



Vicerrectorado de Organización Académica

Vicerrectoráu d'Organización Académica
Vice-rectorate for Academic Organization

Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Estrategias combinadas de fitorremediación y adición de nanopartículas en suelos contaminados con arsénico



Nicolás Álvarez Álvarez
Julio 2019

RESUMEN

La contaminación de suelos por metales pesados es un problema medioambiental grave debido a una mala gestión de los desechos procedentes de la actividad industrial durante muchos años. Además no son biodegradables sino que tienen una vida media muy larga por lo que su eliminación es muy compleja. El objetivo de este trabajo es estudiar el comportamiento de una planta forrajera como es *Medicago sativa* cultivada en un suelo contaminado por metales pesados y arsénico al que se le han añadido diferentes enmiendas como nanopartículas de hierro cerovalente, ácido cítrico y fertilizante orgánico encaminadas a modificar la acumulación de metales pesados en la parte aérea de la planta. Se caracterizó el suelo y a diferentes períodos de cultivo se estudió el crecimiento así como diferentes parámetros relacionados con el estrés oxidativo y con el metabolismo tiólico. Los resultados muestran que se acumula As en la parte comestible de la planta lo que afecta a su desarrollo y provoca una situación de estrés que se manifiesta por la presencia de H₂O₂, malondialdehído y prolina. La adición de nanopartículas reduce la biodisponibilidad del arsénico en el suelo y su acumulación en la raíz así como los síntomas de estrés oxidativo. El ácido cítrico no altera la biodisponibilidad del As en el suelo ni su acumulación en la planta excepto a los 3 días de cultivo en la parte aérea aunque su efecto quelante ayuda a reducir los síntomas de estrés. El fertilizante incrementó la cantidad de arsénico biodisponible en el suelo y su acumulación en la planta pero redujo los parámetros relacionados con el estrés en algunos tratamientos. Finalmente, el contenido de tioles en la parte aérea no se vio modificado por la adición de nanopartículas o ácido cítrico al suelo pero sí el de las raíces. Los fertilizantes indujeron el mayor contenido de tioles en todos los órganos de la planta.

ABSTRACT

Heavy metals pollution in soils is a major environmental concern due to the bad management of wastes from industrial activity through the years. Also, heavy metals are not biodegradable, and they stay for a long time in soils, being hard to eliminate. The aim of this study is to analyze the behaviour of alfalfa (*Medicago sativa*), a forage plant, grown in a heavy metal and arsenic polluted soil from a former mercury mine. Several amendments were added to the soil in order to modify the amount of heavy metals accumulated by plants. These amendments included zerovalent iron nanoparticles (nZVI), citric acid and organic fertilizer. Initial soil was characterized, and after different culture times plant growth and several parameters involved with oxidative stress and thiol metabolism were measured. Results show that arsenic is accumulated in plant edible part, damaging its development, and leading to an oxidative stress situation where H₂O₂, MDA, proline and thiols are formed. The addition of nZVI reduced arsenic bioavailability in soil and its accumulation in root, as well as oxidative stress symptoms. Citric acid, on the other side, didn't affect arsenic bioavailability in soil nor its accumulation in plant tissues, with the exception of shoots after three days, but its chelating effect reduced oxidative stress symptoms. Fertilizer increased arsenic bioavailability in soil and its accumulation in plant tissues, but it reduced stress symptoms in some treatments. Finally, thiol compounds content in shoots wasn't modified by nZVI nor citric acid, but it was in roots. Fertilizer induced the highest thiol compounds content both in shoots and roots.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto LIFE 16 ENV/ES/000481 (SUBProducts4LIFE). Mis agradecimientos a mi tutora Aida González Díaz, a mi cotutor José Luis Rodríguez Gallego y a Diego Baragaño Coto por toda la ayuda prestada.

ABREVIATURAS

AC	Ácido cítrico
CT	Compuesto tiólico no identificado
Cys	Cisteína
GSH	Glutation
hGSH	Homoglutation
hPCs	Homofitoquelatinas
MDA	Malondialdehído
nZVI	Nanopartículas de hierro cerovalente
PCs	Fitoquelatinas
ROS	Especies reactivas de oxígeno

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Antecedentes.....	4
1.2. Mecanismos de tolerancia de las plantas a los metal(oid)es.....	4
1.2.1. Sistemas de detoxificación.....	4
1.2.2. Sistemas antioxidantes.....	5
1.2.3. Nanopartículas de hierro cerovalente.....	5
1.3. Planteamiento y objetivos.....	5
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
2.1. Análisis del suelo.....	7
2.2. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	7
2.3. Análisis de la acumulación de metal(oid)es en la planta.....	8
2.4. Análisis de pigmentos fotosintéticos.....	8
2.5. Análisis de peróxido de hidrógeno.....	9
2.6. Peroxidación de lípidos.....	9
2.7. Cuantificación de prolina.....	9
2.9. Tratamiento estadístico.....	10
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
3.1. Análisis del suelo.....	11
3.2. Crecimiento de las plantas.....	14
3.3. Acumulación de arsénico en la planta.....	16
3.4. Análisis de compuestos relacionados con el estrés oxidativo.....	17
3.4.1. Pigmentos fotosintéticos.....	17
3.4.2. Análisis del peróxido de hidrógeno.....	18
3.4.3. Análisis de la peroxidación lipídica.....	19
3.4.4. Análisis del contenido de prolina.....	20
3.5. Análisis de compuestos tiólicos no proteícos (CTNP).....	21
4. CONCLUSIONES.....	24
BIBLIOGRAFÍA.....	25

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La actividad minera e industrial de las pasadas décadas en España ha dejado, tras su abandono, elevadas cantidades de metales pesados y arsénico que afectan a los suelos y la vegetación de zonas próximas. Concretamente en Asturias, donde la minería de mercurio tuvo gran importancia durante la década de los 60 y comienzo de los 70, ha dado lugar a niveles altos de dichos contaminantes en los suelos (Larios et al., 2011; Pérez-Esteban et al., 2018).

El arsénico es un metaloide que puede presentarse en el medio ambiente bajo diferentes formas químicas y estados de oxidación, los cuales afectan a su movilidad, persistencia y toxicidad. En ambientes ricos en oxígeno y bien drenados, el As (V) es la especie predominante, mientras que bajo condiciones reductoras, como las que se dan en suelos con inundaciones periódicas, el As (III) es el estado de oxidación más estable (Smedley y Kinniburgh, 2002; Van Herreweghe et al, 2003). El As (V) es absorbido por las raíces de la planta a través de los transportadores fosfato y presenta una baja tasa de translocación, lo que significa que su acumulación se produce principalmente en la raíz, y poca cantidad es transportada a la parte aérea de la planta (McLaughlin, 1999; Finnegan y Chen, 2012).

El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer ha clasificado el arsénico y los compuestos de arsénico como cancerígenos para los seres humanos aunque también se incluyen otros efectos perjudiciales para la salud vinculados a la exposición prolongada al arsénico como problemas relacionados con el desarrollo, neurotoxicidad, diabetes y enfermedades pulmonares y cardiovasculares.

Tradicionalmente la recuperación de este tipo de suelos contaminados con metal(oid)es se ha llevado a cabo mediante métodos de extracción y descontaminación *ex situ*, que ocasionan un gran impacto ambiental y tienen un elevado coste. Debido a ello, desde hace algo más de una década se han investigado métodos alternativos más sostenibles, entre los que se incluye la fitorremediación, en la cual se utilizan plantas para recuperar los suelos contaminados (Gómez-Sagasti et al, 2012; Pérez-Esteban et al, 2018). Por otra parte, existe evidencia de que en los pastizales formados sobre estas escombreras pasta el ganado, lo cual supone un riesgo debido a la posible incorporación del arsénico a la cadena trófica.

En este contexto, cobra interés disponer de información acerca del comportamiento de una planta forrajera como la alfalfa (*Medicago sativa*) creciendo en suelos con estas características. Esto incluye tanto la posible acumulación de metales y metaloides en sus tejidos como sus respuestas a dicha acumulación.

1.2. Mecanismos de tolerancia de las plantas a los metal(oid)es

1.2.1. Sistemas de detoxificación

Para defenderse de los daños causados por metal(oid)es pesados las plantas sintetizan compuestos tiólicos a partir del glutatión (GSH). El glutatión es precursor de las fitoquelatinas (PCs), las cuales forman complejos con los iones metálicos o metaloides a través de los grupos tiólicos, y los transportan a las vacuolas, donde se almacenan para reducir su toxicidad y evitar interferencias en el metabolismo de la planta (Li et al, 2006; Yadav, 2010). En el caso de las leguminosas, como la

alfalfa (*M. sativa*), que es la planta utilizada en este trabajo, además de PCs también se sintetizan homofitoquelatinas (hPCs), las cuales se sintetizan a partir del homoglutation (hGSH). La diferencia entre GSH y hGSH radica en el aminoácido terminal. Mientras GSH está constituida por γ -glutamilcisteína glicina, la hGSH lo está por γ -glutamilcisteínaalanina (Oven et al., 2002). El ácido cítrico (AC), está considerado un agente quelante que puede incrementar la cantidad de metal(oid)es absorbidos por la planta (Almaroai et al., 2012). No obstante, su efecto también contribuye a la detoxificación de estos metal(oid)es, permitiendo a la planta sintetizar menor cantidad de PCs (Zaheer et al., 2015; González et al., 2019).

1.2.2. Sistemas antioxidantes

La acumulación de arsénico en el citosol de las células vegetales produce una situación de estrés oxidativo que se caracteriza por la síntesis de gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) como acumulación de H_2O_2 y elevada peroxidación lipídica generadas como respuesta a las alteraciones metabólicas que estos compuestos provocan (Singh et al., 2007). Otra consecuencia de la acumulación de metal(oid)es en las células es la inhibición de la síntesis de pigmentos fotosintéticos (Mishra et al., 2016). Por otra parte, las plantas responden incrementando la concentración de compuestos capaces de proteger las membranas celulares de daños producidos por el estrés, como la prolina (Pavlík et al., 2010).

1.2.3. Nanopartículas de hierro cerivalente

Las nanopartículas son partículas de hierro de valencia cero (nZVI) de menos de 100 nanómetros de diámetro. El principal interés de estas nanopartículas radica en su alta capacidad reductora y su reactividad (Rodrigues, 2016), así como en su pequeño tamaño, que les confiere una gran movilidad, una alta superficie relativa y la posibilidad de ser inyectadas directamente al suelo, sin necesidad de excavar (Gil-Díaz et al., 2014; Lefevre et al., 2016; Pérez-Esteban et al., 2018). Existen evidencias de que estas nanopartículas son efectivas en la inmovilización de arsénico en los suelos. Esto se produce fundamentalmente por la formación espontánea a partir de las nZVI de óxidos de hierro en la solución acuosa del suelo, cediendo electrones a los compuestos de arsénico y dando lugar a su adsorción y co-precipitación, formando complejos superficiales (Zhang et al., 2010; Gil-Díaz et al., 2014; Gil-Díaz et al., 2016).

1.3. Planteamiento y objetivos

En los terrenos contaminados con metales pesados como el Hg o Cd o metaloides como el As crecen diferentes especies vegetales, algunas de las cuales son el primer eslabón en la cadena trófica de los ecosistemas terrestres. Aunque algunos de estos metal(oid)es una vez absorbidos por las plantas tienen una baja tasa de translocación, aún así pueden llegar a acumular niveles tóxicos en la parte recolectable o comestible, por encima de los niveles recomendables (Millán et al., 2006) por lo que su ingesta supone un riesgo ya que podrían entrar en la cadena trófica y llegar finalmente a acumularse en el organismo humano.

La alfalfa (*M. sativa*) es una planta forrajera ampliamente utilizada en la alimentación del ganado que además es un buen cultivo de cubierta capaz de mejorar la fertilidad de los suelos

donde crece. Tiene un rápido crecimiento, un sistema radicular profundo y soporta la exposición a los metal(oid)es presentes en los terrenos contaminados.

Por otro lado y teniendo en cuenta que la adición de nZVI al suelo puede inmovilizar algunos de los elementos tóxicos presentes en los terrenos contaminados (Zhang et al., 2010; Gil-Díaz et al., 2014), el objetivo de este trabajo es estudiar el efecto que tiene la adición de nZVI y otros compuestos como el AC y los fertilizantes sobre la acumulación de As (por ser el elemento tóxico mayoritario en este emplazamiento) y el crecimiento de plantas de alfalfa. Asimismo también se relacionará con el metabolismo tiólico y el estrés oxidativo.

Para abordar este objetivo, se desglosan los siguientes objetivos parciales:

- Analizar el efecto de las diferentes enmiendas añadidas al suelo sobre la cantidad de As disponible en el suelo.
- Estudiar el crecimiento de la planta y la acumulación de As en los diferentes tratamientos.
- Estudiar el estrés oxidativo causado por la contaminación del suelo así como el metabolismo tiólico.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Análisis del suelo

Las muestras de suelo contaminado fueron recogidas en un terreno próximo a la mina de Soterraña. El presente estudio se ha realizado en el terreno de la mina "La Soterraña", ubicada en las proximidades del pueblo de Muñón-Cimero, en la ladera sudoeste del Monte Campusas, en el término municipal de Pola de Lena. En las inmediaciones de las instalaciones mineras se encuentran antiguas escombreras donde existe una alta concentración de arsénico (Larios et al., 2011). Para caracterizar el suelo y medir el contenido de metales y metaloides se tomaron 5 muestras de suelo recogidas a una profundidad de 25-30 cm. Una vez en el laboratorio, el suelo se mezcló durante 30 min en una hormigonera para que fuera lo más homogéneo posible en todos los tratamientos y a continuación se pasó por un tamiz de 2 mm.

Para medir el pH y la conductividad, 10 g de suelo se mezclaron mediante agitación con 25 mL de agua destilada durante 10 minutos. La mezcla se dejó reposar durante 1 hora, y a continuación se midió el pH y la conductividad.

La biodisponibilidad de metales y metaloides en el suelo se midió siguiendo el método de Wear y Evans (1968) y Quevauviller et al. (1998). Se preparó una disolución de EDTA 0.05 M ajustando el pH a 7 con NH_4OH . A la disolución se le añadió la muestra de suelo con una relación 1:10 (suelo:extractante, p/v), y se mantuvo 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos, y el sobrenadante se analizó mediante ICP-MS siguiendo el protocolo descrito por Fernández et al. (2008).

El contenido de materia orgánica se analizó por combustión y la textura del suelo se determinó mediante espectroscopía láser de difracción utilizando una técnica estandarizada ISO 13320 (2009) que proporciona datos en el rango de tamaño de partículas entre 0,017 y 2000 μm . Este procedimiento incluye la desagregación utilizando como dispersantes hexametáfosfato de sodio y carbonato de sodio (Sierra et al., 2011) y el análisis con el Módulo Acuoso Líquido modelo LS 13-320 MW (Beckman Inc. Counter).

Para la cuantificación de los metal(oid)es en el suelo se siguió el protocolo descrito por Fernández et al. (2008). Se tomaron 100 mg de peso seco de suelo, se transfirieron a un vial al que se añadieron 3 mL de HNO_3 concentrado y altamente purificado, y las muestras fueron digeridas en un microondas a 240W durante 6 min para licuarlas (Montaser, 1998). Una vez frías, se realizaron 2 diluciones consecutivas con agua destilada y se añadieron 10 $\mu\text{g Rh Kg}^{-1}$ como estándar interno. Finalmente las muestras fueron analizadas por espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) utilizando un Agilent 7500c. El método fue siempre validado con una muestra de referencia certificada.

2.2. Material vegetal y condiciones de cultivo

Semillas de *Medicago sativa* L. fueron esterilizadas durante 5 minutos con lejía comercial al 5% en una cámara de flujo laminar. A continuación se lavaron varias veces con agua destilada estéril. Tras pasar 3 días en cámara fría para romper la dormición se pusieron en placas de Petri con papel de filtro y agua destilada esterilizada y se mantuvieron en una cámara de cultivo en oscuridad

durante 4 días a 25°C. Una vez germinadas se transfirieron a multipots con turba y se trasladaron al invernadero donde se mantuvieron 35 días hasta que alcanzaron un tamaño de entre 9 y 11 cm.

Tras medir la longitud de la parte aérea, de la raíz, y su peso fresco, las plantas fueron trasplantadas a tiestos con 150 g de suelo contaminado. Sesenta plantas se pusieron directamente en el suelo contaminado de Soterraña, y se denominó tratamiento S. Otras 60 se colocaron en ese mismo suelo contaminado al que se le añadieron 2 mL de nanopartículas (nZVI), y se denominó tratamiento Snp. Las nZVI se añadieron 48 h antes de poner las plantas para que se unieran a las partículas del suelo. Otras 60 plantas se pusieron en el suelo contaminado al que se añadieron 20 mL de ácido cítrico 20 mg L⁻¹, y se denominó tratamiento SAC. A un lote de 30 plantas de cada uno de los tratamientos se les añadió un fertilizante ecológico de origen animal y vegetal con una proporción de N: P: K, de 6: 8: 15 respectivamente, y se denominaron tratamientos S+F, Snp+F y SAC+F. A cada tiesto se le añadieron 10 gr de fertilizante al principio del cultivo cuando las plantas fueron trasplantadas. Al cabo de 1, 3 y 10 días, las plantas se sacaron de los tiestos y se lavaron 3 veces (5 min cada vez) con agua destilada para eliminar los metal(oid)es que pudieran estar adheridos a las raíces y medir únicamente la fracción absorbida. A continuación se separaron las raíces de la parte aérea (tallos y hojas), se midieron, se pesaron, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior utilización.

2.3. Análisis de la acumulación de metal(oid)es en la planta

Para la cuantificación de la acumulación de metales en las plantas se siguió el protocolo descrito por Fernández et al. (2008). Se tomaron 100 mg de peso seco de raíces o parte aérea trituradas, se transfirieron a un vial al que se añadieron 3 mL de HNO₃ concentrado y altamente purificado, y la mezcla fue digerida en un microondas a 240W durante 6 min para licuar las muestras (Montaser, 1998). Una vez frías se procedió de la misma forma explicada en el apartado 2.1. También se calculó el índice de translocación (H/R) en la planta [Metal(oid)]_{hoja}/ [Metal(oid)]_{raíz} (Shi et al., 2010).

2.4. Análisis de pigmentos fotosintéticos

Para la extracción de clorofilas y carotenoides, 100 mg de hojas se homogeneizaron con 1 mL de acetona 80% (v/v). La mezcla se centrifugó a 16.000 g durante 5 minutos y se tomaron 500 µL del sobrenadante. Se midió la absorbancia a 3 longitudes de onda: 633, 646 y 470 nm, y la concentración de los diferentes pigmentos se obtuvo mediante las fórmulas de Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clorofila } a(C_a) = 12,21Abs_{663} - 2,81Abs_{646}$$

$$\text{Clorofila } b(C_b) = 20,13Abs_{646} - 5,03Abs_{663}$$

$$\text{Carotenoides(Carot.)} = \frac{1000Abs_{470} - 3,27C_a - 104C_b}{229}$$

2.5. Análisis de peróxido de hidrógeno

El contenido de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se midió siguiendo el protocolo de Singh et al. (2006) con algunas modificaciones. En primer lugar, 100 mg de peso fresco de hojas o raíces fueron homogeneizados con 2,5 mL de ácido tricloroacético al 0,1%. Posteriormente se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos. A 0,5 mL de sobrenadante se le añadieron 0,5 mL de tampón fosfato 100 mM (pH 7,6) y 1 ml de KI 1 M. La absorbancia se midió a 390 nm y el contenido de H₂O₂ fue calculado a partir de una curva patrón y expresado en $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$ de peso fresco (PF).

2.6. Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos se determinó midiendo la formación de malondialdehído (MDA) en las hojas y raíces. En primer lugar, se homogeneizaron 100 mg de muestra con 2,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 0,1%, y la mezcla se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos. Se tomaron 0,5 mL del sobrenadante y se transfirieron a un nuevo tubo con 2 mL de ácido tiobarbitúrico al 0,5 % en TCA al 20 %. Las muestras se mantuvieron en un baño a 95 °C durante media hora y a continuación se pasaron rápidamente a un recipiente con hielo. Finalmente, se centrifugaron de nuevo en las mismas condiciones que antes y se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 nm y 600 nm. Para calcular la concentración de lípidos se utilizó la ley de Lambert-Beer donde el coeficiente de extinción (ϵ) es del orden de $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Demiral y Turkan, 2005):

$$C = \frac{Abs_{532} - Abs_{600}}{\epsilon}$$

El contenido de MDA fue expresado en $\mu\text{mol g}^{-1}$ PF.

2.7. Cuantificación de prolina

El contenido de prolina se midió siguiendo el método de Bates (1973) modificado por Demiral y Turkan (2005). 100 mg de muestra, tanto de hojas como de raíces, se homogeneizaron con 1,5 mL de ácido sulfosalicílico al 3 %, y la mezcla se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos. Posteriormente, 0,5 mL del sobrenadante se añadieron a un tubo con 250 μL de ninhidrina ácida y 250 μL de ácido acético glacial, y se mantuvo en baño de agua a 100°C durante una hora, tras la cual las muestras se enfriaron rápidamente en un recipiente con hielo. A cada muestra se le añadieron 2,5 mL de tolueno, se homogeneizó y se esperó a que se formasen dos fases, tras lo cual se midió la absorbancia de la fase superior a 520 nm. Para calcular las concentraciones se extrapolaron los datos en una curva patrón de prolina obtenida a partir de concentraciones conocidas.

2.8. Análisis de compuestos tiólicos

Los compuestos tiólicos se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) siguiendo el protocolo descrito por Rauser (1991) y modificado por Fernández et al. (2012). Para ello a 500 mg de muestra de raíces o parte aérea (tallos y hojas) de las plantas cultivadas en los distintos tratamientos, se le añadieron 5 mg de polivinilpolipirrolidona y 750 μL de HCl 0,1 N (proporción 1:1,5 p/v). Se mezclaron bien durante 30 s y se introdujeron en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. Tras agitar de nuevo se centrifugaron a 16.000 g durante 15 minutos a 4 °C y el

sobrenadante se filtró a través de un filtro Millex-HV, con un diámetro de poro de 45 μm . Finalmente el filtrado se inyectó directamente en el cromatógrafo. Durante todo el proceso, las muestras se mantuvieron en frío para evitar la desnaturalización de los péptidos presentes.

Para el análisis por HPLC se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución Waters 600 y se siguió el protocolo descrito por Fernández et al. (2012). Se inyectaron 100 μL de muestra en una columna Kromasil 100 C18 5 μm (250 x 4,6 mm) (Scharlau) de fase reversa, y se eluyó con un solvente A de acetonitrilo: H_2O (2:98, v/v) y un solvente B de acetonitrilo: H_2O (98:2, v/v) a los que se añadió ácido trifluoroacético 0.05 %. Las muestras se separaron en un gradiente lineal de 0-25 % en 25 minutos y de 25-50 % en 5 minutos y del solvente B a un flujo de 1,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y a continuación se pasaron por un loop de reacción (1 mL). La detección se consiguió con una derivatización post-columna con el reactivo de Ellman (Ellman, 1959) a un flujo de 0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La absorbancia del compuesto derivatizado se midió a 412 nm. Los patrones utilizados fueron estándares de GSH y de hPCs (hPC2, hPC3 y hPC4) y una mezcla de PCs (PC2, PC3, PC4, PC5 y PC6).

2.9. Tratamiento estadístico

Todos los análisis de los diferentes tratamientos se realizaron por triplicado. Los datos se analizaron mediante un análisis de Varianza (ANOVA) de una y dos vías. En los casos en los que el p-valor fue significativo ($p \leq 0,05$) se realizó un test HSD de Tukey (con $p \leq 0,05$) para comprobar las diferencias entre grupos. Para el análisis de la correlación entre dos variables cuantitativas se empleó el coeficiente de correlación de Pearson, considerándose significativa cuando $r \geq 0,95$. Los programas utilizados para realizar los análisis fueron RStudio (versión 3.5.1) y Excel.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis del suelo

En la Tabla 1 se muestran los parámetros físico-químicos del suelo inicial de Soterraña en el que se llevó a cabo el estudio.

Tabla 1. Parámetros físico-químicos del suelo. Los datos son la media \pm el error estándar de 3 réplicas diferentes.

Parámetros	Resultados
Limo	30,3%
Arena	41 %
Arcilla	28,7 %
Textura (USDA)	Franco-arcillosa
pH	4,9
Conductividad	0,06 dS/m
Materia orgánica	5,06 %
Metal(oid)es totales (mg/kg)	
As	909,72 \pm 9,13
Cd	<4
Cr	<50
Cu	<50
Hg	15,42 \pm 1,39
Ni	<50
Pb	<100
Zn	110 \pm 13,1
Metal(oid)es biodisponibles (mg/kg)	
As	23,45 \pm 5,37
Hg	0,13 \pm 0,04
Cd	2.1 \pm 0.17
Cr	12 \pm 2,01
Cu	22 \pm 2,52
Ni	10,2 \pm 3,1
Pb	19,2 \pm 2,6
Zn	68,3 \pm 9,1

Este suelo, de pH ácido, se clasificó debido a su textura como un suelo franco-arcilloso siguiendo las especificaciones del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA). El análisis del contenido total de metal(oid)es muestra una concentración de As y Hg 30 veces más alta que la permitida para un suelo agrícola, lo que representa un alto riesgo ambiental, mientras que el Cd, Pb y Zn se encuentran en la concentración límite para que sean considerados tóxicos en el suelo (Kabata-Pendias, 2010). A pesar de la alta concentración total de As y Hg en el suelo, cuando se analizó la fracción disponible de estos elementos se observó que más del 90% se encontraban en las fracciones no disponibles, especialmente en la fracción residual (datos no mostrados). Aún así los resultados obtenidos indican que el suelo requiere de algún proceso de remediación ya que los metal(oide)s de esta fracción disponible pueden ser directamente absorbidos por las raíces de las

plantas o pueden llegar a estar disponibles mediante procesos químicos o biológicos pudiendo entrar en cualquiera de los casos en la cadena trófica (Li et al., 2010).

Cuando se añaden las nZVI al suelo se observa un aumento significativo del pH (Fig. 1) que se mantuvo a lo largo de los 10 días de cultivo, mientras que en el caso de la adición de AC los valores de pH medidos son similares al suelo S. Para algunas especies la mayor disponibilidad de As tiene lugar a pH básico (Kabata-Pendias 2010; Moreno-Jiménez et al. 2011). El tratamiento S+F es el que presenta el pH más ácido, sobre todo durante los 3 primeros días (Fig. 1).

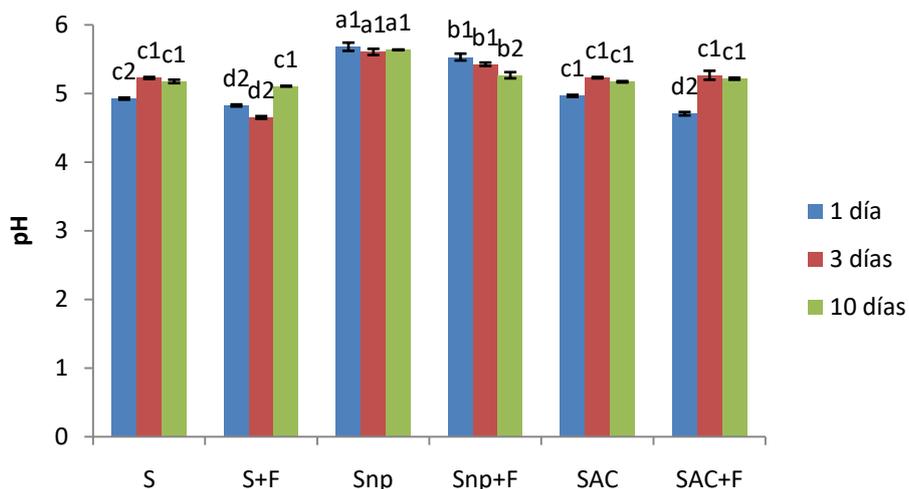


Fig. 1. Valores del pH del suelo al cabo de 1, 3 y 10 días de cultivo en los distintos tratamientos. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos mientras que los números indican diferencias entre los días de cultivo dentro del mismo tratamiento.

Respecto a la conductividad eléctrica del suelo, se observa que no hay diferencias entre los tratamientos a los que se añadió nZVI y AC pero sí aumenta considerablemente con la adición del fertilizante obteniéndose el valor más alto en Snp+F después de 1 día de cultivo (Fig. 2).

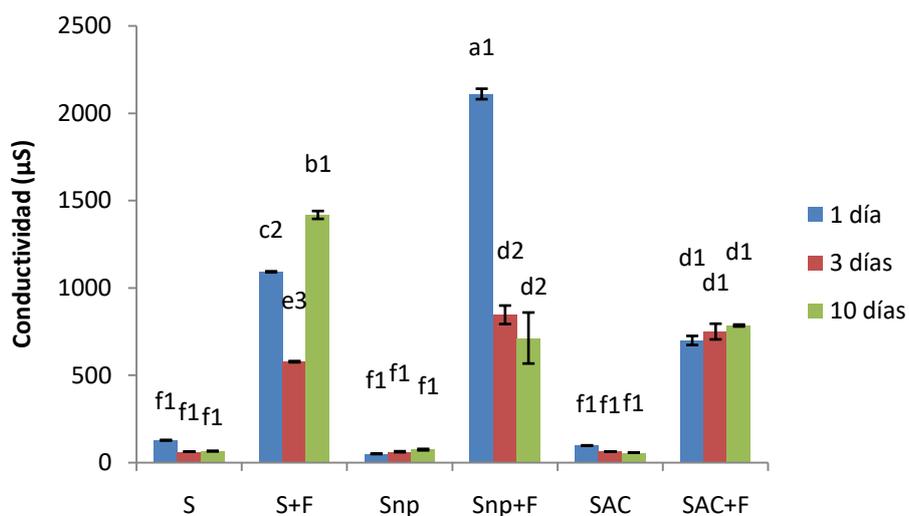


Fig. 2. Conductividad eléctrica del suelo al cabo de 1, 3 y 10 días de cultivo en los distintos tratamientos. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos mientras que los números indican diferencias entre los días de cultivo dentro del mismo tratamiento.

Cuando se analizó la biodisponibilidad del As en los diferentes tratamientos de suelo a lo largo del cultivo observamos que al cabo de un día de cultivo, la concentración más alta de As disponible era la del tratamiento S+F mientras que la más baja se correspondía con Snp (Fig. 3). Estos resultados son similares a los obtenidos por Zhang et al. (2010) y Gil-Díaz et al. (2014), quienes observaron una menor biodisponibilidad del As en suelos con nZVI que atribuyen a la adsorción del arsénico por los óxidos de hierro presentes en la superficie de las nanopartículas, lo que da lugar a la precipitación de complejos poco solubles, como AsFeO_4 , que no son asimilables por la planta.

El hecho de que la adición de fertilizante incremente la disponibilidad del As en todos los tratamientos excepto en SAC que solo lo hace a los 10 días también fue observado por Liu y Lin (2013) y Hou et al. (2014). Según estos autores, uno de los principales factores involucrados en la mayor biodisponibilidad del arsénico por el fertilizante es el incremento del contenido de carbono orgánico disuelto en el suelo. Los ligandos del carbono orgánico disuelto facilitan que el arsénico pase de la fracción no disponible a la disponible mediante la formación de complejos solubles. El incremento del contenido de fosfato en el suelo como consecuencia de la adición de fertilizante también puede aumentar la cantidad de arsénico disponible (Gunes et al., 2009).

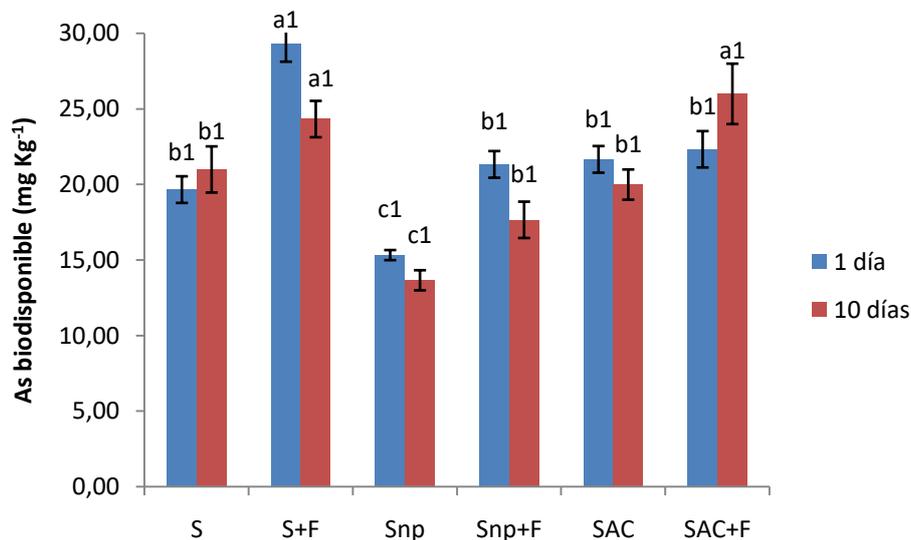


Fig. 3. Concentración de As (mg Kg^{-1}) biodisponible al cabo de 1 y 10 días de cultivo en los distintos tratamientos. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos mientras que los números indican diferencias entre los días de cultivo dentro del mismo tratamiento.

Relacionando el pH del suelo de los diferentes tratamientos con la disponibilidad del As se observa que no existe una relación directa entre ambos parámetros (Fig. 4). Sin embargo Kabata-Pendias (2010) y Moreno-Jimenez et al. (2011), observan mayor biodisponibilidad del arsénico a pH básico. En nuestro caso, pese a no tratarse de una correlación significativa ($R^2 = 0,437$), se observa una tendencia a la disminución de la biodisponibilidad del arsénico con el aumento del pH, lo que coincidiría más con el estudio de Zeng et al. (2011), que observa un aumento de la biodisponibilidad de metales pesados a pH más ácido.

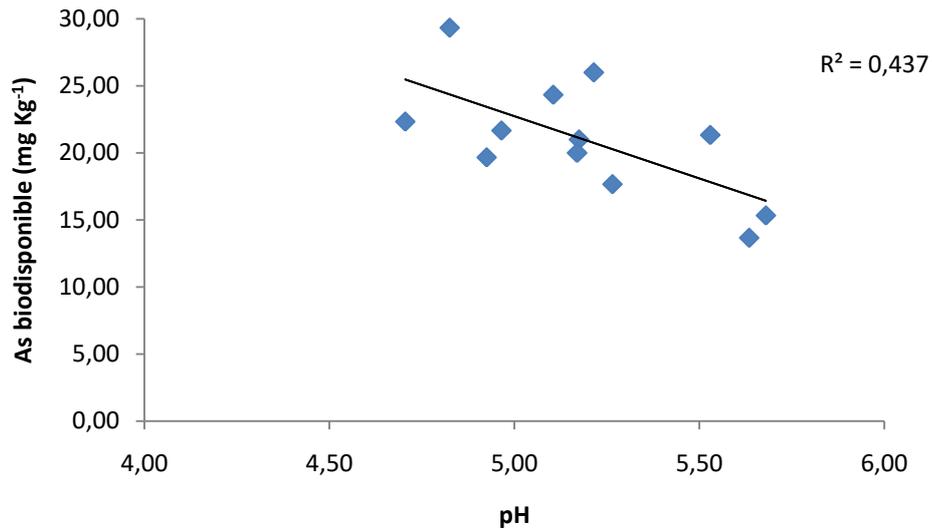


Fig. 4. Relación entre la biodisponibilidad del arsénico y el pH del suelo al cabo de 1 y 10 días de cultivo en todos los tratamientos.

3.2. Crecimiento de las plantas

Después de 10 días de cultivo podemos observar que la adición de nZVI o AC al suelo no modificó la longitud del tallo de las plantas de *M. sativa* cuando se compara con los resultados obtenidos en el suelo sin enmiendas (S) (Fig. 5a). Sin embargo sí se detectó una reducción en la longitud de la raíz cuando se añadió el AC (Fig. 5b). La raíz es el primer órgano en contacto con el suelo y, por tanto, no es extraño que muestre los efectos negativos en el caso de que el AC sea tóxico para la planta. Estos resultados son contrarios a los obtenidos por Najeeb et al. (2011), quienes trabajando con *Juncus effusus* creciendo en AC y Cd observaron un incremento en el crecimiento de la raíz y una ligera reducción en la longitud del tallo cuando se comparó al tratamiento sin AC. En otros estudios con *Eupatorium cannabinum* el AC no tuvo efecto sobre la longitud del tallo o de la raíz (González et al. 2019).

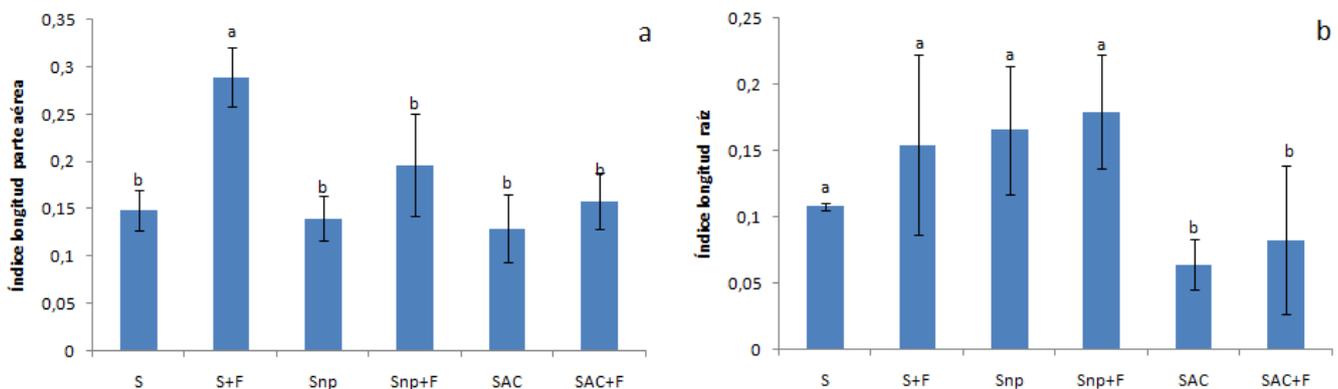


Fig. 5. Crecimiento del tallo (a) y de la raíz (b) de plantas de *M. sativa* al cabo de 10 días de cultivo en los distintos tratamientos. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos.

En relación con el efecto de las nZVI sobre el crecimiento del tallo y de la raíz no se observaron cambios significativos (Fig. 5a y b). Sin embargo, en la bibliografía los resultados son

contradictorios. Gil-Díaz et al. (2016) observaron un mayor crecimiento en plantas de cebada (*Hordeum vulgare*) cultivadas en suelo contaminado con As y tratado con nZVI, mientras que en otros estudios se ha observado que las nanopartículas tienen un efecto tóxico sobre el crecimiento de la planta, y los diferentes autores lo atribuyen a que las nanopartículas forman una capa de agregados de Fe alrededor de la raíz que interferirían con la absorción de agua y nutrientes lo que afectaría a su crecimiento (Ma et al. 2013; Martínez- Fernández et al. 2016).

La adición del fertilizante al suelo promovió el crecimiento en longitud del tallo en el tratamiento S+F (Fig. 5a) pero no el de la raíz (Fig. 5b). Estos resultados en cierta medida son esperados puesto que los fertilizantes aportan nutrientes minerales al suelo que reducen las deficiencias minerales preexistentes (Taiz y Zeiger, 2010; White y Brown, 2010) lo que afecta positivamente al crecimiento de la planta. El suelo de soterraña (S), es un suelo pobre desde el punto de vista nutricional por lo que el efecto positivo del fertilizante sobre el crecimiento del tallo es muy evidente. Este efecto de la adición de fertilizantes orgánicos en el crecimiento de las plantas en suelos contaminados con metales pesados ya ha sido observado también en otros estudios (Karami y Shamsuddin, 2010). El fertilizante en el suelo con nZVI no promueve significativamente el crecimiento del tallo (Fig. 5a), quizá porque las nanopartículas interfieren con la absorción de agua y nutrientes, reduciendo el efecto del fertilizante (Ma et al. 2013; Martínez-Fernández et al. 2016). En el caso del tratamiento SAC+F tampoco se observaron diferencias con SAC (Fig. 5a y b).

Cuando se midió el peso fresco de la planta observamos una reducción del mismo en todos los tratamientos excepto en el día 1 en el tratamiento Snp (Fig. 6) lo cual indicaría una pérdida de agua en todos los casos que es más acusada a medida que aumentan los días de cultivo. Puesto que en todos los tratamientos vemos una disminución de peso fresco, esto nos hace pensar que el As presente en el suelo o la mezcla de todos los metales pesados es muy tóxica para las plantas y sería responsables de esta reducción. Una reducción en el contenido hídrico en respuesta al As fue también observada por otros autores en *Phaseolus vulgaris* (Stoeva et al. 2005), *Oryza sativa* (Shri et al. 2009), y *Brassica napus* (Farooq et al. 2015). Estos autores concluyeron que el efecto tóxico del As disminuía la tasa fotosintética y la actividad metabólica de las plantas lo que se refleja en una disminución del peso fresco.

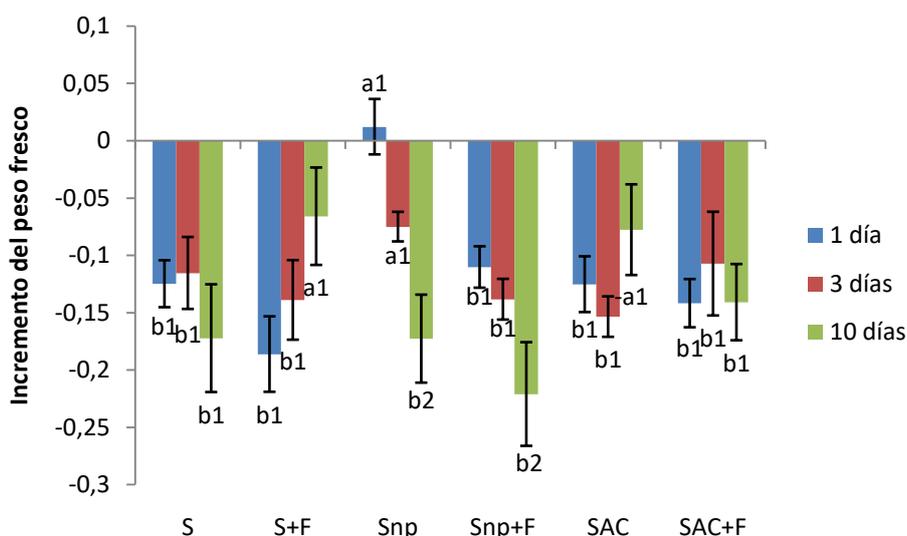


Fig. 6. Incremento del peso fresco de las plantas de *M. sativa* al cabo de 10 días de cultivo en los distintos tratamientos. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos mientras que los números indican diferencias entre los días de cultivo dentro del mismo tratamiento.

3.3. Acumulación de arsénico en la planta

Puesto que la disponibilidad de los metales pesados en el suelo es muy baja, este estudio se ha centrado en las respuestas de las plantas al As ya que es el más abundante. Las plantas acumulan mucho más arsénico en las raíces que en la parte aérea en todos los tratamientos estudiados (Fig. 7 a y b). Resultados similares fueron también obtenidos por otros autores (Chen et al. 2015; Fernández-Fuego et al. 2017; González et al. 2019; Navazas et al. 2019) trabajando con *M. sativa*, *Betula pubescens*, *E. cannabinum* y *Salix atrocinerea* respectivamente. Esta alta acumulación en raíces hace que el factor de translocación (mg As parte aérea/mg As raíz) sea bajo (inferior a 0.3, dato no mostrado). Se cree que esto representa un mecanismo de detoxificación de As para inmovilizar el metaloide en compartimentos celulares de la raíz y reducir su concentración en las hojas para evitar alterar procesos fisiológicos claves que afecten al desarrollo de la planta, como ya fue subrayado por Afshan et al. (2015) y Zaheer et al. (2015). La concentración de As en la parte aérea se encuentra dentro de los límites considerados tóxicos para una planta ($1-20 \text{ mg Kg}^{-1}$) (White y Brown, 2010). Sin embargo, la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 7 de mayo de 2002, sobre sustancias indeseables en la alimentación animal, establece el contenido máximo de arsénico en materias primas para la alimentación animal en 2 mg Kg^{-1} , por lo que nuestros resultados sobrepasan ampliamente este nivel.

Las plantas del tratamiento Snp presentaron en la parte aérea una acumulación de As similar al tratamiento S (Fig. 7a). Estos resultados no eran los esperados inicialmente pues si las nZVI adsorben el arsénico en su superficie dando lugar a la precipitación de complejos poco solubles y no asimilables por la planta (Zhang et al., 2010; Gil-Díaz et al., 2014), la absorción sería menor y por tanto la acumulación en la planta también debería ser menor. Sin embargo, esto no fue así posiblemente porque la cantidad de As disponible en el suelo todavía era alta. No obstante, en las raíces sí se observa en los tratamientos Snp de 1 y 3 días una acumulación de As significativamente menor en el tratamiento con nZVI (Fig. 7b).

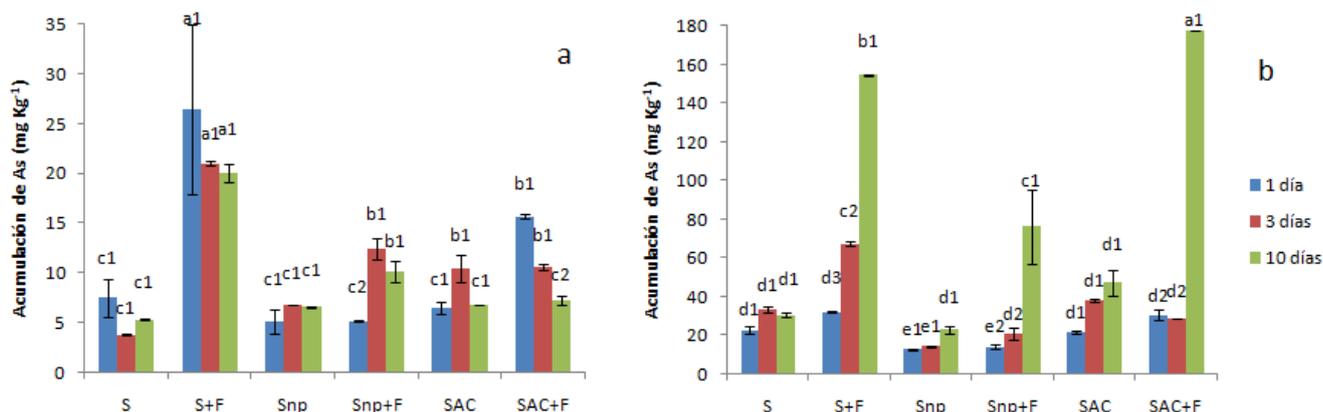


Fig. 7. Acumulación de As en la parte aérea (a) y en la raíz (b) al cabo de 1, 3 y 10 días de cultivo en los distintos tratamientos. Diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos mientras que los números indican diferencias entre los días de cultivo dentro del mismo tratamiento.

Respecto a las plantas cultivadas en SAC vemos que la acumulación de As en la parte aérea y la raíz es similar al tratamiento S y Snp (Fig. 7a y b). Aunque en la bibliografía el efecto del AC sobre la acumulación de metal(oid)es es controvertido (Anwer et al. 2012) y parece que depende de la dosis utilizada y de la especie vegetal, muchos autores proponen que el AC reaccionaría con los metal(oid)es presentes en el suelo, formando complejos solubles que permitirían una mejor absorción por la planta (Kwak et al. 2013; Afshan et al. 2015; Zaheer et al. 2015).

Al añadir el fertilizante al suelo observamos que en la parte aérea la concentración de As en S+F aumenta entre 4 y 5 veces respecto al tratamiento S (Fig. 7a). Otros autores (Jankong et al., 2007) ya observaron que el incremento del crecimiento de la planta como resultado de la adición de fertilizante contribuía positivamente a la acumulación de arsénico en *Pityrogramma calomelanos*. Las raíces de las plantas tratadas con fertilizante son las que más arsénico acumulan, especialmente a los 10 días en S+F y SAC+F (Fig. 7b). El AC es eficaz como agente quelante del arsénico, al inhibir la precipitación de hidróxidos y favorecer la formación de arsenito en la fracción soluble, facilitando así su absorción y acumulación en los tejidos de la planta (Almaroai et al., 2012). El efecto positivo de la adición de fertilizante orgánico al suelo se debe entre otros factores al incremento del contenido de carbono orgánico disuelto en el suelo, el cual favorece la formación de complejos de arsénico solubles, lo que facilita su absorción y acumulación por la planta (Hou et al., 2014). En Snp+F también se observó una mayor acumulación de As en las raíces a los 10 días cuando se compara con Snp, aunque menos pronunciada que en los otros dos casos. Esto puede ser debido a que, como se vio anteriormente, la cantidad de arsénico biodisponible también era menor en este tratamiento, probablemente por efecto de las nZVI, lo cual contrarrestó en cierta medida el efecto del fertilizante.

Por otra parte, resulta llamativo que en algunos tratamientos los días de cultivo no influyen en la acumulación de arsénico. Parece que ya el primer día se produce una saturación de As en las células y esto podría estar relacionado con el descenso en el peso fresco obtenido ya que este metaloide es absorbido por la planta debido a su similitud química con otros elementos esenciales como el P y entrarían a través de los transportadores fosfato junto con la corriente de agua generada por la transpiración (Luo et al., 2014).

3.4. Análisis de compuestos relacionados con el estrés oxidativo

3.4.1. Pigmentos fotosintéticos

No se observan diferencias en el contenido de clorofila total entre los tratamientos S, Snp y SAC (Tabla 2) pero sí en el de carotenoides, que aumentan en Snp y SAC respecto a S.

Tabla 2. Contenido de pigmentos fotosintéticos en hojas de *M. sativa* cultivadas durante 10 días en los distintos tratamientos ($\mu\text{g gPF}^{-1}$). Diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos.

Tratamientos	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total	Carotenoides
S	180,88±8,14b	58,67±11,32b	239,55±35,74b	54,88±9,48c
S+F	22,13±11,26c	17,07±2,57c	39,19±4,94c	62,72±18,10c
Snp	174,55±60,83b	79,30±16,28b	253,85±37,64b	93,11±19,21b
Snp+F	142,21±52,79b	113,11±24,31a	255,33±25,17b	68,52±0,35c
SAC	154,31±24,98b	63,54±14,09b	217,86±28,70b	101,25±6,19b
SAC+F	284,35±53,37a	112,99±3,85a	397,35±54,08a	131,04±18,22a

En los tratamientos con fertilizante se observa un gran descenso en el contenido de clorofilas en S+F mientras que en SAC+F se detectan los niveles más elevados de todos los pigmentos (Tabla 2).

Este descenso de las clorofilas a y b medido en S+F podría ser debido a que en este tratamiento es donde las plantas acumularon la mayor cantidad de arsénico en su parte aérea y la

inhibición de la síntesis de pigmentos y por tanto de la fotosíntesis es una de las primeras manifestaciones de la exposición a As (Mishra et al., 2016).

Esto coincide con el estudio de Chen et al. (2015), que observaron una mayor disminución del contenido de clorofilas a y b en hojas de *Medicago sativa* cuanto más alta era la concentración de arsénico del suelo. Por otra parte, el alto contenido de pigmentos fotosintéticos en las plantas del tratamiento SAC+F sugiere un efecto positivo del AC en la síntesis de estos pigmentos. Esto coincide con el estudio de Shakoor et al. (2014), en el que se observa que la disminución de la síntesis de clorofilas en plantas de *Brassica napus* cultivadas en un medio con plomo se vio contrarrestada con la adición de ácido cítrico al medio de cultivo.

Los carotenoides, además de participar en la actividad fotosintética, también presentan una función antioxidante (Singh et al., 2006), lo cual explica su aumento ante una exposición al arsénico, como también observaron Mascher et al. (2002) en *Trifolium pratense*.

3.4.2. Análisis del peróxido de hidrógeno

La presencia de metal(oid)es en el suelo causa estrés oxidativo a las plantas que crecen en esas condiciones lo que se manifiesta entre otras cosas por un aumento en el contenido de H₂O₂ (Singh et al., 2007), por lo que no resulta extraño que en nuestro caso hayamos detectado este compuesto en todos los tratamientos (Fig. 8). En el caso del tratamiento S, tanto en las hojas como en las raíces, se observa un contenido de H₂O₂ significativamente más alto que en el resto de los tratamientos, lo que parece indicar que tanto la adición de nZVI, como de AC e incluso del fertilizante contribuyen a reducir el estrés oxidativo causado por el arsénico y el resto de los metales pesados del suelo.

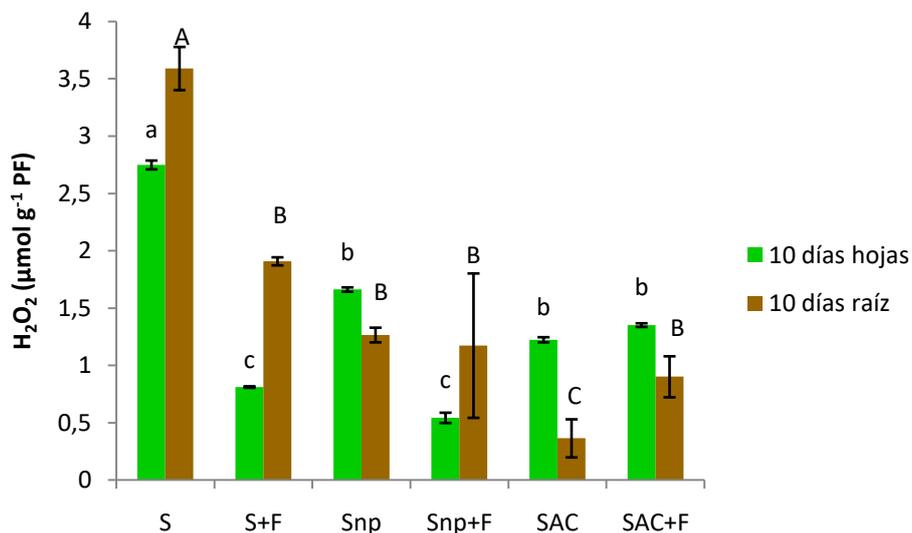


Fig. 8. Concentración de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en hojas y raíces de *M. sativa* al cabo de 10 días de cultivo en los distintos tratamientos. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en las hojas, mientras que diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en la raíz.

Este descenso de H₂O₂ en el tratamiento con nanopartículas, está en contraposición a lo observado por otros autores (Ma et al., 2010) trabajando con nanopartículas en suelos contaminados quienes concluyen que el uso de nZVI provoca un efecto tóxico en plantas de *Typha*

que influye en los procesos de óxido-reducción de la planta. Otros autores (Huang et al. 2018) proponen que esta disminución en el contenido de H_2O_2 podría ser debida a un incremento de la producción de enzimas antioxidantes.

Respecto al ácido cítrico, éste reduce el estrés oxidativo causado por metales pesados al incrementar la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, peroxidasa, catalasa y ascorbato peroxidasa (Ehsan et al., 2014; Shakoor et al., 2014). La adición del fertilizante orgánico supone un aporte de fósforo al suelo, y de acuerdo con Gunes et al. (2009) el incremento en la absorción de fosfatos disminuye el estrés oxidativo de la planta al regular el pH celular, disminuyendo la conversión de arsenato a arsenito y la formación de especies reactivas de oxígeno como el H_2O_2 .

3.4.3. Análisis de la peroxidación lipídica

El contenido de MDA en los diferentes tratamientos se representa en la Fig. 9. En ella podemos ver que, tanto en hojas como en raíces, el contenido de MDA es significativamente más alto en el tratamiento S que en el resto de los tratamientos. Esto se podría explicar por el efecto positivo tanto del fertilizante como de las nanopartículas y del ácido cítrico sobre la disminución del estrés oxidativo, que ya se ha comentado en el apartado anterior. En general, en la planta, el contenido de MDA y de H_2O_2 están relacionados, ya que mientras que el MDA es un indicador de la peroxidación de los lípidos de la membrana celular, el H_2O_2 es una especie reactiva de oxígeno que participa en la misma (Gunes et al., 2009; Huang et al., 2018).

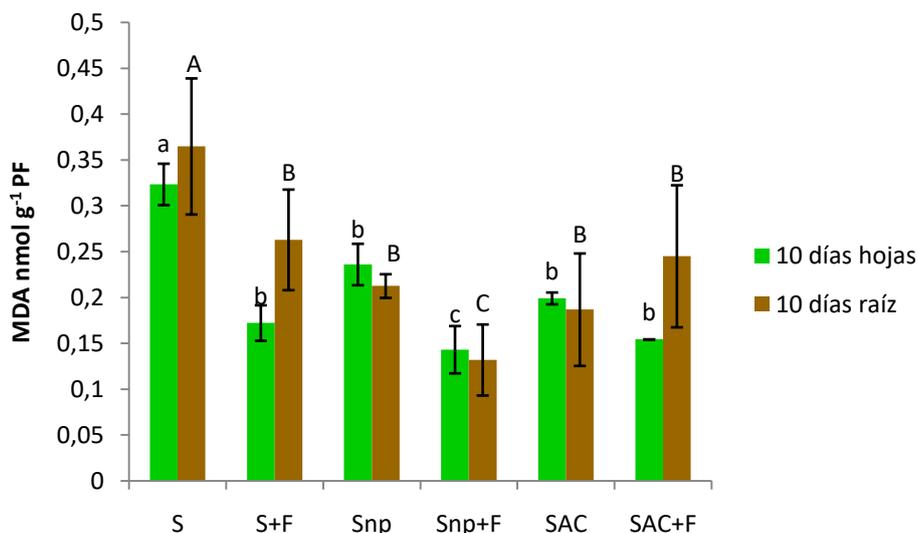


Fig. 9. Concentración de MDA en hojas y raíces de *M. sativa* al cabo de 10 d de cultivo en los distintos tratamientos. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en las hojas, mientras que diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en la raíz.

La acumulación de metales pesados en las células vegetales produce especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden producir daño oxidativo (Shahid et al. 2014). Los lípidos de la membrana son muy sensibles a la oxidación por ROS y por tanto son considerados como dianas primarias para la toxicidad del metal (Del rio y López-Huertas, 2016). De acuerdo con nuestros resultados las bajas concentraciones de peroxidación lipídica obtenidas sugieren que el sistema antioxidante de la alfalfa fue capaz de hacer frente a la producción de H_2O_2 inducida por los metales pesados del suelo como

también fue observado por otros autores en otras especies (Sytar et al. 2013; Fernández-Fuego et al. 2017).

3.4.4. Análisis del contenido de prolina

La acumulación de prolina en las células es un mecanismo común de las plantas para defenderse del estrés oxidativo causado por el arsénico y otros metales pesados, y ayuda a proteger las membranas celulares mediante la eliminación de ROS y también incrementa la fosforilación oxidativa en las mitocondrias (Pavlík et al., 2010). En la Fig. 10 observamos que el contenido en prolina de las hojas es similar en los tratamientos S y Snp mientras que aumentó significativamente en SAC. Al añadir el fertilizante se observa un aumento respecto al tratamiento sin fertilizante excepto en SAC+F. En cuanto al contenido de prolina en raíces detectamos los niveles más bajos en el tratamiento S cuando se compara con Snp y SAC mientras que los más altos se obtuvieron en SAC+F (Fig. 10). La prolina, tanto en hojas como en raíces, es importante para proteger a la planta del estrés y evitar daños mayores en su metabolismo (Bonet et al., 2016).

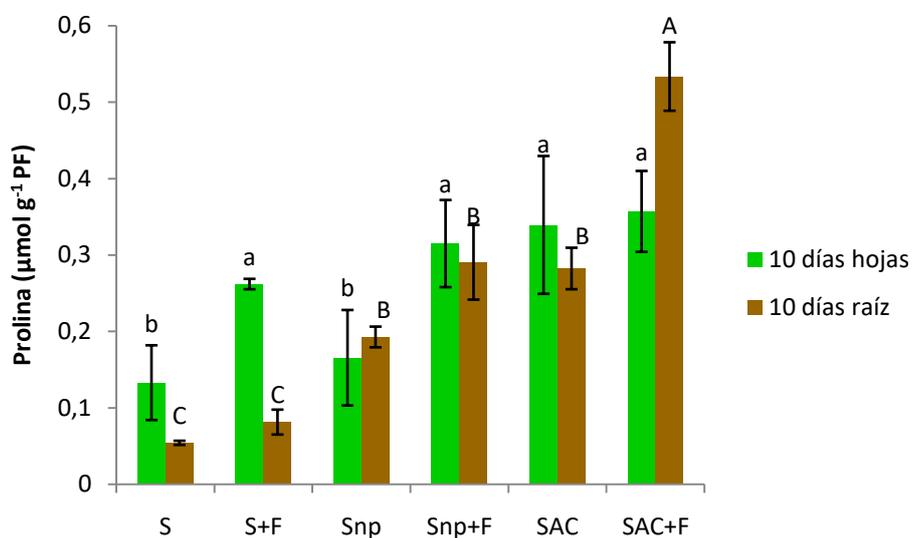


Fig. 10. Concentración de prolina en hojas y raíz de *M. sativa* al cabo de 10 d de cultivo en los distintos tratamientos. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en las hojas, mientras que diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos en la raíz.

Hay que resaltar que el tratamiento S que presenta bajos niveles de prolina es asimismo el que presenta unos niveles más elevados de H₂O₂ y MDA, que como se ha comentado son signos de estrés en la célula. Por otra parte, tratamientos con altos niveles de prolina, como SAC+F, presentan a su vez bajo contenido de H₂O₂ y MDA. Esto parece concordar con el efecto positivo de la acumulación de prolina sobre la disminución de los síntomas de estrés oxidativo. Los tratamientos con nZVI presentan también niveles bajos de prolina, lo que podría ser debido a su ya mencionado efecto positivo en la producción de enzimas antioxidantes (Huang et al., 2018).

3.5. Análisis de compuestos tiólicos no proteicos (CTNP)

En la Tabla 3 se muestran los resultados de los compuestos tiólicos de la parte aérea de las plantas de alfalfa cultivadas en los distintos tratamientos. Se observa que aquellas cultivadas en el suelo S presentan 6 compuestos tiólicos de los cuales los más abundantes son el GSH y hGSH. Además también podemos observar la presencia de 3 compuestos que no hemos podido identificar y que hemos denominado CT2, CT5 y CT6 en función de su tiempo de retención. Tanto el GSH como el hGSH son compuestos tiólicos de bajo peso molecular que cumplen en la planta una función de detoxificación frente a metales pesados pero también son precursores de la síntesis de fitoquelatinas y homofitoquelatinas respectivamente, las cuales forman complejos con los metal(oid)es tóxicos y se almacenan finalmente en las vacuolas para evitar la interferencia con procesos fisiológicos fundamentales en las hojas (Bleeker et al., 2006; Li et al., 2006; Yadav, 2010).

Tabla 3. Compuestos tiólicos no proteicos (nmol g⁻¹PF) en la parte aérea de *M. sativa* cultivada durante 10 días en los distintos tratamientos. Diferentes letras dentro de la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05).

CTNP	Tratamientos					
	S	S+F	SnP	SnP+F	SAC	SAC+F
Cys	0,34±0,04b	1,22±0,09b	0,31±0,06b	9,82±1,26a	0,36±0,03b	2,22±0,47b
GSH	1,66±0,14b	1,41±0,13b	1,09±0,04b	8,54±1,08a	0,79±0,00b	5,21±0,65a
hGSH	1,01±0,03c	3,24±0,06b	1,99±0,20c	12,91±1,32a	3,73±0,02b	6,83±0,92b
CT2	0,53±0,07c	1,78±0,11a	0,56±0,11c	-	1,09±0,03b	1,29±0,13a
h-PC2	-	0,46±0,03b	-	2,21±0,23a	-	-
cysPC2	-	0,28±0,03b	-	0,92±0,23a	-	1,16±0,05a
PC3	-	0,56±0,11b	-	4,36±0,55a	-	0,22±0,04b
hPC3	-	-	-	-	-	1,51±0,22a
cysPC3	-	0,14±0,03a	-	0,39±0,06a	-	-
PC4	-	-	-	-	-	0,12±0,02a
h-PC4	-	0,30±0,01a	-	0,42±0,07a	-	0,24±0,08a
desglyPC4	-	-	-	-	-	0,19±0,09a
PC5	-	0,31±0,08a	-	0,64±0,03a	-	-
CT5	0,04±0,01c	0,13±0,03b	0,12±0,00b	-	0,28±0,00a	-
CT6	0,70±0,04a	0,41±0,05b	0,40±0,03b	-	0,40±0,00b	-
Total	4,28±0,73c	10,25±0,54b	4,47±1,59c	40,20±0,28a	6,66±0,27c	18,98±0,23b

Cuando se añaden nanopartículas al suelo o AC, el contenido total de tioles, en la parte aérea es similar al obtenido en el tratamiento S no detectándose la presencia de nuevos compuestos tiólicos (Tabla 3). Estos resultados son lógicos si tenemos en cuenta que la acumulación de As era similar en los 3 tratamientos a los 10 días de cultivo.

En cuanto a los resultados obtenidos en la parte aérea de las plantas cultivadas en los tratamientos con fertilizante observamos un contenido total de tioles más alto que en los tratamientos sin fertilizante. Llama la atención que el mayor contenido de tioles se observa en SnP+F que no fue el tratamiento que presentó la mayor acumulación de As. Este aumento de tioles se debe tanto a la síntesis de los compuestos tiólicos preexistentes en las plantas sin fertilizantes como a la síntesis *de novo* de hPC2, cysPC2, PC3, hPC4 y PC5. De todos ellos, los más abundantes son Cys, GSh y hGSH, lo cual es lógico ya que estos compuestos son la base para la síntesis de PCs de mayor tamaño (Cobbett, 2000). En el caso de los tratamientos S+F y SAC+F también se observa un

perfil tiólico similar aunque con algún ligero cambio (no está presente CysPC3 en SAC+F y es el único tratamiento en que aparece desglyPC4). También hay que destacar que tanto en el tratamiento Snp+F como en SAC+F desaparecen los tioles CT5 y CT6. No es fácil justificar por qué el tratamiento Snp+F es el que más tioles presenta. Podría ser que la planta absorba, junto con los elementos minerales del suelo, estas nanopartículas de Fe y al este un metal pesado la planta sintetice fitoquelatinas para quelar ese exceso de Fe. Otros autores también observaron que las nanopartículas pueden ser absorbidas y acumuladas en los tejidos de *Populus deltoides x Populus nigra* (Ma et al., 2013), lo que podría dar lugar a una situación de toxicidad y ser, quizá, la causa de esa mayor síntesis de compuestos tiólicos.

En raíces observamos que en el tratamiento S, el contenido total de tioles, aunque es similar en cantidad al de la parte aérea hay que destacar que presenta 11 tioles (Tabla 4) frente a los 6 que tenía la parte aérea. En Snp+F y SAC+F el contenido total es similar aunque se detecta la presencia de cysPC3 y desaparece desglyPC3 que sí estaba presente en el tratamiento S (Tabla 4). Además también observamos la presencia de 2 tioles no identificados que no estaban presentes en la parte aérea que son CT1 y CT6. Puesto que en las raíces se acumuló 5 ó 6 veces más As que en la parte aérea esperábamos que la concentración de tioles también fuera mayor pero no fue así sino que era similar. No podemos olvidar que las plantas pueden estar utilizando simultáneamente otros mecanismos de detoxificación como la unión a las paredes celulares, síntesis de ácidos orgánicos o compuestos fenólicos como ya observaron también otros autores trabajando con varios metales pesados en diferentes especies vegetales (Sun et al. 2011; Fernández et al. 2014; Fernández-Fuego et al. 2017).

Tabla 4. Compuestos tiólicos no proteicos (nmol g⁻¹PF) en raíces de *M. sativa* cultivada durante 10 días en los distintos tratamientos. Diferentes letras dentro de la misma fila indican diferencias significativas (p<0.05).

CTNP	Tratamientos					
	S	S+F	Snp	Snp+F	SAC	SAC+F
Cys	0,13±0,00c	0,47±0,01b	0,19±0,02c	0,79±0,09a	0,26±0,02b	0,09±0,02c
CT1	1,23±0,16a	-	-	0,26±0,12b	-	-
GSH	0,63±0,02b	1,98±0,06a	1,72±0,08a	3,02±0,01a	1,06±0,11b	0,61±0,00b
hGSH	1,17±0,26b	2,25±0,07a	3,13±0,04a	5,03±0,70a	2,33±0,38a	1,14±0,00b
CT2	0,06±0,03a	-	-	-	-	-
PC2	-	1,53±0,05a	0,12±0,02b	1,35±1,15a	0,09±0,09b	-
CT3	-	-	-	0,10±0,15a	-	-
desglyPC2	0,19±0,06b	3,22±0,09a	0,38±0,08b	3,49±0,24a	0,79±0,00b	-
h-PC2	0,17±0,01a	-	0,06±0,01b	-	0,05±0,02b	-
cysPC2	-	-	-	-	-	0,13±0,00a
PC3	1,12±0,00b	3,91±0,07a	0,48±0,04c	2,04±0,02b	0,84±0,00c	0,27±0,00c
desglyPC3	0,29±0,01b	2,46±0,06a	-	0,60±0,73b	-	-
cysPC3	-	-	0,35±0,01a	0,62±0,42a	0,25±0,09a	-
hPC4	-	-	-	-	-	0,37±0,00a
PC5	-	-	-	-	-	0,26±0,00a
CT4	0,89±0,13a	1,04±0,01a	0,83±0,04a	1,23±0,30a	0,72±0,16a	-
CT6	0,03±1,23a	-	-	-	-	-
Total	5,92±0,14b	16,86±0,24a	7,26±0,47b	18,54±0,34a	6,39±0,40b	2,90±0,15b

Al añadir el fertilizante al suelo, observamos un aumento de tioles en los tratamientos S+F y Snp+F (Tabla 4) lo que parece lógico puesto que también observamos una mayor acumulación de As que en esos mismos suelos sin fertilizante. Sin embargo, llama la atención que en SAC+F disminuya el contenido total de tioles, lo cual es difícil de justificar sobre todo cuando en este último tratamiento se obtuvo la mayor acumulación de As en raíces (Fig. 8) y entre las estrategias de la planta está la de detoxificar rápidamente los elementos tóxicos que sean absorbidos por la raíz para evitar que lleguen a las hojas y afecten a procesos fisiológicos claves para la planta ya que estos órganos presentan mayor sensibilidad que las raíces (Van der Ent et al. 2013). Esta disminución se podría explicar por el efecto del ácido cítrico como agente quelante, por lo que la planta no necesitaría sintetizar tantas PCs para tolerar el As (González et al. 2019).

4. CONCLUSIONES

- 1.- La adición de nZVI al suelo contaminado aumentó el pH del mismo y disminuyó la biodisponibilidad de As lo que, a largo plazo, podría redundar en una menor acumulación de As en la parte comestible de la planta.
- 2.- La adición de AC no modificó ni el pH del suelo ni la disponibilidad de As mientras que la fertilización sí incrementó la biodisponibilidad de As en todos los tratamientos.
- 3.- Tanto la adición de nZVI como de AC y fertilizante al suelo disminuyen el estrés oxidativo de las plantas al reducir el contenido de H_2O_2 y de MDA e incrementar el de prolina cuando se compara con los resultados obtenidos en el suelo sin enmiendas (S).
- 4.- Ni la nZVI ni el AC indujeron la síntesis de nuevos compuestos tiólicos en la parte aérea de la planta pero sí en la raíz que es donde más As se acumula. La fertilización indujo una mayor síntesis de novo de tioles tanto en la parte aérea como en la raíz a excepción del tratamiento SAC+F.

BIBLIOGRAFÍA

- Almaroai, Y. A., Usman, A. R., Ahmad, M., Kim, K. R., Moon, D. H., Lee, S. S., y Ok, Y. S. (2012). Effects of synthetic chelators and low-molecular-weight organic acids on chromium, copper, and arsenic uptake and translocation in maize (*Zea mays* L.). *Soil Science*, 177(11), 655-663.
- Afshan, S., Ali, S., Bharwana, S. A., Rizwan, M., Farid, M., Abbas, F. et al. (2015). Citric acid enhances the phytoextraction of chromium, plant growth, and photosynthesis by alleviating the oxidative damages in *Brassica napus* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(15), 11679-11689.
- Anwer, S., Ashraf, M. Y., Hussain, M., Ashraf, M., y Jamil, A. (2012). Citric acid mediated phytoextraction of cadmium by maize (*Zea mays* L.). *Pak J Bot*, 44(6), 1831-1836.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., y Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), 205-207.
- Bleeker, P. M., Hakvoort, H. W., Blik, M., Souer, E., y Schat, H. (2006). Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *The Plant Journal*, 45(6), 917-929.
- Bonet, A., Pascaud, G., Faugeron, C., Soubrand, M., Joussein, E., Gloaguen, V., y Saladin, G. (2016). Douglas fir (*Pseudotsugamenziesii*) plantlets responses to As, Pb, and Sb-contaminated soils from former mines. *International journal of phytoremediation*, 18(6), 559-566.
- Chen, F., Wang, S., Mou, S., Azimuddin, I., Zhang, D., Pan, X., Al-Misned, F., y Mortuza, M. G. (2015). Physiological responses and accumulation of heavy metals and arsenic of *Medicago sativa* L. growing on acidic copper mine tailings in arid lands. *Journal of geochemical exploration*, 157, 27-35.
- Cobbett, C. S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant physiology*, 123(3), 825-832.
- Demiral, T., y Turkan, I. (2005). Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 53 (3), 247-257.
- del Río, L. A., y López-Huertas, E. (2016). ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant and Cell Physiology*, 57(7), 1364-1376.
- Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 7 de mayo de 2002, sobre sustancias indeseables en la alimentación animal.
- Ehsan, S., Ali, S., Noureen, S., Mahmood, K., Farid, M., Ishaque, W., Shakoore, M. B. y Rizwan, M. (2014). Citric acid assisted phytoremediation of cadmium by *Brassica napus* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, 106, 164-172.
- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 82, 70-77.

- Farooq, M. A., Li, L., Ali, B., Gill, R. A., Wang, J., Ali, S. et al. (2015). Oxidative injury and antioxidant enzymes regulation in arsenic-exposed seedlings of four Brassica napus L. cultivars. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(14), 10699-10712.
- Fernández-Fuego, D., Bertrand, A., y González, A. (2017). Metal accumulation and detoxification mechanisms in mycorrhizal *Betula pubescens*. *Environmental Pollution*, 231, 1153-1162.
- Fernández, R., Bertrand, A., Casares, A., García, R., González, A., y Tamés, R. S. (2008). Cadmium accumulation and its effect on the in vitro growth of woody fleabane and mycorrhized white birch. *Environmental Pollution*, 152(3), 522-529.
- Fernández, R., Bertrand, A., García, J.I., Tamés, R.S., y González, A. (2012). Lead accumulation and synthesis of non-protein thiolic peptides in selected clones of *Melilotus alba* and *Melilotus officinalis*. *Environmental and Experimental Botany*, 78, 18-24.
- Fernández, R., Fernández-Fuego, D., Bertrand, A., y González, A. (2014). Strategies for Cd accumulation in *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter: role of the cell wall, non-protein thiols and organic acids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 78, 63-70.
- Finnegan, P., y Chen, W. (2012). Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. *Frontiers in physiology*, 3, 182.
- Gil-Díaz, M., Alonso, J., Rodríguez-Valdés, E., Pinilla, P., y Lobo, M. C. (2014). Reducing the mobility of arsenic in brownfield soil using stabilised zero-valent iron nanoparticles. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 49(12), 1361-1369.
- Gil-Díaz, M., Díez-Pascual, S., González, A., Alonso, J., Rodríguez-Valdés, E., Gallego, J. R., y Lobo, M. C. (2016). A nanoremediation strategy for the recovery of an As-polluted soil. *Chemosphere*, 149, 137-145.
- Gómez-Sagasti, M. T., Alkorta, I., Becerril, J. M., Epelde, L., Anza, M., y Garbisu, C. (2012). Microbial monitoring of the recovery of soil quality during heavy metal phytoremediation. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(6), 3249-3262.
- González, H., Fernández-Fuego, D., Bertrand, A., y González, A. (2019). Effect of pH and citric acid on the growth, arsenic accumulation, and phytochelatin synthesis in *Eupatorium cannabinum* L., a promising plant for phytostabilization. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05657-2> (en prensa).
- Gunes, A., Pilbeam, D. J., e Inal, A. (2009). Effect of arsenic-phosphorus interaction on arsenic-induced oxidative stress in chickpea plants. *Plant and Soil*, 314(1-2), 211-220.
- Hou, Q. H., Ma, A. Z., Lv, D., Bai, Z. H., Zhuang, X. L., y Zhuang, G. Q. (2014). The impacts of different long-term fertilization regimes on the bioavailability of arsenic in soil: integrating chemical approach with *Escherichia coli* Δ arsR::lac-based biosensor. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(13), 6137-6146.
- Huang, D., Qin, X., Peng, Z., Liu, Y., Gong, X., Zeng, G., Huang, C., Cheng, M., Xue, W., Wang, X., y Hu, Z. (2018). Nanoscale zero-valent iron assisted phytoremediation of Pb in sediment: Impacts on metal accumulation and antioxidative system of *Lolium perenne*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 153, 229-237.

- Jankong, P., Visoottiviseth, P., y Khokiattiwong, S. (2007). Enhanced phytoremediation of arsenic contaminated land. *Chemosphere*, 68(10), 1906-1912.
- Kabata-Pendias, A. (2010). *Trace elements in soils and plants, fourth edition*. CRC press.
- Karami, A., y Shamsuddin, Z. H. (2010). Phytoremediation of heavy metals with several efficiency enhancer methods. *African Journal of Biotechnology*, 9(25), 3689-3698.
- Kwak, J. H., Park, K., Chang, P. C., Liu, W., Kim, J. Y., y Kim, K. W. (2013). Influence of phosphate and citric acid on the phytoextraction of As from contaminated soils. *International Journal of Environment and Waste Management*, 11(1), 1-12.
- Larios, R., Fernández, R., y Rucandio, M. (2011). Movilidad y disponibilidad de arsénico en sedimentos mediante la aplicación del método de extracciones secuenciales BCR. *Informes Técnicos Ciemat*, 1225. Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Lefevre, E., Bossa, N., Wiesner, M. R., y Gunsch, C. K. (2016). A review of the environmental implications of in situ remediation by nanoscale zerovalent iron (nZVI): behavior, transport and impacts on microbial communities. *Science of the Total Environment*, 565, 889-901.
- Li, Y., Dankher, O. P., Carreira, L., Smith, A. P., y Meagher, R. B. (2006). The shoot-specific expression of γ -glutamylcysteine synthetase directs the long-distance transport of thiol-peptides to roots conferring tolerance to mercury and arsenic. *Plant Physiology*, 141(1), 288-298.
- Li, J., Lu, Y., Shim, H., Deng, X., Lian, J., Jia, Z., y Li, J. (2010). Use of the BCR sequential extraction procedure for the study of metal availability to plants. *Journal of Environmental Monitoring*, 12(2), 466-471.
- Liu, C. C., y Lin, Y. C. (2013). Reclamation of copper-contaminated soil using EDTA or citric acid coupled with dissolved organic matter solution extracted from distillery sludge. *Environmental pollution*, 178, 97-101.
- Luo, Z. B., Wu, C., Zhang, C., Li, H., Lipka, U., y Polle, A. (2014). The role of ectomycorrhizas in heavy metal stress tolerance of host plants. *Environmental and Experimental Botany*, 108, 47-62.
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., y Kolmakov, A. (2010). Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the total environment*, 408(16), 3053-3061.
- Ma, X., Gurung, A., y Deng, Y. (2013). Phytotoxicity and uptake of nanoscale zero-valent iron (nZVI) by two plant species. *Science of the Total Environment*, 443, 844-849.
- Martínez-Fernández, D., Barroso, D., y Komárek, M. (2016). Root water transport of *Helianthus annuus* L. under iron oxide nanoparticle exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(2), 1732-1741.
- Mascher, R., Lippmann, B., Holzinger, S., y Bergmann, H. (2002). Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science*, 163(5), 961-969.

- McLaughlin, M. J., Parker, D. R., y Clarke, J. M. (1999). Metals and micronutrients–food safety issues. *Field crops research*, 60(1-2), 143-163.
- Millán R., Gamarra R., Schmid T.; Sierra M.J.; Quejido, A.J.; Sánchez D.M.; Cardona A.I.; Fernández M.; Vera R. et al. (2006). Mercury content in vegetation and soils of the Almadén mining area (Spain). *Sci Tot Environ*, 368, 79–87.
- Mishra, S., Alfeld, M., Sobotka, R., Andresen, E., Falkenberg, G., y Küpper, H. (2016). Analysis of sublethal arsenic toxicity to *Ceratophyllum demersum*: subcellular distribution of arsenic and inhibition of chlorophyll biosynthesis. *Journal of experimental botany*, 67(15), 4639-4646.
- Montaser, A. (1998). *Inductively coupled plasma mass spectrometry*. John Wiley & Sons - VCH, New York.
- Moreno-Jiménez, E., Vázquez, S., Carpena-Ruiz, R. O., Esteban, E., y Peñalosa, J. M. (2011). Using Mediterranean shrubs for the phytoremediation of a soil impacted by pyritic wastes in Southern Spain: a field experiment. *Journal of environmental management*, 92(6), 1584-1590.
- Najeeb, U., Jilani, G., Ali, S., Sarwar, M., Xu, L., y Zhou, W. (2011). Insights into cadmium induced physiological and ultra-structural disorders in *Juncus effusus* L. and its remediation through exogenous citric acid. *Journal of Hazardous Materials*, 186(1), 565-574.
- Oven, M., Page, J. E., Zenk, M. H., y Kutchan, T. M. (2002). Molecular characterization of the homophytochelatase synthase of soybean *Glycine max*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4747-4754.
- Pavlík, M., Pavlíková, D., Staszková, L., Neuberger, M., Kaliszová, R., Száková, J., & Tlustoš, P. (2010). The effect of arsenic contamination on amino acids metabolism in *Spinacia oleracea* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73(6), 1309-1313.
- Pérez-Esteban, J., Caballero-Mejía, B., Sanchís, I., y Moliner, A. (2018). Utilización de nanopartículas de magnetita en la descontaminación de suelos afectados por actividad minera. *VIII Congreso Ibérico de las Ciencias del Suelo CICS 2018*.
- Quevauviller, P., Lachica, M., Barahona, E., Gomez, A., Rauret, G., Ure, A., & Muntau, H. (1998). Certified reference material for the quality control of EDTA- and DTPA-extractable trace metal contents in calcareous soil (CRM 600). *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 360(5), 505-511.
- Rausser, W.E. (1991). Cadmium-binding peptides from plants. *Methods in Enzymology*, 205, 319-333.
- Rodrigues, J. (2016). The soil and ground water remediation with zerovalent iron nanoparticles. *Procedia engineering*, 143, 1268-1275.
- Shakoor, M. B., Ali, S., Hameed, A., Farid, M., Hussain, S., Yasmeen, T. et al. (2014). Citric acid improves lead (Pb) phytoextraction in *Brassica napus* L. by mitigating Pb-induced morphological and biochemical damages. *Ecotoxicology and environmental safety*, 109, 38-47.
- Sierra, C., Menéndez-Aguado, J. M., Afif, E., Carrero, M., & Gallego, J. R. (2011). Feasibility study on the use of soil washing to remediate the As–Hg contamination at an ancient mining and metallurgy area. *Journal of hazardous materials*, 196, 93-100.

- Shahid, M., Dumat, C., Pourrut, B., Sabir, M., y Pinelli, E. (2014). Assessing the effect of metal speciation on lead toxicity to Vicia faba pigment contents. *Journal of Geochemical Exploration*, 144, 290-297.
- Shi G.R., Liu C.F., Cai Q.S, Liu Q.Q., y Hou C.P. (2010). Cadmium accumulation and tolerance of two safflower cultivars in relation to photosynthesis and antioxidative enzymes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85, 256-263.
- Shri, M., Kumar, S., Chakrabarty, D., Trivedi, P. K., Mallick, S., Misra, P. et al. (2009). Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(4), 1102-1110.
- Singh, A., y Agrawal, M. (2011). Management of heavy metal contaminated soil by using organic and inorganic fertilizers: effect on plant performance. *IIOAB J*, 2(1), 22-30.
- Singh, H. P., Batish, D. R., Kohli, R. K., & Arora, K. (2007). Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolusaureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. *Plant Growth Regulation*, 53(1), 65-73.
- Singh, N., Ma, L. Q., Srivastava, M., y Rathinasabapathi, B. (2006). Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris sensiformis* L. *Plant Science*, 170(2), 274-282.
- Sun, R., Zhou, Q., y Wei, S. (2011). Cadmium accumulation in relation to organic acids and nonprotein thiols in leaves of the recently found Cd hyperaccumulator *Rorippa globosa* and the Cd-accumulating plant *Rorippa islandica*. *Journal of plant growth regulation*, 30(1), 83-91.
- Smedley, P. L., y Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied geochemistry*, 17(5), 517-568.
- Stoeva, N., Berova, M., y Zlatev, Z. (2005). Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. *Biologia Plantarum*, 49(2), 293-296.
- Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzałka, K., y Prasad, M. N. V. (2013). Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta physiologiae plantarum*, 35(4), 985-999.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant physiology and development* (Sixth edition). Sinauer Assoc. Inc.
- Van der Ent, A., Baker, A. J., Reeves, R. D., Pollard, A. J., y Schat, H. (2013). Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: facts and fiction. *Plant and Soil*, 362(1-2), 319-334.
- Van Herreweghe, S., Swennen, R., Vandecasteele, C., y Cappuyns, V. (2003). Solid phase speciation of arsenic by sequential extraction in standard reference materials and industrially contaminated soil samples. *Environmental pollution*, 122(3), 323-342.
- Wear, J. I., y Evans, C. E. (1968). Relationship of Zinc Uptake by Corn and Sorghum to Soil Zinc Measured by Three Extractants 1. *Soil Science Society of America Journal*, 32(4), 543-546.
- White, P. J., y Brown, P. H. (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of botany*, 105(7), 1073-1080.

- Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76(2), 167-179.
- Zaheer, I. E., Ali, S., Rizwan, M., Farid, M., Shakoor, M. B., Gill, R. A. et al. (2015). Citric acid assisted phytoremediation of copper by *Brassica napus* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, 120, 310-317.
- Zeng, F., Ali, S., Zhang, H., Ouyang, Y., Qiu, B., Wu, F., & Zhang, G. (2011). The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. *Environmental pollution*, 159(1), 84-91.
- Zhang, M., Wang, Y., Zhao, D., & Pan, G. (2010). Immobilization of arsenic in soils by stabilized nanoscale zero-valent iron, iron sulfide (FeS), and magnetite (Fe₃ O₄) particles. *Chinese Science Bulletin*, 55(4-5), 365-372.

<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/arsenic> consultado el 5/6/2019