



USO POTENCIAL DEL HUIZACHE (*Acacia farnesiana* L. Will) EN LA FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON PLOMO

POTENTIAL USE OF HUIZACHE (*Acacia farnesiana* L. Will) IN PHYTOREMEDIATION OF LEAD-CONTAMINATED SOILS

Oscar Landeros-Márquez¹; Ricardo Trejo-Calzada^{1*}; Manuel Reveles-Hernández²; Ricardo David Valdez-Cepeda³; Jesús Guadalupe Arreola-Ávila¹; Aurelio Pedroza-Sandoval¹; José Ruíz-Torres¹

¹Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo. Domicilio conocido Bermejillo, Durango. Apartado Postal 8, C. P. 35230, MÉXICO. (*Autor para correspondencia) Correo-e: rtrejo@chapingo.urruza.edu.mx

²Campo Agrícola Experimental Zacatecas. INIFAP. km 24.5 carretera Zacatecas-Fresnillo. Apartado Postal 18. Calera de V.R., Zacatecas, C. P. 98500. MÉXICO.

³Centro Regional Universitario Centro Norte, Universidad Autónoma Chapingo, Apartado Postal 196, CP 98001, Zacatecas, Zacatecas, MÉXICO.

RESUMEN

Se ha realizado un gran número de estudios para identificar los efectos de los metales pesados en plantas cultivadas y en algunas especies consideradas como hiperacumuladoras. Sin embargo, pocos esfuerzos se han dedicado a la evaluación de especies vegetales nativas de zonas áridas para fitorremediación. Este estudio se llevó a cabo *ex situ* para evaluar la tasa de fitoextracción de plomo en *Acacia farnesiana* L. Will. Se utilizaron árboles jóvenes (n=48), colocados en macetas plásticas, en donde se agregó una combinación de tres concentraciones de plomo (0, 250 y 500 mg·kg⁻¹) en forma de Pb(NO₃)₂ y cuatro dosis de nitrógeno (0, 100, 300 y 500 mg·kg⁻¹) en forma de Fosfo-Nitrato (33-03-00). Se evaluó la tasa fotosintética y la concentración de plomo en raíz, tallo y hoja. Las dosis de nitrógeno y las concentraciones de plomo por separado no produjeron diferencias significativas en la tasa fotosintética de las plantas de huizache, pero la interacción entre esos dos factores fue estadísticamente significativa (P=0.0074), encontrándose que la mayor acumulación de plomo ocurrió en la parte aérea de la planta con una media de 352.34 mg·kg⁻¹.

Recibido: 23 de agosto, 2010
Aceptado: 21 de septiembre, 2010
doi: 10.5154/r.chscfa.2010.08.059
<http://www.chapingo.mx/revistas>

PALABRAS CLAVE: Contaminación, plomo, fitoextracción, fotosíntesis, *Acacia farnesiana*.

ABSTRACT

Several studies have been carried out in order to identify the effects of heavy metals in cultivated plants and in some species considered as hyperaccumulators. However, little efforts have been performed on assessment of native species in arid areas for phytoremediation. The current study was carried out *ex situ* in order to evaluate lead phytoextraction rate in *Acacia farnesiana* L. Will. Young plants (n=48) were placed in plastic pots, in which a combination of three concentrations of lead was added (0, 250 y 500 mg·kg⁻¹) in the form of Pb(NO₃)₂ and four nitrogen doses (0, 100, 300 y 500 mg·kg⁻¹) in the form of phospho-nitrate (33-03-00). Photosynthetic rate and lead concentration in root, stem and leaf were evaluated. Nitrogen doses and lead concentrations separately didn't provoke significant differences in photosynthetic rate of acacia plants, however, the interaction between these factors was statistically significant (P=0.0074), observing that the highest accumulation of lead was in aerial parts of the plants with a mean of 352.34 mg·kg⁻¹.

KEY WORDS: Pollution, lead, phytoextraction, photosynthesis, *Acacia farnesiana*.

INTRODUCCIÓN

La contaminación de suelos con metales pesados ha sido ampliamente documentada y se han desarrollado diferentes tecnologías para eliminar o reducir esos problemas (Miteva *et al.*, 2001); al respecto, la fitorremediación es una tecnología económica basada en el uso de plantas acumuladoras de metales para removerlos del suelo (Lasat, 2002).

INTRODUCTION

Soil pollution with heavy metals has been documented, and different technologies have been developed in order to reduce these problems (Miteva *et al.*, 2001); on the matter, phytoremediation is an economic technology based on the use of metal accumulator plants to remove pollutants from soil (Lasat, 2002).

Asimismo, se emplean enmiendas al suelo y otras técnicas agronómicas para eliminar, retener o disminuir la toxicidad de los contaminantes del suelo (Chaney *et al.*, 1997). Estas tecnologías reúnen gran número de ventajas, sobre todo limpieza y economía, aunque dan resultado sólo a mediano y largo plazo, ya que requieren varios ciclos; una de estas tecnologías es la fitoextracción, que se basa en la absorción de los contaminantes del suelo por las plantas (Salt *et al.*, 1998). Dentro de ella se han empleado dos estrategias básicas: A) Fitoextracción continua, perdurable a largo plazo, la cual se lleva a cabo por plantas hiperacumuladoras capaces de acumular en parte aérea concentraciones muy altas de metales; B) Fitoextracción inducida, se debe a la adición al suelo de un complejante que incrementa la solubilidad del contaminante en cuestión, elevando drásticamente su concentración en la disolución del suelo y por tanto su biodisponibilidad, lo que favorece la toma del metal por la raíz. Lo anterior permite emplear especies vegetales acumuladoras con alta biomasa, en lugar de hiperacumuladoras (Huang *et al.*, 1997).

El desarrollo reciente de tecnología de fitorremediación marca un progreso significativo en este campo; esto permite el empleo de plantas para quitar agentes contaminantes o hacerlos inocuos (Salt *et al.*, 1998), concibiendo a la planta como mecanismos constitutivos y/o adaptables para la acumulación y la tolerancia en la rizosfera exportando los metales y limpiando el suelo (Khan *et al.*, 2000). Según Meagher (2000), la fitorremediación es ampliamente considerada como una alternativa responsable ecológicamente y a un bajo precio; comparada con los métodos caros físicos y/o químicos que actualmente se desarrollan, la fitoextracción de metales pesados ha surgido como una nueva promesa rentable y alternativa a los métodos de descontaminación convencionales a base de ingeniería (Salt *et al.*, 1995).

Las investigaciones recientes han mostrado que enmiendas químicas con quelatos sintéticos orgánicos, pueden aumentar la biodisponibilidad de metales pesados en el suelo, lo cual optimiza la respuesta de las plantas y el desplazamiento de los metales pesados de las raíces a las partes aéreas del vegetal (Huang *et al.*, 1997; Epstein *et al.*, 1999); otra práctica muy común es el uso de fertilizantes cuando se aplica en suelos contaminados con metales pesados. Los fertilizantes inorgánicos son considerados como aditivos del suelo que proveen nutrientes necesarios para plantas de alto rendimiento y para acidificar el suelo, obteniendo así una mayor biodisponibilidad (Lasat, 2000).

Se ha demostrado que la adición de fertilizantes al suelo puede provocar un incremento en la fitoextracción de metales pesados por plantas acumuladoras; por ejemplo, la urea incrementa el cadmio intercambiable y soluble en agua del suelo, probablemente a través de la

Likewise, soil amendments and others agronomic techniques were use in order to destroy or decrease soil pollution toxicity (Chaney *et al.*, 1997). These technologies generate a lot of advantages (especially cleaning and economic benefits), although changes start to appear at medium and long term (many cycles are required); one of these technologies is known as phytoextraction, based on absorption of soil pollutants by plants (Salt *et al.*, 1998). From this technology two basic strategies have been created: A) continuous phytoextraction (lasting long-term), which is carried out by hyperaccumulator plants capable of accumulating high metals concentrations in aerial parts; B) induced phytoextraction, that is to say, adding a complex to soil increasing pollutant solubility, rising drastically its concentration in soil dissolution and therefore its bioavailability, obtaining metal by the root. This implies to use accumulator plants with high biomass, instead of hyperaccumulator plants (Huang *et al.*, 1997).

The recent development of phytoremediation technology shows a significant progress in this field, allowing the use of plants in order to remove pollutants or making them harmless (Salt *et al.*, 1998), conceiving the plant as an establishing or/and adaptive mechanisms for accumulation and tolerance in rizosphere exporting metals and cleaning the soil. (Khan *et al.*, 2000). According to Meagher (2000), phytoremediation is widely known as an environmentally responsible alternative with a low price; in contrast with the expensive physical and/or chemical methods currently being developed. Heavy metals phytoextraction has arisen as a new alternative and profitable promise of the conventional decontamination methods engineering based (Salt *et al.*, 1995).

Recent researches have shown that chemical amendment with chelates can increase the bioavailability of heavy metals in soils, optimizing plants reaction and moving heavy metals from the roots to the aerial parts of the plant (Huang *et al.*, 1997; Epstein *et al.*, 1999); another common process is the use of fertilizers applied to contaminated soils with heavy metals. Inorganic fertilizers are known as soil additives that produce nutrients required for high yield plants and to acidify soils, receiving a greater bioavailability (Lasat, 2000).

It have been demonstrated that adding fertilizers to soils can produce a rise in heavy metals phytoextraction by accumulator plants; for example, urea increases the exchangeable and soluble cadmium in soil water, probably by means of acidification (Brown *et al.*, 2003). Ammonium ion can provoke the desorption of heavy metals from exchange places or from soil colloids by means of ions exchange, providing absorption by plants. Environmental impact of metal contaminants in soils and sediments is strictly dependent of the ability of the complex with the environment components and their reaction to

acidificación (Brown *et al.*, 2003). El ión amonio puede provocar la desorción de metales pesados de los sitios de intercambio o de los coloides del suelo mediante intercambio de iones, y así facilitar la absorción por las plantas. El impacto ambiental de los contaminantes metálicos en suelos y sedimentos, es estrictamente dependiente de la capacidad de complejamiento de éstos con componentes del medio ambiente y su respuesta a las condiciones fisicoquímicas y biológicas de su entorno (McGowen *et al.*, 2001).

Numerosos estudios se han llevado a cabo para identificar los efectos de los metales pesados en plantas cultivadas y en algunas especies consideradas como hiperacumuladoras. Sin embargo, pocos esfuerzos se han dedicado a la evaluación de los efectos de los metales pesados en poblaciones vegetales nativas y sus efectos colaterales en los ecosistemas y la diversidad genética y biológica.

A pesar del gran potencial de la fitorremediación y los muchos experimentos realizados para establecer una adecuada metodología, el empleo de plantas para la descontaminación de suelo está todavía en la fase de desarrollo; como ha sido afirmado por Van Der Lelie *et al.* (2006), hay todavía una necesidad urgente de la investigación que apunte fundamentalmente al conocimiento de mecanismos implicados en el suelo y la deposición de los metales en la planta, así como proyectos de demostración para optimizar los procesos de fitorremediación y convencer a tomadores de decisión y al público sobre las ventajas de la técnica.

La región Lagunera incluye municipios de los estados de Durango y Coahuila en el norte de México. En esta región se han identificado áreas con altas concentraciones de plomo (Valdés y Cabrera, 1999; Trejo-Calzada *et al.*, 2007) y se han establecido algunas medidas para tratar de abatir la contaminación. Sin embargo, poco se ha explorado la alternativa de emplear especies vegetales nativas en la remediación de los suelos y la reducción de los riesgos de que los metales pesados contaminantes sean accesibles a la población humana, puesto que la sequedad del ambiente y los vientos frecuentes permiten que los metales, y particularmente el plomo presente en el suelo, sean inhalados por los humanos. Es evidente que se requieren medidas que reduzcan o eliminen el plomo del suelo y que permitan hacer una adecuada deposición de estos contaminantes. Una alternativa para la extracción de plomo del suelo es el uso de plantas, pero ésta debe ser auxiliada con medidas de manejo agronómico y aplicación de fertilizantes y/o agentes quelantes (Vassil *et al.*, 1998) para hacer más eficiente el proceso, dado que en forma natural el plomo no se encuentra bioasimilable en el suelo (Lasat, 2002). Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del plomo en la actividad fotosintética

biological and physicochemical conditions of their environment (McGowen *et al.*, 2001).

Many studies have been carried out in order to identify heavy metal effects in cultivated plants and in some species considered as hyperaccumulators. However, little efforts have been performed on the evaluation of heavy metal effects in native plant populations and their secondary effects in ecosystems, genetic and biological diversity.

In spite of the great potential of phytoremediation and the many experiments carried out in order to establish an appropriate methodology, the use of plants for soil decontamination still in development phase; like Van Der Lelie *et al.* said (2006) there is an urgent need of research focusing to the knowledge of mechanisms involved in soils and deposition of metals in plants, as well as demonstration projects in order to optimize phytoremediation processes and to persuade decision makers and public about the advantages of the technique.

The Lagunera's region comprises municipalities of the state of Durango and Coahuila, in the North of Mexico. In this region, areas with high concentration of lead have been detected (Valdés y Cabrera, 1999; Trejo-Calzada *et al.*, 2007) and some actions have been established in order to reduce pollution. However, a little has been explored about the alternative of using native plant species in soil remediation and reducing the risks that heavy metal pollutants become accessible to human population, inasmuch as dry atmosphere and frequent winds let the metals, especially lead, be inhaled by humans. Actions that will reduce soil lead are required, performing an appropriate deposition of the pollutants. An alternative for soil lead extraction is the use of plants, but these plants have to be aided with agronomic management actions and applying fertilizers and/or chelating agents (Vassil *et al.*, 1998) in order to make this process more efficient, as lead (in natural form) is not bioassimilable in soil (Lasat, 2002). Therefore, the aim of the current study was to assess the effect of lead in the photosynthetic activity and the phytoextraction of huizache (*A. farnesiana*) as a remediation alternative in contaminated soils.

MATERIALS AND METHODS

The present research was carried out *ex situ* in Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo, Bermejillo, Durango. Lead-free soil was collected from the area of La Victoria, Mapimí, Durango. This soil was chemically and physically analyzed according to the regulation NOM-021-RECNAT-2000 (SEMARNAT, 2002). Cation exchange capacity (CEC) was established by extraction with ammonium acetate, electrical conductivity (EC) was obtained using a conductivimeter, the content of organic matter was established using the Walkley Black's method, carbonates and bicar-

y fitoextracción de huizache (*A. farnesiana*) como una alternativa de remediación en suelos contaminados.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo *ex situ* en las instalaciones de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas de la Universidad Autónoma Chapingo en Bermejillo, Dgo., para lo cual se utilizó suelo libre de plomo colectado en el ejido La Victoria, Mapimí, Dgo. El suelo fue analizado química y físicamente según norma NOM-021-RECNAT-2000 (SEMARNAT, 2002). La capacidad de intercambio catiónico (CIC) se determinó mediante extracción con acetato de amonio, la conductividad eléctrica (CE) con conductivímetro, el contenido de materia orgánica mediante el método de Walkley Black, el porcentaje de carbonatos y bicarbonatos por el método volumétrico y colorimetría, el porcentaje de sodio intercambiable (PSI) y la relación de absorción de sodio (RAS) mediante cuantificación de cationes solubles por espectrofotometría de absorción atómica. La textura fue determinada por el método del hidrómetro de Bouyoucos, mientras que la capacidad de campo y el punto de marchitez permanente fueron determinados con membrana y olla de presión, respectivamente.

Semillas de huizache fueron germinadas y hechas crecer en vasos de poliuretano de 250 ml, con turba (peat moss). Macetas de plástico fueron llenadas con 7 kg de suelo, y en ellas se trasplantaron las plántulas de huizache de cuatro semanas de edad. Dos semanas después del trasplante se aplicaron las dosis de nitrato de plomo y fosfonitrato en solución acuosa. El experimento se estableció bajo un diseño bifactorial en bloques completos y aleatorizados con cuatro repeticiones. Los factores de variación consistieron en tres concentraciones de plomo en el suelo (0, 250 y 500 mg·kg⁻¹) en forma de Pb(NO₃)₂ y fertilización nitrogenada en cuatro niveles (0, 100, 300 y 500 mg·kg⁻¹ de N) en forma de Fosfo-Nitrato (33-03-00).

La preparación de muestras vegetales para análisis en el espectrofotómetro de absorción atómica se hizo de acuerdo con la metodología de Chau *et al.* (1980). Se tomaron muestras de hoja, tallo y raíz de huizache y se colocaron en estufa de secado a 70° hasta peso constante. Las muestras secas se molieron con mortero y se pesaron 0.5 g de materia seca de hojas, tallos o raíz que fueron colocadas en matraces de 250 ml, a los cuales se le agregaron 10 ml de mezcla digestora de ácido nítrico (HNO₃) y ácido perclórico (HClO₄) en una relación 3:2. Las muestras se colocaron en una plancha de calentamiento a 100 °C hasta quedar la digestión de un color transparente. Se retiraron las muestras de la plancha y una vez frías se filtraron con papel filtro Whatman Núm. 40, en un matraz de aforación de 100 ml tipo A. Des-

bonates percentage were obtained by means of the volumetric and colorimetric method, exchangeable sodium percentage (ESP) and the sodium absorption relationship were obtained (SAR) through the quantification of soluble cations by atomic absorption spectroscopy. The texture was established using the Bouyoucos' hydrometer method; whereas field capacity and permanent wilting point were established set a membrane and pressure cooker, respectively.

Acacia seeds were germinated and grown in polyurethane cups of 250 ml with peat moss. Plastic pots were filled with 7 kg of soil in order to transplant the acacia plants (4 weeks old). Two weeks after transplanting the plants, doses of lead nitrate and phospho-nitrate in aqueous solution were applied. The experiment was carried out under a complete-block randomized two factor experimental design with four replicates. Variance factors consisted of 3 lead concentrations in soil (0, 100, 300 and 500 mg·kg⁻¹) in the form of Pb(NO₃)₂ and nitrogen fertilization in four levels (0, 100, 300 and 500 mg·kg⁻¹ de N) in the form of phosphonitrate (33-03-00).

The analysis of plant samples was performed using an atomic absorption spectrophotometer according to the methodology of Chau *et al.* (1980). Samples of acacia's leaves, stems and roots were taken and placed in a drying oven at 70° until constant weight. Samples were ground using a mortar; 0.5 g of the dry matter (leaves, stems and roots) were weighed and placed in laboratory flasks of 250 ml, adding 10 ml of a digester mixing of nitric acid (HNO₃) and perchloric acid (HClO₄) in a ratio of 3:2. The samples were set on a hot plate at 100 C° until the digester mixing obtained a transparent color, then the samples were filtered using a filter paper Whatman num. 40 and a volumetric flask of 100 ml type A. The content obtained was diluted with 100 ml tri-distilled water and perfectly mixed. The samples were observed in triplicate in a spectrophotometer Perkin Elmer AA analyst 2200®.

In order to establish acacia's photosynthetic rate (μmol CO₂·m⁻²·s⁻¹), a portable meter LICOR LI-6400® was employed, in which a constant concentration of CO₂ was used (reference of 400 μmol CO₂·m⁻²·s⁻¹) with an external source of this gas, and the airflow was set at 400 μmol·s⁻¹. The rate was obtained with the correction factor for pinna-te leaves developed by Carmona-Hernández et al. (2007).

Statistical analysis was carried out using the software MINITAB version 14 (Minitab, Inc., 2000) and SAS Version 9.0 (SAS Institute, 2004). Data were processed by means of an analysis of variance and Tukey's mean test.

RESULTS AND DISCUSSION

Photosynthetic rate

Nitrogen doses and lead concentrations separately didn't produce significant differences in the photos-

pués de filtrar, se aforó a 100 ml con agua tridestilada y se mezcló perfectamente. Las muestras se leyeron por triplicado en un espectrofotómetro Perkin Elmer AA analyst 2200®.

Para la determinación de la tasa fotosintética de huizache ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), se utilizó un medidor portátil LICOR LI-6400®, en el cual se usó una concentración constante de CO_2 de referencia de $400 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ con una fuente externa de este gas, y el flujo de aire se ajustó a $400 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$. La tasa se estimó empleando el factor de corrección para hojas pinnadas desarrollado por Carmona-Hernández *et al.* (2007).

El análisis estadístico se hizo con el software MINITAB versión 14 (Minitab, Inc., 2000) y SAS Versión 9.0 (SAS Institute, 2004). Los datos fueron procesados por un análisis de varianza y prueba de medias de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tasa fotosintética

Las dosis de nitrógeno y las concentraciones de plomo no produjeron diferencias significativas en la tasa fotosintética de las plantas de huizache (Figura 1). Sin embargo, la interacción entre esos dos factores fue altamente significativa ($P=0.0074$) y la media general de tasa fotosintética fue de $17.06 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. El tratamiento 12, en el que se aplicaron 500 ppm Pb y 500 ppm N fue en el que se detectó la máxima tasa de fotosíntesis ($27.3 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) de las plantas de huizache (Cuadro 1).

Una alta tasa fotosintética en la presencia de altas concentraciones de plomo en el sustrato puede ser indicativo de que el huizache pudo desarrollar mecanismos de defensa, entre los que se pueden encontrar la acumulación de plomo en la pared celular inmovilizando los iones y evitando sus efectos tóxicos o bien mecanismos de detoxificación como se han encontrado en *Allium sativum* (Jian y Liu, 2010). Además, el nitrógeno pudo haber contribuido a que los efectos del plomo fueran reducidos (Rodríguez-Ortíz *et al.*, 2006), lo cual se confirma con los resultados de este estudio en donde se identificó una tendencia de incremento en la tasa fotosintética a medida que se incrementaron las concentraciones de plomo y de nitrógeno en el sustrato en el que creció el huizache (Figura 1). La acumulación de metales pesados provoca estrés oxidativo y la aclimatación a condiciones de estrés mediante la inducción de genes relacionados con respuesta al estrés oxidativo puede hacer que se altere la tasa fotosintética (Rossel *et al.*, 2007). Estudios llevados a cabo por Athanasiou *et al.* (2010) muestran que algunas plantas tienen la habilidad de aclimatar su fotosíntesis en condiciones de estrés a través de cambios estructurales o por medio de cambios subcelulares. En el huizache podría estar involucrada alguna respuesta

synthetic rate of the acacia plants (Figure 1). However, interaction between these two factors was highly significant ($P=0.0074$) and the overall mean of the photosynthetic rate was $17.06 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Treatment 12 of acacia plants, in which 500 ppm Pb and 500 ppm N were applied, had the maximum photosynthetic rate ($27.3 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) (Table 1).

A high photosynthetic rate in the presence of high lead concentrations in substratum can be the signal that acacia could developed defense mechanisms, like accumulation of lead in the cell wall immobilizing ions and avoiding toxic effects, or detoxification mechanisms like

CUADRO 1. Medias de tasa fotosintética en plantas de huizache crecidas en suelo con diferentes concentraciones de plomo y diferentes dosis de fertilizante nitrogenado.

TABLE 1. Means of photosynthetic rate in acacia plants grown in soil with different lead concentrations and different doses of nitrogen fertilizer.

Tratamientos (ppm)	Fotosíntesis ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
12 (500 Pb + 500 N)	27.3 a
8 (250 Pb + 500 N)	21.3 ab
10 (500 Pb + 100 N)	20.2 ab
9 (500 Pb + 0 N)	17.0 ab
6 (250 Pb + 100 N)	16.2 ab
3 (0 Pb + 300 N)	15.9 ab
2 (0 Pb + 100 N)	15.8 ab
4 (0 Pb + 500 N)	15.7 ab
1 (0 Pb + 0 N)	15.0 b
7 (250 Pb + 300 N)	15.0 b
5 (500 Pb + 100 N)	13.5 b
11 (500 Pb + 300 N)	11.3 b

Cifras con las mismas letras dentro de una misma columna, son iguales. Prueba de rango múltiple de medias Tukey $P \leq 0.05$ ($n = 4$).

Numbers with the same letter of the same column are equal. Tukey's multiple range test $P \leq 0.05$ ($n = 4$).

the ones founded in *Allium sativum* (Jian y Liu, 2010). Furthermore, nitrogen could have contributed in the decrease of lead effects (Rodríguez-Ortíz *et al.*, 2006); this is supported with the results of the present study, where an increasing tendency in photosynthetic rate was observed as lead and nitrogen concentrations in substratum increased (Figure 1). Heavy metals accumulation produced oxidative stress and the acclimatization to stress conditions by means of genes induction related with response to oxidative stress can affect the photosynthetic rate (Rossel *et al.*, 2007). Studies carried out by Athanasiou *et al.* (2010) show that some plants have the ability to acclimate their photosynthesis under stress conditions by means of structural or subcellular changes. In acacia some response could be involved, which

que permitió mantener la fotosíntesis aun en las condiciones de mayor concentración de plomo. maintained photosynthesis even under conditions of higher lead concentration.

Acumulación de Pb en huizache

Accumulation of Pb in acacia

Los tratamientos aplicados en este estudio provocaron una acumulación significativamente diferente en raíz, tallo y hojas de huizache. Tanto en hoja como en tallo, la mayor acumulación de plomo ocurrió cuando se aplicó la máxima concentración del metal en el sustrato (500 mg·kg⁻¹), y la menor acumulación coincidió con tratamientos en los que no se aplicó plomo. El tratamiento de 500 mg·kg⁻¹ de plomo y 300 mg·kg⁻¹ de nitrógeno produjo una menor acumulación de plomo en tallos, comparada con los demás tratamientos (*P*<0.05). En contraste, el mismo tratamiento provocó la máxima acumulación de plomo en raíz. No se detectaron diferencias significativas entre los valores de acumulación total de plomo. En general, hubo una tendencia a mayor acumulación de plomo en tallos y hojas, comparada con la acumulación en raíces. La detección de plomo en plantas del tratamiento testigo podría deberse al plomo presente en el suelo empleado para el experimento (Cuadro 2).

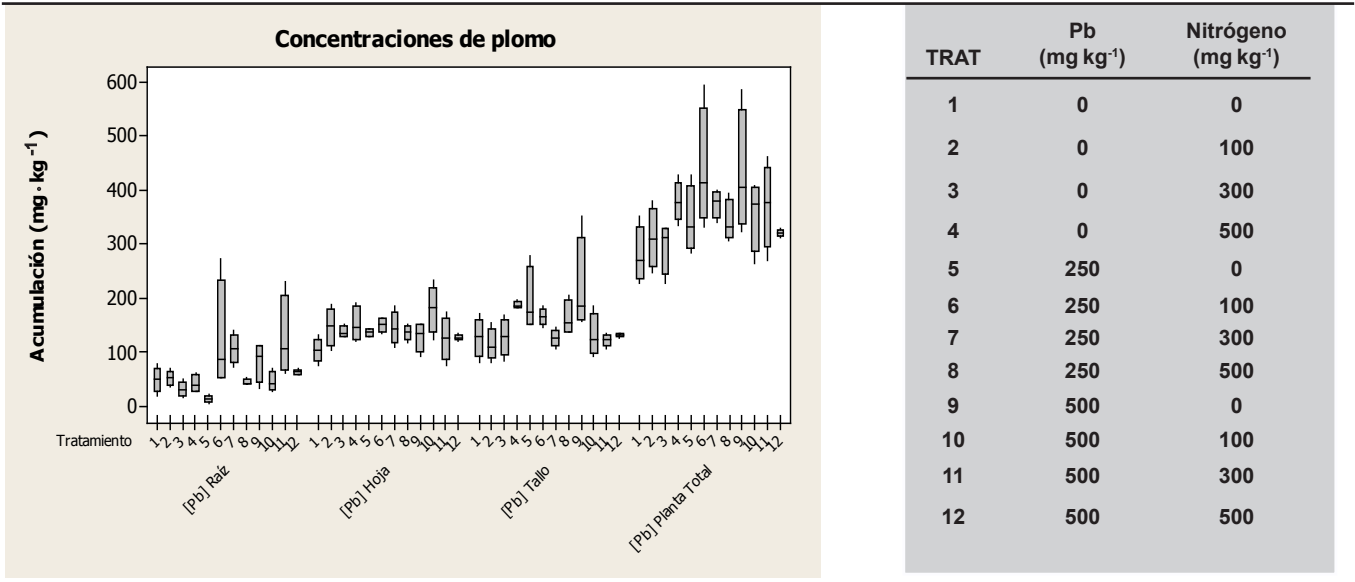
Treatments applied in the present study produced a different significant accumulation in acacia's roots, stems and leaves. Both leaves and stems, had the highest accumulation of lead when the maximum concentration of metal in substratum (500 mg·kg⁻¹) was applied, and the lowest concentration with treatments in which no lead was applied. Treatment of 500 mg·kg⁻¹lead and 300 mg·kg⁻¹ nitrogen produced a lower lead accumulation in stems compared with the other treatments (*P*<0.05). In contrast, the same treatment produced the maximum accumulation of lead in roots. No significant differences were observed among the values of total accumulation of lead. In general, there was a tendency to greater lead accumulation in stems and leaves, compared with the accumulation in roots. Lead detection in these plants could be attributed to the presence of lead in soil used for the experiment (Table 2).

La acumulación diferencial de plomo en los órganos de la planta podría estar relacionada con un papel del nitrógeno favoreciendo la translocación del plomo a las partes aéreas de la planta. En *Tlaspi caerulea* se ha encontrado que la hiperacumulación de metales pesados en la parte aérea de la planta incluye al menos cuatro eventos fisiológicos: un influjo estimulado de metales a través de las membranas plasmáticas de las cé-

Lead differential accumulation in organs of the plant could be related to nitrogen benefiting lead translocation to the aerial parts of the plant. In *Tlaspi caerulea* has been observed that heavy metal hyperaccumulation in aerial parts of the plant include at least four physiological events: a stimulated influence of metals by means of plasma membranes of the root cells, a reduced sequestration of metals in the root vacuoles, an increment in the amount of the xylem for transportation to the stem and

FIGURA 1. Tasa fotosintética de plantas de huizache en crecidas en diferentes concentraciones de nitrógeno (0, 100, 300 y 500 mg·kg⁻¹) y diferentes concentraciones de plomo (0, 250 y 500 mg·kg⁻¹). La media general es representada por la línea horizontal a partir de los 17.1 μmol CO₂·m⁻²·s⁻¹. Valores con la misma letra dentro de cada factor no son significativamente diferentes.

FIGURE 1. Photosynthetic rate of acacia plants grown under different concentrations of nitrogen (0, 100, 300 y 500 mg kg⁻¹) and different concentrations of lead (0, 250 y 500 mg kg⁻¹). Overall mean represented by a horizontal line starting from 17.1 μmol CO₂·m⁻²·s⁻¹. Values with the same letter within each factor are not significantly different.



CUADRO 2. Medias de acumulación de Pb en los diferentes órganos de la planta huizache sometidas a diferentes dosis de fertilización nitrogenada y concentraciones de plomo.

TABLE 2. Accumulation means of Pb in the different organs of the plant under different doses of nitrogen fertilizer and lead concentration.

Tratamientos (ppm)	Pb en raíz (ppm)	Pb en hoja (ppm)	Pb en tallo (ppm)	Pb en planta total (ppm)
11 (500 Pb + 300 N)	124.6 a	124.5 ab	120.9 b	370.1 a
6 (250 Pb + 100 N)	123.7 a	148.6 ab	164.6 ab	436.9 a
7 (250 Pb + 300 N)	105.6 ab	143.5 ab	124.9 ab	374.0 a
9 (500 Pb + 0 N)	82.5 ab	127.9 ab	218.3 a	428.8 a
12 (500 Pb + 500 N)	62.8 ab	126.2 ab	130.6 ab	319.6 a
2 (0 Pb + 100 N)	51.5 ab	146.1 ab	112.9 b	310.5 a
1 (0 Pb + 0 N)	48.2 ab	103.0 b	126.9 ab	278.1 a
10 (500 Pb + 100 N)	44.8 ab	179.0 a	130.4 ab	354.2 a
8 (250 Pb + 500 N)	43.4 ab	135.2 ab	162.2 ab	340.8 a
4 (0 Pb + 500 N)	41.2 ab	150.3 ab	186.2 ab	377.7 a
3 (0 Pb + 300 N)	30.6 ab	136.6 ab	126.6 ab	293.8 a
5 (500 Pb + 100 N)	16.2 b	135.2 ab	194.3 ab	343.1 a

Cifras con las mismas letras dentro de una misma columna, no son significativamente diferentes. Prueba de rango múltiple de medias Tukey $P \leq 0.05$ ($n = 4$).

Numbers with the same letter of the same column are not significantly different. Tukey's multiple range test $P \leq 0.05$ ($n = 4$).

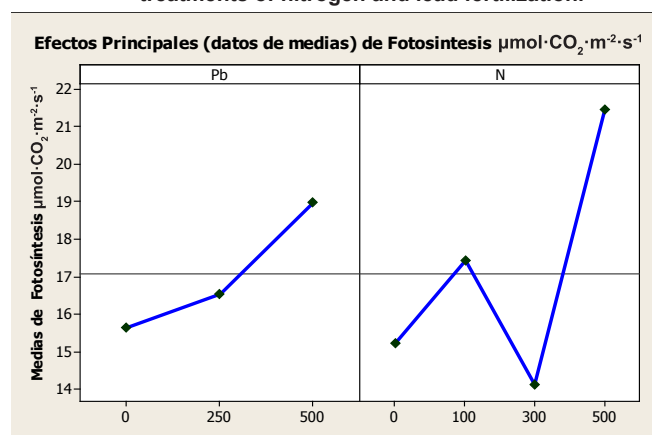
lulas de la raíz, una reducida secuestación de metales en las vacuolas de las raíz, un incremento en la carga del xilema para transporte hacia el tallo y finalmente un influjo estimulado a través de la membrana plasmática de células de la hoja y el secuestro del metal en la vacuola de la hoja (Milner y Kochian, 2008).

Los resultados de este trabajo difieren de los encontrados por Rodríguez-Ortiz *et al.*, (2006), en los que reportan altos niveles de Pb en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), por efecto de la dosis nitrogenada con nitrato de amonio mostrando un incremento en la acumulación de materia seca y la acumulación de Cd y Pb. Sin embargo, considerando la acumulación total de plomo, en este estudio se encontraron tratamientos que favorecieron una bioacumulación superior a la concentración del metal en el sustrato.

En este estudio se identificó que la acumulación de plomo en huizache tiende a aumentar de la siguiente manera: [Pb Tallo] > [Pb Hoja] > [Pb Raíz] (Figura 2). Esta distribución de la acumulación de plomo en los tejidos de huizache puede servir para la determinación de métodos de manejo en un proceso de fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados. En virtud de que los tallos son los que más acumulan el metal pesado, esta especie podría ser empleada en fitoestabilización, pues es posible reforestar los suelos y mantener los árboles durante muchos años en los que se puede ir acumulando el plomo extraído de los suelos. Por otra parte, sería importante evaluar en qué medida la acumulación de plomo en las hojas puede afectar a consumidores secundarios en la cadena trófica. Aunque no hay claridad en la forma en que algunas especies hiperacumuladoras

FIGURA 2. Acumulación de Pb (media $\pm$ error estándar, $n=4$) en los diferentes órganos de la planta huizache sometidas a diferentes tratamientos de fertilización nitrogenada y plomo.

FIGURE 2. Accumulation of Pb (mean $\pm$ standard error, $n=4$) in the different organs of the plant under different treatments of nitrogen and lead fertilization.



finally a stimulated influence through the plasma membrane of the leaf cells and the sequestration of metal in leaf vacuoles (Milner y Kochian, 2008).

Results of the present work differ with those obtained by Rodríguez-Ortiz *et al.*, (2006), reporting high levels of Pb in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.), by effect of nitrogen dose with ammonium nitrate, showing an increase in the accumulation of dry matter and the accumulation of Cd and Pb. Nevertheless, regarding the total lead accumulation, in the present study treatments producing a higher bioaccumulation to the metal concentration in substratum were found.

incorporan y toleran mayores concentraciones de metales pesados en tallos y hojas, se ha propuesto que algunos aminoácidos, ácidos orgánicos, fitoquelatinas y otros compuestos orgánicos pueden estar involucrados (Milner y Kochian, 2008).

En otras especies, como *Cajanas cajan*, se ha encontrado un gradiente decreciente de acumulación metales pesados de la raíz a los tallos, hojas y semillas (Roy et al., 2010). La concentración de plomo medida en la raíz de huizache incluyó el metal presente en el espacio libre o apoplasto antes de la endodermis y el plomo incorporado al simplasto. Esto indica que el empleo de una fuente de plomo muy soluble como el $Pb(NO_3)_2$, podría haber favorecido que el plomo en primer lugar fuera absorbido en la raíz e incorporado rápidamente al flujo de transpiración de la planta, y por ende se acumulara más en las partes aéreas.

CONCLUSIONES

Las dosis de plomo y nitrógeno en el suelo por separado no provocaron diferencias significativas en la acumulación de plomo en las plantas de huizache. Sin embargo, la interacción dosis de nitrógeno y concentración de plomo causó diferencias significativas en la acumulación de plomo de hoja, tallo y raíz. Hubo una tendencia a mayor acumulación del metal en la parte aérea de la planta, comparada con la acumulación registrada en la raíz.

En general, la mayor acumulación de plomo en los tejidos de las plantas de huizache ocurrió en tratamientos con las mayores dosis de plomo en el suelo. La mayor acumulación de plomo en tallo (218 ppm) ocurrió en plantas que crecieron en suelo con 500 ppm de plomo y 0 ppm de nitrógeno. En tanto que la mayor acumulación de plomo en las hojas ocurrió en plantas bajo el tratamiento de 500 ppm de plomo y 100 ppm de nitrógeno. En el caso de la raíz, la mayor acumulación de plomo se produjo en plantas bajo el tratamiento de 500 ppm de plomo y 300 ppm de nitrógeno.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Durango (COCYTED) a través de Fondos Mixtos Durango.

LITERATURA CITADA

ATHANASIOU, K.; DYSON, B.; WEBSTER, R. E.; JOHNSON, G. N. 2010. Dynamic Acclimation of photosynthesis increases plant fitness in changing environments. *Plant Physiology* 152: 366-373.

Lead accumulation in acacia tends to increase as follows: $[Pb \text{ Stem}] > [Pb \text{ Leaf}] > [Pb \text{ Root}]$ (Figure 2). This distribution of lead accumulation in acacia tissues may be used for the establishment of management methods in a phytoremediation process of contaminated soils with heavy metals. Considering that the stems are the ones with highest heavy metals accumulation, this species could be used in phytostabilization, because it is possible to reforest soils and maintain trees for many years meanwhile lead extracted from soils can be accumulated. On the other hand, it is important to evaluate how lead accumulation in leaves can affect secondary consumers of the food chain. Although there isn't clear how some hyperaccumulator species incorporate and tolerate higher heavy metal concentrations in stems and leaves, it has been proposed that some amino acids, organic acids, phytochelatin and other organic compounds can be involved (Milner y Kochian, 2008).

In other species, like *Cajanas cajan*, a decreasing gradient of heavy metals accumulated in root, stems, leaves and seeds has been observed (Roy et al., 2010). Lead concentration measured from the root of the acacia included the metal founded in the apoplast before the endodermis and lead entered into the symplast, indicating that the use of a source of very soluble lead like $Pb(NO_3)_2$, could provoke that lead was absorbed in the root and rapidly incorporated to the flow of plant transpiration, and therefore it would accumulate more in the aerial parts.

CONCLUSIONS

Separate doses of lead and nitrogen in soil didn't produce significant differences in lead accumulation of acacia plants. However, the interaction between nitrogen dose and lead concentration caused significant differences in lead accumulation in leaves, stem and root. There was a trend towards higher metal accumulation in the aerial part of the plant, compared to the accumulation observed in the root.

In general, the highest lead accumulation in tissues of acacia's plants happened in treatments with the highest lead doses in soil. The highest lead accumulation in stem (218 ppm) took place in plants grown in soil at 500 ppm lead and 0 ppm nitrogen. Whereas the highest accumulation of lead in leaves took place in plants under the treatment at 500 ppm lead and 100 ppm nitrogen. In the case of the root, the highest accumulation of lead was produced in plants under the treatment at 500 ppm lead and 300 ppm nitrogen.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Durango (COCYTED) by means of Fondos Mixtos Durango.

- BROWN, S. L.; CHANEY, R. L.; HALLFRISCH, J. G.; QI XUE. 2003. Effect of Biosolids Processing On Lead Bioavailability in an Urban Soil. *Environ. Qual.* 32: 100-108.
- CARMONA-HERNÁNDEZ, D.; TREJO-CALZADA, R.; ESQUIVEL-ARRIAGA, O.; ARREOLA-ÁVILA, J. G.; FLORES-HERNÁNDEZ, A. 2007. Evaluación de un método para medir fotosíntesis en mezquite (*Prosopis glandulosa*). *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas* 6: 185-190.
- CHANEY, R. L.; MALIK, M.; LI, Y. M.; BROWN, S. L.; BREWER, E. P.; ANGLE, J. S.; BAKER, A. J. M. 1997. Phytoremediation of soils metals. *Current Opinion in Biotechnology* 8(3): 279-284.
- CHAU, K. A.; RIKLUND, R.; SILVA, A. F. 1980. Roles of the lower and the upper Hubbard bands and the donor-excited states in the theory of shallow-impurity states in doped semiconductors. *Phys. Rev. B.* 21: 5745-5748.
- EPSTEIN, A. L.; GUSSMAN, C. D.; BLAYLOCK, M. J.; YERMIYAHU, U.; HUANG, J. W.; KAPULNIK, Y.; ORSER, C. S. 1999. EDTA and Pb-EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb-amended soil. *Plant and Soil.* 208: 87-94.
- HUANG, J. W.; CHEN, J.; BERTI, W. R.; CUNNINGHAM, S. D. 1997. Phytoremediation of lead contaminated soil: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science and Technology* 31(3): 800-805.
- JIAN, W.; LIU, D. 2010. Pb-induced cellular defense system in the root meristematic cells of *Allium sativum* L. *BMC Plant Biology* 10: 40.
- KHAN, A. G.; KUEK, C.; CHAUDHRY, T. M.; KHOO, C. S.; HAYES, W. J. 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41: 197-207.
- LASAT, M. M. 2000. Phytoextraction of metals from contaminated soil: A Review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research* 2(5): 1-25.
- LASAT, M. M. 2002. Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms. *Journal of Environmental Quality* 31(1): 109-120.
- MILNER, M. J.; KOCHIAN, L. V. 2008. Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system. *Annals of Botany* 102: 3-13.
- MINITAB, Inc. 2000. MINITAB 14 Statistical Software. State College, PA, USA.
- MITEVA, E.; MANEVA, S.; HRISTOVA, D.; BOJINOVA, P. 2001. Heavy metal accumulation in virus-infected tomatoes. *J. Phytopathol.* 149: 179-184.
- MEAGHER, R. B. 2000. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Curr Opin. Plant Biol.* 3: 153-162.
- McGOWEN, S. L.; BASTA, N. T.; BROWN, G. O. 2001. Use of diammonium phosphate to reduce heavy metal solubility and transport in smelter contaminated Soil. *J. Environ. Qual.* 30: 493-500.
- RODRÍGUEZ-ORTÍZ, J. C.; VALDEZ-CEPEDA, R. D.; LARA-MIRELES, J. L.; RODRÍGUEZ-FUENTES, H.; VÁZQUEZ-ALVARADO, R. E.; MAGALLANES-QUINTANAR, R.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, J. L. 2006. Soil nitrogen fertilization effects on phytoextraction of Cd and Pb by tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Bioremediation Journal* 10(3): 105-114.
- ROSSEL, J. B.; WILSON, P. B.; HUSSAIN, D.; WOO, N.; GORDON, M. J.; MEWETT, O. P.; HOWELL, K. A.; WHELAN, J.; KAZAN, POGSON, B. J. 2007. Systemic and intracellular responses to photooxidative stress. *The Plant Cell* 19: 4091-4110.
- SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. *Diario Oficial de la Federación.* México.
- SALT, D. E.; BLAYLOCK, M.; KUMAR, N. P. B. A.; DUSHENKOV, V.; ENSLEY, D.; CHET, I.; RASKIN, I. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* 13: 468-474.
- SALT, D. E.; SMITH, R. D.; RASKIN, I. 1998. Phytoremediation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 49:643-668.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMINSTITUTE INC. 2004. SAS/STAT9.1. User's Guide Cary NC, USA. 5136 pp.
- TREJO-CALZADA, R.; GARCÍA, N. C.; VALDEZ-CEPEDA, R. D.; FLORES-HERNÁNDEZ, A.; ARREOLA-ÁVILA, J. G. 2007. Análisis de la variación espacial de plomo en suelos del área de Bermejillo, Dgo. En: CADENA ZAPATA, M., LÓPEZ SANTOS, A. Y RAMÍREZ SEGOVIANO, R. (Eds). Oportunidades y retos de la ingeniería agrícola ante la globalización y el cambio climático. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo. Bermejillo, Durango, México. pp. 120-129.
- VALDÉS, P. F.; CABRERA M. V. 1999. La contaminación por metales pesados en Torreón, Coahuila. Texas Center for Policy Studies. En *Defensa del Ambiente A.C Torreón Coahuila.* 46 pp.

- VAN DER LELIE, D.; LESAULNIER, C.; MCCORKLE, S.; GEETS, J.; TAGHAVI, S.; DUNN, J. 2006. Use of Single-Point Genome Signature Tags as a universal tagging method for microbial genome surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2092-2101.
- VASSIL, A. D.; KAPULNIK, Y.; RASKIN, I.; SALT, D. E. 1998. The role of EDTA in lead transport and accumulation in Indian mustard *Plant Physiol.* 117: 447–453.