- Elias, M. de L., da Silva, L.F., Lima, L.S.M.D.S., Amorim, V.R., Hinojosa, M.A.G., Conde, A.L.F.M., Quintaes, B.R., Campos, J.C., 2019. Co-disposal of sludge generated during landfill leachate treatment with household solid waste. *Desalin. Water Treat.* 159, 141-150. <https://doi.org/10.5004/dwt.2019.23876>
- Elloumi, N., Belhaj, D., Jerbi, B., Zouari, M., Kallel, M., 2016. Effects of sewage sludge on bio-accumulation of heavy metals in tomato seedlings. *Spanish J. Agric. Res.* 14. <https://doi.org/10.5424/sjar/2016144-9210>
- Emiliani, J., Oyarce, W.G.L., Bergara, C.D., Salvatierra, L.M., Novo, L.A.B., Pérez, L.M., 2020. Variations in the phytoremediation efficiency of metal-polluted water with *salvinia biloba*: Prospects and toxicological impacts. *Water (Switzerland)* 12. <https://doi.org/10.3390/W12061737>
- Fan, X., Zhu, W., Qian, Y., Wu, S., Shu, S., Lin, N., 2019. Increasing the hydraulic conductivity of solidified sewage sludge for use as temporary landfill cover. *Adv. Civ. Eng.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8163563>
- Fathollahi, A., Khasteganan, N., Coupe, S.J., Newman, A.P., 2021. A meta-analysis of metal biosorption by suspended bacteria from three phyla. *Chemosphere* 268, 129290. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129290>
- Fiasconaro, M.L., Abrile, M.G., Hintermeister, L., Antolin, M. del C., Lovato, M.E., 2022. Application of different doses of compost as a substitution of the commercial substrate in nursery for pepper and tomato seedlings. *Int. J. Recycl. Org. waste*

- Agric. <https://doi.org/10.30486/ijrowa.2021.1921803.1195>
- Fiasconaro, M.L., Lovato, M.E., Antolín, M.C., Clementi, L.A., Torres, N., Gervasio, S., Martín, C.A., 2019. Role of proline accumulation on fruit quality of pepper (*Capsicum annuum* L.) grown with a K-rich compost under drought conditions. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 249, 280-288.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.002>
- Fiasconaro, M.L., Sánchez-Díaz, M., Antolín, M. del C., 2013. Nitrogen metabolism is related to improved water-use efficiency of nodulated alfalfa grown with sewage sludge under drought. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 176, 110-117.  
<https://doi.org/10.1002/jpln.201100393>
- Garg, A., Hazra, B., Zhu, H., Wen, Y., 2019. A simplified probabilistic analysis of water content and wilting in soil vegetated with non-crop species. *Catena* 175, 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2018.12.016>
- Gonzalez Huecas, C., Lopez Lafuente, A., Merino, L.M., Martín Gomez, M. del C., Lopez Fernández, G., 2003. Estudio de la influencia de los suelos contaminados por metales pesados en las aguas naturales. *ANAL. REAL ACAD. NAL. FARM.*
- Goswami, S., Das, S., 2016. Copper phytoremediation potential of *Calandula officinalis* L. and the role of antioxidant enzymes in metal tolerance. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 126, 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.030>
- Green, B.W., 2015. 2 - Fertilizers in aquaculture, en: *Feed and Feeding Practices in Aquaculture*. Elsevier Ltd, pp. 27-52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100506-4.00002-7>
- Gruposacsa, 2015. Importancia de los nitratos y fosfatos [WWW Document]. URL

<https://www.gruposacsa.com.mx/importancia-de-los-nitratos-y-fosfatos-en-las-plantas/#:~:text=Importancia de los nitratos y fosfatos en las plantas,crecimiento saludable de las plantas.&text=Sin el fósforo y el,de la planta se retarda.> (accedido 2.28.23).

Gutierrez Pulido, H., de la Vara Salazar, R., 2012. Análisis y diseño de experimentos. Mc Graw Hill, México.

He, J., Feng, X. ying, Zhou, L. rong, Zhang, L., 2021. The effect of leachate seepage on the mechanical properties and microstructure of solidified sludge when used as a landfill temporary cover material. *Waste Manag.* 130, 127-135.  
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.05.016>

He, Z., Shentu, Yang, X., Baligar, Zhang, T., Stoffella, &, 2015. Heavy Metal Contamination of Soils: Sources, Indicators, and Assessment. *J. Environ. Indic.* 9, 17-18.

Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. *Circ. Calif. Agric. Exp. Stn.* 347, 1-31.

Hough R.L.\*, Young, S.D., Crout, N.M.J., 2003. Modelling of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn uptake, by winter wheat and forage maize, from a sewage disposal farm. *Soil Use Manag.* 19, 19-27. <https://doi.org/10.1079/sum2002157>

Hough, R.L., Tye, A.M., Crout, N.M.J., McGrath, S.P., Zhang, H., Young, S.D., 2005. Evaluating a «Free Ion Activity Model» applied to metal uptake by *Lolium perenne* L. grown in contaminated soils. *Plant Soil* 270, 1-12.  
<https://doi.org/10.1007/s11104-004-1658-5>

IBM, 2021. Modelos lineales generalizados: Medias marginales estimadas [WWW

- Document]. SPSS Stat. URL <https://www.ibm.com/docs/es/spss-statistics/26.0.0?topic=models-generalized-linear-em-means> (accedido 3.3.23).
- INDEC, 2022. Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas 2022 [WWW Document]. URL <https://www.indec.gov.ar/indec/web/Nivel4-Tema-2-41-165>
- ISO 6579-1, 2017. Microbiology of the Food Chain — Horizontal Method for the Detection, Enumeration and Serotyping of Salmonella — Part 1. Detection of Salmonella spp., p 50.
- Jaafari, J., Yaghmaeian, K., 2019. Optimization of heavy metal biosorption onto freshwater algae (*Chlorella coloniales*) using response surface methodology (RSM). *Chemosphere* 217, 447-455.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.205>
- Jaskulak, M., Grobelak, A., Vandenbulcke, F., 2020. Modelling assisted phytoremediation of soils contaminated with heavy metals – Main opportunities, limitations, decision making and future prospects. *Chemosphere* 249, 126196.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126196>
- Jia, L., Liu, Z., Chen, W., Ye, Y., Yu, S., He, X., 2015. Hormesis Effects Induced by Cadmium on Growth and Photosynthetic Performance in a Hyperaccumulator, *Lonicera japonica* Thunb. *J. Plant Growth Regul.* 34, 13-21.  
<https://doi.org/10.1007/s00344-014-9433-1>
- Jones, D.L., Williamson, K.L., Owen, A.G., 2006. Phytoremediation of landfill leachate. *Waste Manag.* 26, 825-837.  
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2005.06.014>
- Khan, A.H.A., Kiyani, A., Cheema, A.S., Tareen, U., Nawaz, I., Iqbal, M., Yousaf, S.,

- 2020a. Integrative Application of Soil Conditioners and Bio-augmentation for Enhanced Heavy Metal Stabilization from Wastewater and Improved Growth of *Nicotiana alata* L. and *Petunia hybrida* L. *J. Plant Growth Regul.*  
<https://doi.org/10.1007/s00344-020-10094-4>
- Khan, A.H.A., Kiyani, A., Mirza, C.R., Butt, T.A., Barros, R., Ali, B., Iqbal, M., Yousaf, S., 2021. Ornamental plants for the phytoremediation of heavy metals: Present knowledge and future perspectives. *Environ. Res.* 195, 110780.  
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110780>
- Khan, A.H.A., Nawaz, I., Qu, Z., Butt, T.A., Yousaf, S., Iqbal, M., 2020b. Reduced growth response of ornamental plant *Nicotiana alata* L. upon selected heavy metals uptake, with co-application of ethylenediaminetetraacetic acid. *Chemosphere* 241, 125006. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125006>
- Khan, A.H.A., Nawaz, I., Yousaf, S., Cheema, A.S., Iqbal, M., 2019. Soil amendments enhanced the growth of *Nicotiana alata* L. and *Petunia hybrida* L. by stabilizing heavy metals from wastewater. *J. Environ. Manage.* 242, 46-55.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.040>
- Khavari-Nejad, R.A., Najafi, F., Tofighi, C., 2009. Diverse Responses of Tomato to N and P Deficiency. *Int. J. Agric. Biol.* 11, 209-213.
- Kim, K.R., Owens, G., 2010. Potential for enhanced phytoremediation of landfills using biosolids - a review. *J. Environ. Manage.* 91, 791-797.  
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.10.017>
- Komilis, D.P., Tziouvaras, I.S., 2009. A statistical analysis to assess the maturity and stability of six composts. *Waste Manag.* 29, 1504-1513.

<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2008.10.016>

Korzeniowska, J., Stanislawska-Glubiak, E., 2019. Phytoremediation potential of *Phalaris arundinacea*, *Salix viminalis* and *Zea mays* for nickel-contaminated soils. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 16, 1999-2008. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1823-7>

Kostopoulou, P., Karagiannidis, A., Rakimbei, P., Tsiouvaras, K., 2010. Simulating the water balance in an old non-engineered landfill for optimizing plant cover establishment in an arid environment. *Desalination* 250, 373-377.

<https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.09.059>

Krauss, M., Wilcke, W., Kobza, J., Zech, W., Freundlich, P.V.F., 2002. Predicting heavy metal transfer from soil to plant: potential use of Freundlich-type functions. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 165, 3-8.

Kumar, V., Shah, M.P., Shahi, S.K. (Eds.), 2022. *Phytoremediation Technology for the Removal of Heavy Metals and Other Contaminants from Soil and Water*, Elsevier I. ed, *Phytoremediation Technology for the Removal of Heavy Metals and Other Contaminants from Soil and Water*. Amsterdam. <https://doi.org/10.1016/c2020-0-02583-1>

Kumar, V., Singh, J., Kumar, P., 2019. Heavy metal uptake by water lettuce (*Pistia stratiotes* L.) from paper mill effluent (pme): Experimental and prediction modeling studies. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 14400-14413.

<https://doi.org/10.1007/s11356-019-04766-2>

Kurniawan, T.A., Othman, M.H.D., Liang, X., Goh, H.H., Chew, K.W., 2023. From liquid waste to mineral fertilizer: Recovery, recycle and reuse of high-value macro-

nutrients from landfill leachate to contribute to circular economy, food security, and carbon neutrality. *Process Saf. Environ. Prot.* 170, 791-807.

<https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.12.068>

Kutrowska, A., Szlag, M., 2014. Low-molecular weight organic acids and peptides involved in the long-distance transport of trace metals. *Acta Physiol. Plant.* 36, 1957-1968. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1576-y>

Lay, F.T., Mills, G.D., Poon, I.K.H., Cowieson, N.P., Kirby, N., Baxter, A.A., Van Der Weerden, N.L., Dogovski, C., Perugini, M.A., Anderson, M.A., Kvensakul, M., Hulett, M.D., 2012. Dimerization of plant defensin NaD1 enhances its antifungal activity. *J. Biol. Chem.* 287, 19961-19972.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.331009>

Li, F. li, Qiu, Y., Xu, X., Yang, F., Wang, Z., Feng, J., Wang, J., 2020. EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metals from sludge soil by Italian ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 191, 110185.

<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110185>

Li, S., Yang, D., Tian, J., Wang, S., Yan, Y., He, X., Du, Z., Zhong, F., 2022.

Physiological and transcriptional response of carbohydrate and nitrogen metabolism in tomato plant leaves to nickel ion and nitrogen levels. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 292, 110620. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110620>

Lin, H., Liu, C., Li, B., Dong, Y., 2021. *Trifolium repens* L. regulated phytoremediation of heavy metal contaminated soil by promoting soil enzyme activities and beneficial rhizosphere associated microorganisms. *J. Hazard. Mater.* 402, 123829.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123829>

- Liu, C., Lin, H., Dong, Y., Li, B., Liu, Y., 2018. Investigation on microbial community in remediation of lead-contaminated soil by *Trifolium repens*L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 165, 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.054>
- Liu, L., Li, Y., Tang, J., Hu, L., Chen, X., 2011. Plant coexistence can enhance phytoextraction of cadmium by tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in contaminated soil. *J. Environ. Sci.* 23, 453-460. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60430-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60430-5)
- Liu, X., Mao, Y., Zhang, X., Gu, P., Niu, Y., Chen, X., 2019. Effects of PASP/NTA and TS on the phytoremediation of pyrene-nickel contaminated soil by *Bidens pilosa* L. *Chemosphere* 237, 124502. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124502>
- Liu, Z., Tran, K.Q., 2021. A review on disposal and utilization of phytoremediation plants containing heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 226, 112821. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112821>
- Lopes, C., Herva, M., Franco-Uría, A., Roca, E., 2012. Multicorrelation models and uptake factors to estimate extractable metal concentrations from soil and metal in plants in pasturelands fertilized with manure. *Environ. Pollut.* 166, 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.02.017>
- Luo, J., Cao, M., Zhang, C., Wu, J., Gu, X.W.S., 2020. The influence of light combination on the physicochemical characteristics and enzymatic activity of soil with multi-metal pollution in phytoremediation. *J. Hazard. Mater.* 393, 122406. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122406>
- Luo, K., Ma, T., Liu, H., Wu, L., Ren, J., Nai, F., Li, R., Chen, L., Luo, Y., Christie, P., 2015. Efficiency of Repeated Phytoextraction of Cadmium and Zinc from an Agricultural Soil Contaminated with Sewage Sludge. *Int. J. Phytoremediation* 17,

575-582. <https://doi.org/10.1080/15226514.2014.935286>

- Mahmood, T., 2010. Phytoextraction of heavy metals - the process and scope for remediation of contaminated soils. *Soil Environ.* 29, 91-109.
- Martínez-Sánchez, A., Aguayo, E., 2019. Effect of irrigation with ozonated water on the quality of capsicum seedlings grown in the nursery. *Agric. Water Manag.* 221, 547-555. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2019.05.027>
- Maxted, A.P., Black, C.R., West, H.M., Crout, N.M.J., McGrath, S.P., Young, S.D., 2007. Phytoextraction of cadmium and zinc from arable soils amended with sewage sludge using *Thlaspi caerulescens*: Development of a predictive model. *Environ. Pollut.* 150, 363-372. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.021>
- MDSyMA, 2018. Resolución 410/18-Norma técnica para el manejo sustentable de barros y biosólidos generados en plantas depuradoras de efluentes líquidos cloacales y mixtos cloacales-industriales, Boletín Oficial 16/07/2018. Argentina.
- Memarian, R., Ramamurthy, A.S., 2013. Modeling of lead and cadmium uptake by plants in the presence of surfactants. *Environ. Monit. Assess.* 185, 2067-2071. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2688-8>
- Méndez, A.M., 2014. Papel de los carbohidratos en la tolerancia al estrés hídrico en líneas recombinantes con sustitución de cromosomas de cebada. Estudio bioquímico y molecular. Universidad de Salamanca.
- Miceli, A., Sabatino, L., Moncada, A., Vetrano, F., D'Anna, F., 2014. Nursery and field evaluation of eggplant grafted onto unrooted cuttings of *Solanum torvum* Sw. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 178, 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.08.025>
- Michael, P.I., Krishnaswamy, M., 2011. The effect of zinc stress combined with high

irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 74, 171-177.

<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.05.016>

Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible Argentina, 2019. Informe del estado del ambiente [WWW Document]. URL <https://informe.ambiente.gob.ar/> (accedido 8.25.20).

Mirzaei, M., Verrelst, J., Bakhtiari, A.R., Marofi, S., 2021. Potential use of grapevine cv Askari for heavy metal phytoremediation purposes at greenhouse scale 12447-12458.

Mohammadi, F., Samaei, M.R., Azhdarpoor, A., Teiri, H., Badeenezhad, A., Rostami, S., 2019. Modelling and Optimizing Pyrene Removal from the Soil by Phytoremediation using Response Surface Methodology, Artificial Neural Networks, and Genetic Algorithm. *Chemosphere* 237, 124486.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124486>

Montgomery, D.C., 2013. Design and analysis of experiments, 8 th. ed. John Wiley & Sons.

Mousavi, S.A., Almasi, A., Kamari, Z., Abdali, F., Yosefi, Z., 2015. Application of the central composite design and response surface methodology for the treatment of Kermanshah landfill leachate by a sequencing batch reactor. *Desalin. Water Treat.* 56, 622-628. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.938302>

Mustafa, A., Zulfiqar, U., Zahid, M., Radziemska, M., Ullah, F., Holatko, J., Hammersmiedt, T., Naveed, M., Ali, H., Kintl, A., Saeed, Q., Kucerik, J., Brtnicky, M., 2023. Nickel ( Ni ) phytotoxicity and detoxification mechanisms : A

review. *Chemosphere* 328, 138574.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138574>

Nagendran, R., Selvam, A., Joseph, K., Chiemchaisri, C., 2006. Phytoremediation and rehabilitation of municipal solid waste landfills and dumpsites: A brief review.

*Waste Manag.* 26, 1357-1369. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.05.003>

Naghipour, D., Jaafari, J., Ashrafi, S.D., Mahvi, A.H., 2017. Remediation of heavy

metals contaminated silty clay loam soil by column extraction with

ethylenediaminetetraacetic acid and nitrilo triacetic acid. *J. Environ. Eng. (United*

*States)* 143, 1-8. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0001219](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0001219)

Naranjo-Morán, J.A., Mora-Fonzalez, A.F., Moina-Qumí, E., Ruíz-Barzonal, O., Al.,

E., 2022. COMPORTAMIENTO EN LA ABSORCIÓN DE Na Y Pb EN

PLANTAS DE CUCURBITÁCEAS E INOCULACIÓN DE MICORRIZAS

ARBUSCULARES NATIVAS EN ESPECIE TOLERANTE Y SUCEPTIBLE.

*Rev. Int. Contam. Ambie.* 38, 407-421.

<https://doi.org/https://doi.org/10.20937/RICA.54023>

Ni, J.J., Bordoloi, S., Shao, W., Garg, A., Xu, G., Sarmah, A.K., 2020. Two-year

evaluation of hydraulic properties of biochar-amended vegetated soil for

application in landfill cover system. *Sci. Total Environ.* 712, 136486.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136486>

Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P., 2000.

Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 548-572.

<https://doi.org/10.1128/mnbr.64.3.548-572.2000>

- Padmavathiamma, P.K., Li, L.Y., 2012. Rhizosphere influence and seasonal impact on phytostabilisation of metals-A field study. *Water. Air. Soil Pollut.* 223, 107-124.  
<https://doi.org/10.1007/s11270-011-0843-4>
- Padmavathiamma, P.K., Li, L.Y., 2007. Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water. Air. Soil Pollut.* 184, 105-126.  
<https://doi.org/10.1007/s11270-007-9401-5>
- Pandey, V.C., Bajpai, O., 2019. *Phytoremediation: From Theory Toward Practice, Phytomanagement of Polluted Sites.* Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813912-7.00001-6>
- Parwez, R., Nabi, A., Mukarram, M., Aftab, T., Khan, M.M.A., Naeem, M., 2021. Chapter 17 - Role of nickel in regulation of nitrogen metabolism in legume–rhizobium symbiosis under critical conditions, en: Aftab, T., Hakeem, K.R.B.T.-F. in P.-S.I. (Eds.), . Academic Press, pp. 495-522.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90943-3.00021-3>
- Pathak, S., Agarwal, A.V., Pandey, V.C., 2020. Phytoremediation—a holistic approach for remediation of heavy metals and metalloids, *Bioremediation of Pollutants.* INC.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819025-8.00001-6>
- Pedron, F., Grifoni, M., Barbafieri, M., Petruzzelli, G., Rosellini, I., Franchi, E., Bagatin, R., Voccianti, M., 2017. Applicability of a Freundlich-Like Model for Plant Uptake at an Industrial Contaminated Site with a High Variable Arsenic Concentration. *Environments* 4, 67. <https://doi.org/10.3390/environments4040067>
- Ratto, M.A., Vega, C., Garrido, T. (Eds.), 1983. *Control Microbiológico de Leche y Productos Lácteos, Métodos recomendados.* Universidad Mayor de San Marco,

Lima, Perú.

- Regaldo, L., Reno, U., Romero, N., Avilés, A., Abdala Díaz, R.T., Polla, W., Gagnetten, A.M., 2020. Multifunctional approach to evaluate the efficiency of landfill leachate treatments, en: Removal of Toxic Pollutants Through Microbiological and Tertiary Treatment. pp. 179-209. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821014-7.00006-x>
- Rehman, M.Z. ur, Rizwan, M., Ali, S., Ok, Y.S., Ishaque, W., Saifullah, Nawaz, M.F., Akmal, F., Waqar, M., 2017. Remediation of heavy metal contaminated soils by using *Solanum nigrum*: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 143, 236-248. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.038>
- Ren, X., Yan, R., Wang, H.C., Kou, Y.Y., Chae, K.J., Kim, I.S., Park, Y.J., Wang, A.J., 2015. Citric acid and ethylene diamine tetra-acetic acid as effective washing agents to treat sewage sludge for agricultural reuse. *Waste Manag.* 46, 440-448. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.07.021>
- Reyes Roa, C.Y., 2020. Estudio de bioacumulación de metales pesados en plantas de consumo humano para sensado molecular In situ. Pontificia Universidad Javeriana Bogotá.
- Riffo, C.A., 2016. Transferencia de metales pesados Cu, Pb, Zn, Ni, Co y Cr desde un suelo de la comuna de Talcahuano a las plantas *Salicornia* y *Lolium Perenne*. Univ. Católica la Santísima Concepción.
- Rosén, K., Eriksson, J., Vinichuk, M., 2012. Uptake and translocation of <sup>109</sup>Cd and stable Cd within tobacco plants (*Nicotiana sylvestris*). *J. Environ. Radioact.* 113, 16-20. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2012.04.008>
- Rosli, N.A., Aziz, H.A., Selamat, M.R., Lim, L.L.P., 2020. A mixture of sewage sludge

- and red gypsum as an alternative material for temporary landfill cover. *J. Environ. Manage.* 263, 110420. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110420>
- Saber, A., Tafazzoli, M., Mortazavian, S., James, D.E., 2018. Investigation of kinetics and absorption isotherm models for hydroponic phytoremediation of waters contaminated with sulfate. *J. Environ. Manage.* 207, 276-291. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.11.039>
- Salazar, M.J., Pignata, M.L., 2014. Lead accumulation in plants grown in polluted soils. Screening of native species for phytoremediation. *J. Geochemical Explor.* 137, 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2013.11.003>
- Salehi, N., Azhdarpoor, A., Shirdarreh, M., 2020. The effect of different levels of leachate on phytoremediation of pyrene-contaminated soil and simultaneous extraction of lead and cadmium. *Chemosphere* 246, 125845. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125845>
- Salem, Z., Hamouri, K., Djemaa, R., Allia, K., 2008. Evaluation of landfill leachate pollution and treatment. *Desalination* 220, 108-114. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.01.026>
- Santa Fe, (Gobierno de la Ciudad), Bolsa de Comercio, 2019. Santa fe Cómo Vamos 2018. Santa Fe.
- Sarwar, N., Imran, M., Shaheen, M.R., Ishaque, W., Kamran, M.A., Matloob, A., Rehim, A., Hussain, S., 2017. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere* 171, 710-721. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.116>
- Schwab, P., Zhu, D., Banks, M.K., 2007. Heavy metal leaching from mine tailings as

- affected by organic amendments. *Bioresour. Technol.* 98, 2935-2941.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.10.012>
- Seleiman, M.F., Santanen, A., Mäkelä, P.S.A., 2020. Recycling sludge on cropland as fertilizer – Advantages and risks. *Resour. Conserv. Recycl.* 155, 104647.  
<https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.104647>
- Selim, S.M., Zayed, M.S., Atta, H.M., 2012. Evaluation of phytotoxicity of compost during composting process. *Nat. Sci.* 10, 69-77.
- Shah, V., Daverey, A., 2020. Phytoremediation: A multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. *Environ. Technol. Innov.* 18, 100774.  
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100774>
- Sharma, A., Pandey, H., Devadas, V.S., Kartha, B.D., Vashishth, A., 2023. Beneficial effect of heavy metals, antagonistic effect and gene regulations in nutrient translocation through soilless culture. *J. Agric. Food Res.* 12, 100600.  
<https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100600>
- Shen, X., Dai, M., Yang, J., Sun, L., Tan, X., Peng, C., Ali, I., Naz, I., 2022. A critical review on the phytoremediation of heavy metals from environment: Performance and challenges. *Chemosphere* 291, 132979.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132979>
- Shi, Q., Hua, J., Yin, Y., Creech, D., Lu, Z., 2023. Moderate application of nitrogen augments the growth of *Taxodium* hybrid ‘Zhongshanshan 406’ plants in coastal soils. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 321, 112274.  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112274>
- Silbert, V., Campitelli, P., Suárez, M.F., Garrido, G., 2018. Manual de buenas prácticas

para producir compost hogareño.

Singh, G., Pankaj, U., Ajayakumar, P. V., Verma, R.K., 2020. Phytoremediation of sewage sludge by *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. *motia* Burk. grown under soil amended with varying levels of sewage sludge. *Int. J. Phytoremediation* 22, 540-550. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1687422>

Singh, V., Phuleria, H.C., Chandel, M.K., 2022. Unlocking the nutrient value of sewage sludge. *Water Environ. J.* 321-331. <https://doi.org/10.1111/wej.12739>

Song, U., 2018. Selecting plant species for landfill revegetation: A test of 10 native species on reclaimed soils. *J. Ecol. Environ.* 42, 1-6. <https://doi.org/10.1186/s41610-018-0089-9>

Song, U., Lee, E.J., 2010. Environmental and economical assessment of sewage sludge compost application on soil and plants in a landfill. *Resour. Conserv. Recycl.* 54, 1109-1116. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2010.03.005>

Suárez, A.M., Sánchez-Chávez, E., Héctor Ardisana, E.F., Santos-Cervantes, M.E., Álvarez, S.P., 2017. Actividad de enzimas del estrés oxidativo en plantas de tomate cv. Amalia en respuesta al plomo. *Hortic. Bras.* 35, 216-223. <https://doi.org/10.1590/s0102-053620170210>

Talalaj, I.A., Biedka, P., 2015. Impact of concentrated leachate recirculation on effectiveness of leachate treatment by reverse osmosis. *Ecol. Eng.* 85, 185-192. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.10.002>

Tchobanoglous, G., Theisen, H., Vigil, S., 1994. *Gestión integral de residuos sólidos*. Mc Graw Hill, Madrid, España.

Titah, H.S., Halmi, M.I.E. Bin, Abdullah, S.R.S., Hasan, H.A., Idris, M., Anuar, N.,

2018. Statistical optimization of the phytoremediation of arsenic by *Ludwigia octovalvis*- in a pilot reed bed using response surface methodology (RSM) versus an artificial neural network (ANN). *Int. J. Phytoremediation* 20, 721-729.  
<https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1413337>
- Upcraft, T., Guo, M., 2020. Phytoremediation value chains and modeling, *Sustainable Remediation of Contaminated Soil and Groundwater*. Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817982-6.00013-6>
- van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Pollard, A.J., Schat, H., 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant Soil* 362, 319-334. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1287-3>
- Van Dyck, I., Vanhoudt, N., Vives, J., Horemans, N., Gompel, A. Van, Nauts, R., Vangronsveld, J., 2023. Effects of environmental parameters on starch and soluble sugars in *Lemna minor*. *Plant Physiol. Biochem.* 200, 107755.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107755>
- Varnero, M.T.M., Rojas, C.A., Orellana, R.R., 2007. Phytotoxicity indices of organic residues during composting. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 7, 28-37.  
<https://doi.org/10.4067/S0718-27912007000100003>
- Vasile, G.-G., Tenea, A.-G., Dinu, C., Iordache, M.M.A., Gheorghe, S., Mureseanu, M., Pascu, L.F., 2021. Bioavailability, Accumulation and Distribution of Toxic Metals (As, Cd, Ni and Pb ) and Their Impact on *Sinapis alba* Plant Nutrient Metabolism. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 18, 12947.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijerph182412947>
- Venkatachalam, P., Priyanka, N., Manikandan, K., Ganeshbabu, I., Indiraarulsevi, P.,

- Geetha, N., Muralikrishna, K., Bhattacharya, R.C., Tiwari, M., Sharma, N., Sahi, S. V., 2017. Enhanced plant growth promoting role of phycomolecules coated zinc oxide nanoparticles with P supplementation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Physiol. Biochem.* 110, 118-127.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.09.004>
- Vera Candiotti, L., De Zan, M.M., Cámara, M.S., Goicoechea, H.C., 2014. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta* 124, 123-138.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>
- Wan, X., Lei, M., Chen, T., 2016. Cost–benefit calculation of phytoremediation technology for heavy-metal-contaminated soil. *Sci. Total Environ.* 563-564, 796-802. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.080>
- Wang, K., Li, L., Tan, F., Wu, D., 2018. Treatment of landfill leachate using activated sludge technology: A review. *Archaea* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1039453>
- Werle, S., Sobek, S., 2019. Gasification of sewage sludge within a circular economy perspective: a Polish case study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 35422-35432.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-05897-2>
- Wu, D., Yu, X., Lai, M., Feng, J., Dong, X., Peng, W., Su, S., Zhang, X., Wan, L., Jacobs, D.F., Zeng, S., 2021. Diversified effects of co-planting landscape plants on heavy metals pollution remediation in urban soil amended with sewage sludge. *J. Hazard. Mater.* 403, 123855. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123855>
- Xiong, Z.T., 1997. Bioaccumulation and physiological effects of excess lead in a roadside pioneer species *Sonchus oleraceus* L. *Environ. Pollut.* 97, 275-279.

[https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(97\)00086-9](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(97)00086-9)

- Yaashikaa, P.R., Kumar, P.S., Saravanan, A., 2019. Modeling and Cr(VI) ion uptake kinetics of Sorghum bicolor plant assisted by plant growth-promoting Pannonibacter phragmetitus: an ecofriendly approach. Environ. Sci. Pollut. Res. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05764-0>
- Yang, Y., Ge, Y., Zeng, H., Zhou, X., Peng, L., Zeng, Q., 2017. Phytoextraction of cadmium- contaminated soil and potential of regenerated tobacco biomass for recovery of cadmium. Sci. Rep. 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05834-8>
- Zaier, H., Ghnaya, T., Ben Rejeb, K., Lakhdar, A., Rejeb, S., Jemal, F., 2010. Effects of EDTA on phytoextraction of heavy metals (Zn, Mn and Pb) from sludge-amended soil with Brassica napus. Bioresour. Technol. 101, 3978-3983. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.035>
- Zhang, H., Yuan, X., Xiong, T., Wang, H., Jiang, L., 2020. Bioremediation of co-contaminated soil with heavy metals and pesticides: Influence factors, mechanisms and evaluation methods. Chem. Eng. J. 398, 125657. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125657>
- Zhang, J., Yang, N., Geng, Y., Zhou, J., Lei, J., 2019. Effects of the combined pollution of cadmium, lead and zinc on the phytoextraction efficiency of ryegrass (: Lolium perenne L.). RSC Adv. 9, 20603-20611. <https://doi.org/10.1039/c9ra01986c>
- Zhao, X., Joo, J.C., Lee, J.K., Kim, J.Y., 2019. Mathematical estimation of heavy metal accumulations in Helianthus annuus L. with a sigmoid heavy metal uptake model. Chemosphere 220, 965-973. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.210>
- Zhu, Y., Zeng, G., Zhang, P., Zhang, C., Ren, M., Zhang, J., Chen, M., 2013. Feasibility

of bioleaching combined with Fenton-like reaction to remove heavy metals from sewage sludge. *Bioresour. Technol.* 142, 530-534.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.070>

Zucconi, F., Forte, M., Monaco, A., De Bertoldi, M., 1981. Biological evaluation of compost maturity. *Biocycle* 22, 27-29.

**Doctorado en Ingeniería  
mención Ambiental**

Título de la obra:

**Aplicación de una tecnología sustentable para la  
biopurificación u aprovechamiento de nutrientes de efluentes  
de alto impacto ambiental**

Autor: Mariana Guadalupe Abrile

Lugar: Santa Fe, Argentina

Palabras Claves:

Biosólidos,  
Aprovechamiento de efluentes,  
Fitorremediación,  
*Nicotiana glauca* L.,  
Rellenos sanitarios,  
Enmienda orgánica,  
Remediación de suelos,  
Revegetación.