



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



MCIA
Maestría en Ciencias
en Ingeniería Ambiental
UMSNH

Facultad de Ingeniería Química

Facultad de Ingeniería Civil

Facultad de Biología

Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Ambiental

Tesis

**Nanopartículas de carbono en la fitorremediación de suelo
contaminado con cobre, por *Brassica juncea***

Que presenta

IBt. Iris Eunice Serrato Mireles

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Ingeniería Ambiental

Co-Director de Tesis:

Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez

Director de Tesis:

**Dra. Nabanita Dasgupta
Schubert**

Morelia, Michoacán, Febrero de 2018

Este trabajo fue dirigido por la Dra. Nabanita Dasgupta Schubert y el Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez en el laboratorio de Biofísicoquímica y Estudios de Radiación (LBER) de la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas (FCFM) y el laboratorio planta suelo microorganismo del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB) y el apoyo de la Dra. Maria de Jesus Alcalá en el laboratorio de Edafología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.



Agradecimientos

A la Dra. Nabanita Dasgupta Schubert, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y la confianza que depositó en mí.

Al Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez por su tiempo, paciencia y gran apoyo. Por ser una persona admirable y permitirme tener un crecimiento personal y profesional, gracias a sus consejos y disciplina.

A la Dra. Maria De Jesus Alcalá por permitirme realizar los análisis físicos y químicos de suelo, en el laboratorio de EDAFOLOGÍA de la UMSNH y todas las enseñanzas otorgadas.

Al Dr. Salomón Eduardo Borjas García por su colaboración en el presente proyecto, así como su tiempo y enseñanzas.

A la Dra. Lada Domratheva Lvova y al Dr. Miguel Martinez Trujillo, por su tiempo, observaciones y recomendaciones a lo largo del proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el recurso otorgado.

A la coordinación de la MCIA a cargo de la Dra. Yazmín Carreón Abud y la secretaria Ana Luisa Sosa.

Y a mis compañeros y amigos Ing. Nancy Rojas, IBt. Marisol Orozco, Biol. Selene Valencia y al Biol. Julio Gómez.

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi motor de vida, mi hija Camila Sarahí Domínguez Serrato, por su gran amor e inocencia, de quien aprendo día con día.

A mi familia, en especial a mi esposo Reynaldo por su amor, por siempre darme el apoyo necesario y creer en mí. A mis padres la Sra. Carmelina Mireles y el Sr. Conrado Serrato por su apoyo, confianza y sus palabras de aliento.



Contenido

Contenido.....	1
Índice de figuras	3
Lista de Acrónimos	5
Resumen.....	7
Abstract	9
I. Introducción	11
1.1. El Cu (II)	12
1.2. Contaminación de suelo por fungicidas a base de Cu (II)	13
1.2.1. Movilización y transporte de Cu (II) del suelo hacia HAM.....	15
1.2.1.1. Solubilización de Cu (II) en el suelo	15
1.2.1.2. Vía de absorción de Cu (II) en la raíz	15
1.2.1.3. Transporte de Cu (II) hacia las hojas	16
1.3. Fitorremediación	17
1.3.1. Plantas hiperacumuladoras de Cu (II)	18
1.3.1.1. Desintoxicación por quelación y secuestro del Cu (II) en plantas	19
1.4. Nanotubos de carbono.....	20
1.4.1. Nanotubos de carbono de pared múltiple	20
1.4.2. Interacción de nanotubos de carbono de pared múltiple con plantas.....	22
1.4.3. Normatividad de los nanotubos de carbono de pared múltiple.....	24
II. Antecedentes	25
III. Justificación	25
IV. Hipótesis.....	26
V. Objetivo	26
VI. Materiales y métodos	27
6.1. Propiedades físico-químicas de suelo para crecimiento de <i>Brassica juncea</i>	27
6.2. Retención de humedad por nanotubos de carbono de pared múltiple y carbón activado en suelo contaminado con Cu (II).....	28
6.3. Semilla de <i>B. juncea</i> germinada en suelo no impactado	29
6.3.1. <i>B. juncea</i> trasplantada en suelo contaminado con Cu (II).....	29
6.3.2. Remoción de <i>B. juncea</i> del suelo fitorremediado	30
6.4. Recolección de lixiviados de suelo fitorremediado.....	31
6.5. Análisis físico-químicos de suelo utilizado para fitorremediación por <i>B. juncea</i>	31
Serrato-Mireles I. E	1



6.6.	Determinación de concentración del Cu (II) en lixiviados de suelo y biomasa de <i>B. juncea</i>	31
6.6.1.	Concentración de Cu (II) lixiviado del suelo fitorremediado.....	31
6.6.2.	Cuantificación de Cu (II) en biomasa de <i>B. juncea</i> después del periodo de FITO	32
6.6.3.	Índices de FITO	32
6.6.3.1.	Masa del cobre fitoextraída por la parte aérea y raíz de <i>B. juncea</i>	33
6.6.3.2.	Factor de biodisponibilidad.....	33
6.6.3.3.	Factor de Bioconcentración (FBc)	33
6.6.3.4.	Factor de Translocación	34
6.7.	Determinación del efecto que causan los NTCPM y CA en tejidos de <i>B. juncea</i>	35
6.7.1.	Cuantificación de pigmento clorofila a y b en hojas de <i>B. juncea</i>	35
6.7.2.	Microscopia de fuerza atómica en ápice de raíz de <i>B. juncea</i>	35
6.7.3.	Microscopia electrónica de barrido en ápice de raíz de <i>B. juncea</i>	36
VII.	Resultados y discusión	37
VIII.	Conclusión	61
IX.	Bibliografía	62
	Anexo I. Análisis de fluorescencia de rayos X de reflexión total TXRF.....	73
	Anexo II. Caracterización físico-química de suelo para crecimiento de <i>B. juncea</i>	76
	Anexo III. Retención de humedad en suelo contaminado por cobre (II) por nanotubos de carbono de pared múltiple y carbón activado.	78
	Anexo IV Análisis físico-químicos de suelo utilizado para fitorremediación por <i>B. juncea</i>	80



Índice de figuras

Introducción

Figura 1. Proceso implicado en la fitoestabilización y fitoextracción de Cu (II) en suelo..... 18

Figura 2. Esquema de la adsorción y oxidación de cobre por nanotubos de carbono de pared múltiple.22

Metodología

Figura 1. Diagrama del diseño experimental para determinar el efecto de los NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado con Cu (II) por *B. juncea*.27

Figura 2. Retención de humedad por NTCPM y CA en suelo.....28

Resultados

Figura 1. Fotografías del crecimiento de la planta *Brassica juncea* (“Garnet Giant”) en suelo tratado con concentraciones variables de Cu 0 (control) - 10,000 mg/Kg y tratamiento simultáneo con/sin NTCPM o CA cada uno a la concentración de 20 mg / Kg. Las purzas de NTCPM y CA fueron $\geq 95\%$37

Figura 2. Longitud de raíz, altura y ancho de dosel de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado Cu (II).40

Figura 3. Peso fresco parte aérea y radicular de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado con Cu (II).42

Figura 4. Peso seco parte aérea y raíz de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado con Cu (II).44

Figura 5. Concentración de Cu (II) en lixiviados del suelo fitorremediado mediante *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA.45

Figura 6. Concentración de Cu (II) en parte aérea y radicular de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo impactado.49

Figura 7. Concentración clorofila a y b en hojas verdaderas de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado con Cu (II).53

Figura 8. Raíz de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado con Cu (II).54

Figura 9. Rigidez de la pared del ápice de raíz de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en fitorremediación de suelo impactado por Cu (II).56

Figura 10. Dureza de la pared del ápice de raíz de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en fitorremediación de suelo impactado por Cu (II).56

Figura 11. Elasticidad de la pared del ápice de raíz de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en fitorremediación de suelo impactado por Cu (II).57

Figura 12. Imagen en 3D de ápice de raíz de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado con Cu (II).58

Figura 13. Ápice de raíz de *Brassica juncea* observada a 10 μ m potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado con Cu (II).59



Índice de tablas

Introducción

Tabla 1. Acumulación de Cu (II) en suelo causada por el uso de fungicidas.....	11
--	----

Metodología

Tabla 1. Características generales de Sigma Aldrich para NTCPM y CA.....	27
--	----

Tabla 2. Diseño experimental de la fitorremediación de un suelo contaminado con Cu (II) mediante <i>Brassica juncea</i> potenciada con NTCPM y CA.	27
---	----

Resultados

Tabla 1. Masa de Cu (II) extraído por <i>Brassica juncea</i> potenciada con NTCPM y CA de suelo contaminado.....	50
--	----

Tabla 2. Factor de translocación y de bioconcentración de Cu (II) en <i>Brassica juncea</i> potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo impactado.....	51
--	----

Tabla 3. Factor de biodisponibilidad de Cu (II) en el lixiviado del suelo en la fitorremediación mediante <i>Brassica juncea</i> potenciada con NTCPM y CA.....	52
---	----



Lista de Acrónimos

AFM microscopio de fuerza atómica

BI bases intercambiables

B. juncea la planta *Brassica juncea*

B_p biomasa seca de la planta

$B_{p,a}$ biomasa seca de la parte aérea de la planta

$B_{p,r}$ biomasa seca de raíz de la planta

$B_{p,T}$ biomasa seca total de la planta ($B_{p,r} + B_{p,a}$)

CA carbón activado

CIC capacidad de intercambio catiónico

C_{lix} concentración del metal en el lixiviado

CO carbono orgánico

C_p concentración del metal en la planta

$C_{p,a}$ concentración del metal en la parte aérea de la planta

$C_{p,r}$ concentración del metal en la raíz de la planta

$C_{p,T}$ concentración del metal en la biomasa total de la planta (raíz + parte aérea)

C_s concentración de metal en el suelo

C/S con surfactante o con detergente

Cu (II) cobre

Fbc factor de bioconcentración

FITO Fitorremediación

FTI factor de translocación

HAM hiperacumuladoras de metal

MEB microscopía electrónica de barrido



MO materia orgánica

MP metales pesados

FBd factor de biodisponibilidad

FTL factor de traslocación

M_p masa de metal en la planta

$M_{p,a}$ masa del metal en la parte aérea de la planta

$M_{p,r}$ masa del metal en la raíz de la planta

$M_{p,T}$ masa del metal en la planta total ($M_{p,r} + M_{p,a}$)

NTC nanotubos de carbono

NTCPM nanotubos de carbono de pared múltiple

S/S sin surfactante o sin detergente



Resumen

El Cu (II) (cobre) es un microelemento esencial para diversas funciones en plantas, en altas concentraciones ejerce toxicidad. El origen antropogénico de Cu (II) en suelo es dado principalmente por el uso excesivo de fungicidas para la protección de cultivos agrícolas. Una alternativa para enfrentar la problemática de suelo impactado con Cu (II) es la fitorremediación (FITO), que emplea plantas acumuladoras de metal que absorben el metal y lo almacenan en sus raíces o partes aéreas. Una planta hiperacumuladora (HAM) del Cu (II) es *Brassica juncea*. Así mismo la aplicación de nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) que se sabe poseen propiedades excepcionales en redox y de adsorción. Es aceptable que la adición de NTCPM en suelo contaminados con Cu (II) aumente la capacidad FITO de *B. juncea* mediante el aumento de la biodisponibilidad del Cu (II) y su adsorción en la raíz. Esta hipótesis y la escasa investigación de FITO de suelo usando NTCPM se planteó, emplear NTCPM para potenciar a *B. juncea* como HAM en la FITO de un suelo contaminado con Cu (II). El objetivo de esta investigación fue mejorar la FITO de un suelo contaminado con Cu (II) mediante *B. juncea* potenciada con NTCPM 95% de pureza. Para entender el papel desempeñado por la estructura del carbono en forma polimérica, se utilizó carbón activado (CA) con fines comparativos. Para esto: a) se utilizó a *B. juncea* en suelo franco con 20mg.Kg⁻¹ de NTCPM y CA, contaminado a diferentes concentraciones de Cu (II); b) después de cuatro semanas se midió índice de crecimiento, la biomasa y clorofila **a** y **b**; c) La FITO se determinó por concentración de Cu (II) en biomasa de *B. juncea* y en lixiviados del suelo, estos se analizaron por la espectrometría de reflexión total de rayos X (TXRF) y espectrofotómetro de absorción atómica respectivamente (AAS).

Los resultados mostraron que un suelo impactado con concentraciones ≤ 1000 mg/Kg de Cu (II) en suelo no afectó el crecimiento de *B. juncea*, a 1000 mg/Kg de Cu (II) presentó menor crecimiento respecto a *B. juncea* sin Cu (II); con la aplicación de NTCPM para potenciar a *B. juncea*, se mostró una mejor respuesta en el crecimiento y biomasa, así como la disminución de Cu (II) en lixiviados de suelo; se observó que la mayor concentración de Cu (II) en biomasa de *B. juncea* fue con CA,



aumentando $\geq 60\%$ que con NTCPM; se observó que la clorofila **a** disminuyó en todos los tratamientos con respecto al control, pero por el uso de NTCPM y CA se redujo el estrés causado por Cu (II). En conclusión, en la FITO de suelo contaminado con Cu (II) mediante la aplicación de NTCPM y CA fue mejorada. Los NTCPM y CA aumentaron la capacidad hiperacumulativa de *B. juncea* principalmente a través de una mayor cantidad la adsorción de Cu (II) en la raíz.

Palabras clave: cobre, alótropos de carbono, nanopartículas de carbono, carbón activado, fitorremediación, *Brassica juncea*, Garnet Giant.



Abstract

Copper (Cu II) is an essential microelement for different biological functions in plants, but it is toxic at high concentrations. Soil copper has an anthropogenic origin due to the excessive use of fungicides to protect crops. One of the possible approaches to mitigate the impact of soil copper pollution is phytoremediation (PHYTO), It makes use of metal hyper accumulating plants that greatly absorb the metal and transfer it to its aerial parts. Multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) are capable of high surface adsorption and of enhancing catalysis through their ability to favorably affect redox and acid-base reactions, among others. It is surmised that addition of MWCNT in soil contaminated with Cu (II) increases the PHYTO capacity of *B. juncea* by increasing the bioavailability of Cu (II) and thus its adsorption by the plant root. This hypothesis having been poorly studied, we aimed to test the effect of the MWCNT on the capacity of *B. juncea* to extract Cu from polluted soil and thereby ameliorate it. The objective of this research was to improve the PHYTO of a soil contaminated with Cu (II) by *B. juncea* potentiated with MWCNT of 95% purity. To understand the role played by the carbon structure in polymeric form, activated carbon (AC) was used for comparative purposes. To do so we planted *B. juncea* in soil polluted with different concentrations of copper and added 20mg.kg⁻¹ of MWCNT or AC. After four weeks we measured plant growth indices, the biomass and chlorophyll **a** and **b**. Phytoremediation was determined by measuring copper concentration in the dry biomass of *B. juncea* as well as in soil leachates through Total Reflection X-Ray Spectrometry (TXRF) and Atomic Absorption Spectrometry (AAS), respectively.

The results show that the growth of *B. juncea* is not affected when the plant is in soil containing <1000 mg/Kg copper. In contrast, when in soil containing 1000 mg/Kg of copper, *B. juncea* grows less than in copper-free soil. After addition of the MWCNT, *B. juncea* showed a better response in terms of growth and biomass, and the soil leachate showed a decrease in the copper concentration. The highest concentration of copper in biomass was observed with AC, while it was augmented to ≥60% with the MWCNT. Chlorophyll **a** diminished with all treatments with respect to the control, but MWCNT and AC reduced copper stress. In conclusion, the phytoremediation of



copper polluted soil is improved by the addition of MWCNT and AC, which increased the capacity of *B. juncea* to absorb copper through its roots. The MWCNT and AC increased the hyperaccumulative capacity of *B. juncea* mainly through a greater amount of Cu (II) adsorption in the root.

Keywords: copper, carbon allotropes, carbon nanotubes, activated carbon, phytoremediation, *Brassica juncea*, garnetgiant.



I. Introducción

El Cu (II) (cobre) es un microelemento esencial para la vida de las plantas debido a que es requerido para diversas funciones en plantas; tales como cofactor en la fotosíntesis y la respiración, además de ser necesario para la formación de lignina y paredes celulares, por mencionar algunos (Peñarrubia *et al.*, 2010), pero de acuerdo a la US EPA (Environmental Protection Agency) concentraciones de 100 a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en soluciones de nutrientes han sido encontradas tóxicas para un gran número de plantas. La toxicidad por Cu (II) en las plantas causa la inactivación de su función biológica, lo que conlleva a la inhibición del crecimiento en raíces y brotes, clorosis, necrosis, la nula interacción con otros iones esenciales, entre otros (Pasternak *et al.*, 2005; Castillo, 2011).

En las plantas, la concentración de Cu (II) depende de la cantidad en el suelo. El suelo es un ambiente físico que suministra minerales esenciales y agua. Sin embargo, la alta concentración de Cu (II) se debe a actividades antrópicas; en México, es por el empleo excesivo de agroquímicos, un ejemplo son los plaguicidas de los cuales muchos de los que se utilizan, han sido prohibidos en otros países por su toxicidad, ya que causan efectos negativos sobre los ecosistemas terrestres impactados (Trejo, 2002; Ginocchio y Narváez, 2002). Los fungicidas están hechos a base de compuestos del cobre Cu (I) y Cu (II) como es el caso del $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ (oxicloruro de cobre), que es una sustancia sólida y cristalina que tiene un color verdoso, se extrae de forma natural de yacimientos, y aunque está dentro del marco regulatorio en México para su manejo en la agricultura, no se tiene una norma oficial que regule cuantitativamente el producto, para evitar el uso excesivo (COFEPRIS, 2006). Este uso inmoderado de fungicidas en la agricultura ha provocado una alta concentración de Cu (II) en el suelo (Norkus *et al.*, 2002).

Una alternativa para resolver la problemática de suelos contaminados con Cu (II), es la fitorremediación (FITO), que emplea plantas hiperacumuladoras de metal (HAM) como *Brassica juncea*. Las HAM transportan el Cu (II) del suelo a través de la raíz hacia la parte aérea, lo que permite posteriormente que *B. juncea* realice la



bioacumulación de Cu (II) en sus tejidos y ser removida del suelo fitorremediado o la fitoestabilización al inmovilizar el Cu (II) del suelo a través de su absorción y/o adsorción en las raíces o bien, por precipitación en la zona de la rizosfera (Pilon-Smith, 2002; Prieto *et al.*, 2009).

Una de las limitaciones de las HAM es la escasa producción de biomasa, algunas técnicas como el uso de enmiendas para la fitoextracción pueden incrementar este contenido, ya que la cantidad del metal extraído en planta (M_p) es el producto de la biomasa seca de la planta (B_p) por la concentración del metal en los tejidos de la planta (C_p). Por lo tanto, se puede aumentar la eficacia de la FITO por el uso de enmiendas en el suelo que aumentan la C_p o la B_p o ambas (Robinson *et al.*, 1997; Barceló y Poschenrieder, 2003). Dentro de las enmiendas para potenciar a *B. juncea* en la fitoextracción de Cu (II) en suelos impactados, están los Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple (NTCPM). Por las propiedades redox y de adsorción que presentan, posiblemente pueden aumentar la biodisponibilidad del Cu (II) para ser captado por las raíces de *B. juncea* y trasladado a la parte aérea, o movilizado por el exceso de agua en el suelo (Mukherjee *et al.*, 2016).

1.1. El Cu (II)

El Cu (II) es considerado un micronutriente esencial para las plantas y juega un rol importante en la asimilación de CO_2 y la síntesis de Adenosine Triphosphate (ATP). Es un componente esencial de varias proteínas como la plastocianina que interviene en el sistema fotosintético y enzimas como la citocromo oxidasa involucrada en la cadena transportadora de electrones en las crestas mitocondriales (Yadav, 2010). Debido a su elevada afinidad electrónica, los cationes Cu (I) y Cu (II) son los iones más efectivos para la unión a moléculas orgánicas. El efecto de la toxicidad del Cu (II) es en gran parte sobre el crecimiento y la morfología de la raíz, porque tiende a acumularse en la raíz con baja translocación a la parte aérea, debido a esto el crecimiento de la raíz primaria se inhibe gradualmente conforme se aumenta la concentración del Cu (II) (MacFarlane y Burchett, 2002).



1.2. Contaminación de suelo por fungicidas a base de Cu (II)

Una de las principales problemáticas en el ámbito ambiental y agroindustrial es la pérdida o degradación de recursos naturales, por la afectación o modificación de las condiciones originales de estos recursos, y por contaminación, por la presencia superior a los valores límite permisibles de sustancias que tengan la capacidad generar alteraciones. De esta manera, se puede decir que un suelo está contaminado, cuando las características físicas, químicas o biológicas originales han sido alteradas, debido a la presencia de componentes de carácter peligroso para el suelo (Silva-Arroyave y Correa-Restrepo, 2009).

Entre la problemática de la contaminación de suelo es el uso de los fungicidas. La agricultura es la actividad que más emplea este tipo de compuestos, con el fin de mantener un control sobre las plagas que afectan los cultivos, está dada fundamentalmente por aplicaciones directas en los cultivos agrícolas, lavado inadecuado de tanques contenedores, filtraciones en los depósitos de almacenamiento y residuos descargados y dispuestos en el suelo, derrames accidentales y el uso inadecuado de los mismos por parte de la población. El impacto de los fungicidas provenientes de los compuestos del Cu (II) en el ambiente, se ha constatado con el aumento de la cantidad de Cu (II) en el suelo, por consecuencia de los tratamientos fungicidas en la agricultura, este aumento se ha llegado a encontrar hasta 50 veces más respecto al nivel existente en suelo (Pietrzak y McPhail, 2004). El grado de lixiviación (movimiento de las sustancias a través del suelo) depende de la solubilidad del Cu (II) en agua, de su naturaleza química y del valor del pH del suelo, que se favorece por la capacidad de adsorción de este, esto varía principalmente por el porcentaje de arcillas, arenas y limos presentes en el, por las altas temperaturas y por la precipitación pluvial (Puerto-Rodríguez, 2014).

El efecto oligodinámico de los fungicidas es actuar directamente sobre los organismos fúngicos afectando los procesos biológicos vitales en el ciclo de vida de un fitopatógeno pueden modificar los tejidos de la planta para ejercer su efecto. La mayoría de los fungicidas están constituidos por $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ (oxicloruro de cobre)



que afecta la proliferación de esporas, formando una barrera sobre la superficie de la planta, debido a que el cobre entra en contacto con las esporas impidiendo su desarrollo (Melgarejo-García y Avella-Portilla, 2011).

La contaminación de suelo por Cu (II) comenzó desde que el hombre aplicó fungicidas cúpricos. En la tabla 1, se presentan algunos ejemplos de acumulación de Cu (II) en algunos países del mundo en los años 70s causada por el uso de productos agroquímicos cúpricos.

Tabla 1. Acumulación de Cu (II) en suelo causada por el uso de fungicidas en la agricultura.

Cultivo	País	Acumulación de Cu (II) kg/ha/año	Año
Uva	Francia	15-50	1970
Uva	Estados Unidos	10	1961
Lúpulo	Alemania	37.5	1972
Manzana	Reino unido	25	1961
Plátano	Costa Rica	100	1976

Cordero y Ramírez, 1979.

Sin embargo a pesar de que los agroquímicos a base de Cu (II) fueron regulados en Europa, en México se siguen utilizando sin precaución tanto para los ambientes terrestres, como para la salud humana; un ejemplo documentado es en San Luis Potosí por Sarabía-Melendez *et al*, 2011, quienes realizaron un estudio de concentración de metales en suelo, agua y cultivos, donde encontraron que el Cu (II) en suelo de 20 muestras es de 49.26-119.22mg.Kg⁻¹. En México la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004 no sugiere los límites máximos permisibles para Cu (II), pero los límites que precisa la EPA es de 1.3mg.Kg⁻¹ (Peer *et al*, 2005).



1.2.1. Movilización y transporte de Cu (II) del suelo hacia HAM

“La planta absorbe los metales en una serie de pasos, uno o más de los cuales pueden ser aumentados en hiperacumuladoras” (Dasgupta-Schubert *et al.*, 2008).

1.2.1.1. Solubilización de Cu (II) en el suelo

El suelo es la capa más superficial de la corteza terrestre, abarca el primer metro de profundidad, en la cual ocurren cambios físicos, químicos y biológicos, es importante porque es sobre el cual se desarrolla la vida vegetal y animal (INEGI, 2004).

El Cu (II) existe como compuesto insoluble en agua limitando la matriz del suelo. La mayor cantidad de Cu (II) biodisponible se encuentra únicamente cuando están en forma de iones en un medio ácido, o como complejos o quelatos formados con materia orgánica del medio acumulados en el primer horizonte del suelo quedando accesible a las raíces. Las propiedades físico-químicas del suelo juegan un papel importante en reducir o aumentar la biodisponibilidad y toxicidad del Cu (II), esto es controlado por factores como el pH, textura, cantidad del metal, capacidad de intercambio de los cationes, potencial redox del medio, así como también por la secreción de compuestos de la raíz de la planta (Ghosh y Singh, 2005; Dasgupta-Schubert *et al.*, 2008).

1.2.1.2. Vía de absorción de Cu (II) en la raíz

Una vez movilizado, el Cu (II) es capturado por la planta mediante las raíces. El movimiento de los iones a lo largo de la planta está impulsado por el gradiente de potencial hídrico que existe entre la rizosfera y la atmósfera, y transcurre a través de dos vías acuosas paralelas.

- **Vía apoplástica.** Los iones pueden atravesar radialmente la raíz por el apoplasto hasta llegar a la endodermis, donde la banda de Caspari restringe el movimiento apoplástico de solutos, obligándolos a continuar su camino



hacia el cilindro vascular (haces xilemáticos) a través del simplasto. Sin embargo, este obstáculo se vuelve débil en al menos dos puntos: en el ápice, donde la banda de Caspari no desarrollada permite el transporte apoplástico de algunos iones; y en las zonas basales, donde emergen raíces laterales desde el periciclo y se rompe transitoriamente la continuidad estructural de la endodermis (Andres-Colas, 2008).

- **Vía simplástica.** Los nutrientes que cruzan la membrana plasmática, a través de proteínas especializadas en el transporte de nutrientes, pasan a formar parte del simplasto. Una vez en su interior, aunque han de cruzar otra vez la membrana, no existe ningún obstáculo que impida el camino de los nutrientes hacia los haces xilemáticos. Después de la entrada de los nutrientes al simplasto, los iones pueden quedar secuestrados dentro de las células de la raíz o seguir la vía simplástica hasta los haces xilemáticos para transportarse por las partes aéreas de la planta (MacFarlane y Burchett, 2002; Wolterbeek y Van Der Meer, 2002).

La distribución o la inmovilización de los nutrientes en ambas vías depende del tipo de ligando químico al que se coordinan (Andres-Colas, 2008).

1.2.1.3. Transporte de Cu (II) hacia las hojas

Posterior a la absorción del Cu (II) en el simplasto de la raíz existen tres procesos que gobiernan el movimiento de metales hacia el xilema; dentro de las células de la raíz, transporte simplástico dentro del conducto central y la liberación dentro del xilema. El transporte de iones dentro del xilema es generalmente un proceso controlado mediado por proteínas transportadoras de membrana (Gaymard *et al.*, 1998; Wintz *et al.*, 2003).

En el apoplasto el Cu (II) llega a las hojas mediante la savia del xilema donde al descargarse o incorporarse a las células de la hoja debe cruzar varias membranas celulares. Diferentes HAM almacenan el MP en diversos tipos de células de la hoja. Los transportadores median la absorción dentro del simplasto y la distribución dentro de la hoja se realiza mediante el apoplasto o el simplasto (Karley *et al.*, 2000;



Dasgupta-Schubert *et al.*, 2008). El tráfico de MP que se produce dentro de cada célula de la planta, mantiene la concentración dentro de los intervalos fisiológicos específicos en cada órgano y asegura la entrega de MP a las proteínas que los requieran. En condiciones de exceso de Cu (II), este se acumula en la base de los tricomas y en las vacuolas de células de la epidermis de la hoja unido a diversos quelantes endógenos tal como ácidos orgánicos, proteínas y pirofosfato. Esta localización minimiza el efecto tóxico del Cu (II) manteniéndolo lo más lejos posible de las células mesófilas, donde se realiza la fotosíntesis (Peer *et al.* 2005).

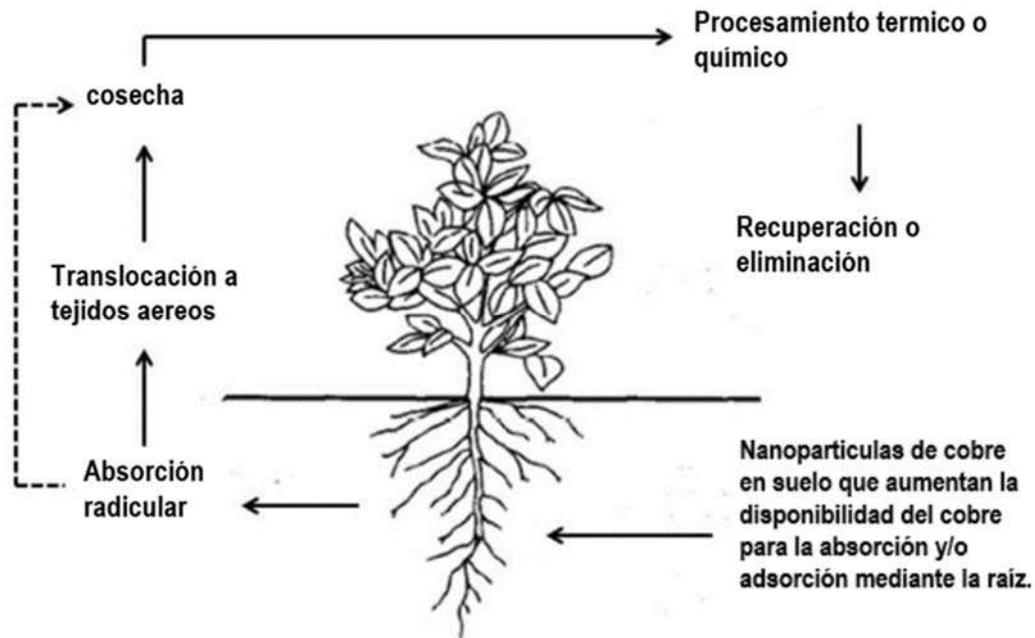
1.3. Fitorremediación

La FITO es una biotecnología ambiental sustentable y de bajo costo para la rehabilitación de ambientes contaminados por compuestos antropogénicos (Delgadillo-López, *et al.*, 2011). La FITO utiliza plantas para extraer, transferir, estabilizar y/o concentrar contaminantes orgánicos e inorgánicos, sin el uso de reactivos químicos peligrosos (Núñez *et al.*, 2004). Sin embargo la tecnología de FITO es altamente importante para los contaminantes inorgánicos porque solamente las plantas pueden remover MP (metales pesados) y almacenarlo dentro de la planta para su remoción. Remediar un suelo contaminado por MP, utiliza tratamientos químicos de alto costo que van desde un 50% hasta un 80% más costosos que un tratamiento por FITO y causan daños secundarios en el ambiente (Movahed y Maeiyat, 2009). Dos procesos de FITO relevantes en este estudio son la fitoextracción y la fitoestabilización. En el caso de fitoextracción, las plantas acumulan metales en los tallos y hojas, para posteriormente removerlas del sitio afectado (Figura 1). En el caso de fitoestabilización permite inmovilizar contaminantes en el suelo a través de su absorción y acumulación en las raíces o bien, por precipitación en la zona de la rizosfera. Este proceso reduce la movilidad de los contaminantes y evita su migración a las aguas subterráneas (Delgadillo-López *et al.*, 2011; Marrero-Coto *et al.*, 2012).



La FITO se divide en dos clases: continua e inducida, la primera requiere plantas que acumulan altos niveles del metal durante su vida por lo que se les llama HAM. En la segunda, los vegetales segregan agentes quelantes al suelo para atrapar los metales pesados (Sánchez-Yáñez, 2011).

Figura 1. Proceso implicado en la fitoestabilización y fitoextracción de Cu (II) en suelo.



(Imagen tomada de Cunningham, 1995)

1.3.1. Plantas hiperacumuladoras de Cu (II)

Las HAM absorben metales del suelo donde se encuentran, de acuerdo a la especie vegetal, de las propiedades, concentración de metales pesados del suelo (Barceló *et al.*, 2003). La investigación bioquímica en HAM sugiere que el efecto dominante del metal es un estrés oxidativo. La planta desarrolla tolerancia o resistencia a este estrés produciendo elevadas cantidades de químicos desintoxicantes como fitoquelatinas, metalotioneinas, glutatiónes y una variedad de ácidos orgánicos (Dasgupta-Schubert *et al.*, 2008).



La acumulación de Cu (II) en las plantas se realiza principalmente a través de la fitoestabilización donde el Cu (II) se almacena en las paredes celulares de las células de la raíz por el mecanismo de adsorción. Por el paso del tiempo el Cu (II) puede atravesar la membrana plasmática celular y entrar al citoplasma. Para protegerse a sí mismas de la toxicidad, las plantas desarrollan un mecanismo en el cual el Cu (II) entra en el citoplasma de las células y de inmediato es inactivado, complejoado o excluido (Sheoran *et al.*, 2011).

B. juncea es capaz de acumular más de 1000 mg.kg⁻¹ de Cu (II), sin afectar su crecimiento (Dasgupta-Schubert *et al.*, 2007 (b); Jara-Peña *et al.*, 2014), por lo que es utilizada en la FITO (Clemente *et al.*, 2006). Además se ha observado que *B. juncea* presenta rápido crecimiento, requiere de poca agua, además de presentar una elevada tasa de producción de biomasa (Baudh y Singh, 2012) a diferencia de otras HAM que generalmente tienen poca biomasa (Prieto-Méndez *et al.*, 2009).

1.3.1.1. Desintoxicación por quelación y secuestro del Cu (II) en plantas

En cualquier etapa durante su transporte dentro del tejido de la planta, el Cu (II) se puede desintoxicar por la conversión a un estado diferente de oxidación o por quelación. Puesto que el Cu (II) es en gran parte responsable del estrés oxidativo, es probable que las plantas HAM aumenten su producción antioxidante. Algunos de estos antioxidantes son conocidos como agentes quelantes de metales, de los cuales varios de ellos contienen en hiperacumuladoras el ligando tiol de manera que la ruta biosintética que implica sulfuro se considera muy importante para la hiperacumulación y para la fitorremediación. Finalmente el Cu (II) es almacenado en un número de posibles compartimentos celulares como las vacuolas o las paredes celulares, para evitar que interrumpa procesos esenciales de la planta (Dasgupta-Schubert *et al.*, 2008).



1.4. Nanotubos de carbono

Durante años los compuestos del carbón, en su mayoría carbón activado, han sido utilizados para la remoción de contaminantes ya que presentan una serie de propiedades que los hacen muy apropiados para su uso, debido al volumen y diámetro de poros y su distribución, que determinan la superficie activa y la difusión de reactivos y productos de una reacción (Carrasco-Marín, 2014). Recientemente el mayor interés está en el uso de nanopartículas de carbono, tales son los nanotubos de carbono (NTC) los cuales son moléculas poliméricas en forma de tubo compuestas de átomos de carbono, que se están utilizando en diversas aplicaciones en los campos de la biotecnología (Alam *et al.*, 2013, Maubert *et al.*, 2009). Los NTC son alótopos del carbono, como el diamante, el grafito o los fullerenos, su estructura puede ser procedente de una lámina de grafeno enrollada sobre sí misma (Andrade *et al.*, 2012). Los NTC fueron descubiertos en 1991 por Sumiolijima, quien trabajando en un microscopio electrónico, observó la existencia de moléculas tubulares en el hollín formado a partir de las descargas de arco eléctrico, empleando grafito. Los NTC obtenidos eran cilindros cerrados en los extremos por un casquete esférico con la estructura de un fullereno. Los NTC pueden ser abiertos o cerrados, en cuyo caso la estructura que cierra el NTC es similar a la mitad de un fullereno (Maubert *et al.*, 2009). Los orbitales atómicos de valencia de cada átomo de carbono tienen hibridación sp^2 , con lo cual se crea una nube continua de electrones π alrededor y dentro de los NTC y dicha estructura otorga propiedades eléctricas, químicas y mecánicas unidas al NTC.

1.4.1. Nanotubos de carbono de pared múltiple

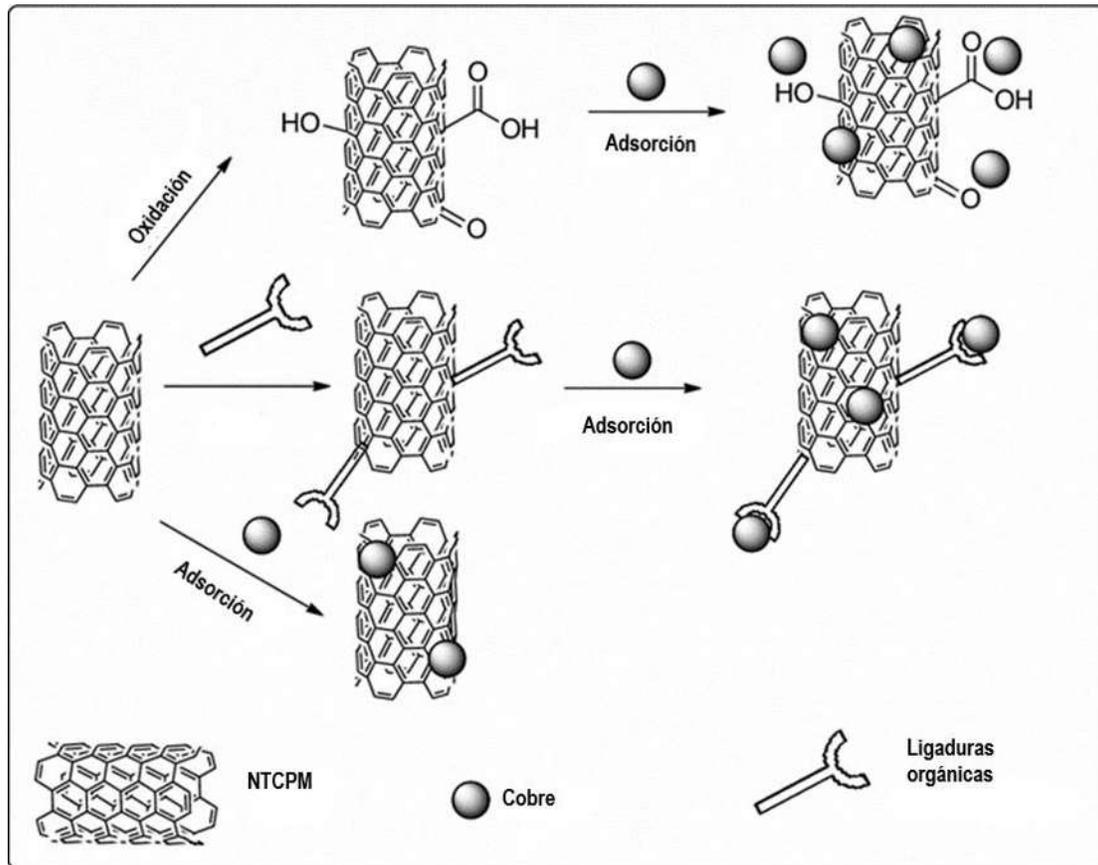
Los NTC también pueden ser de monocapa (de una sola capa/pared) o multicapa (varias capas/paredes concéntricas). Los más ampliamente disponibles y menos costosos son los nanotubos de carbono de pared múltiple (NTCPM) (Fernández, 2009). Ha habido una intensa actividad científica relacionada a la síntesis y propiedades de los NTCPM, así como también de sus aplicaciones en varias áreas de la ciencia. De hecho, los NTCPM representan uno de los mejores ejemplos de



las nanoestructuras, derivadas del progreso de la síntesis química de nuevos materiales. Es importante destacar, que los NTCPM poseen una composición química y configuración atómica sencilla, sin embargo, dentro los nanomateriales conocidos hasta hoy en día éstos exhiben, posiblemente, la más vasta diversidad y riqueza en relación a sus estructuras y propiedades intrínsecas. Es decir, existe un gran número de posibilidades en los tipos de moléculas de NTCPM que pueden ser obtenidos, ya que cada NTCPM puede presentar propiedades físicas distintas a otros NTCPM preparados en condiciones diferentes. En este sentido, la síntesis controlada de NTCPM abre interesantes oportunidades en el campo de la nanotecnología. Por ejemplo, la funcionalización química de los NTCPM permite su empleo como catalizadores, sensores moleculares y en sistemas biológicos la utilización como soportes catalíticos (Gadiou, 2005; Maubert *et al.*, 2009). Un proceso para catalizar una reacción oxidación-reducción (redox) comprende un agente oxidante y un compuesto oxidable o ya sea un agente reductor y un compuesto reductible; esto también refiere a un proceso para alterar el número de electrones de valencia en un NTCPM que comprende el ponerlo en contacto con un agente oxidante o un agente reductor, en este trabajo tal agente es el CUPRAVIT®; las ventajas del NTCPM como catalizador es su gran área superficial con relación a la de los reactantes redox, incrementando la velocidad de intercambio de electrones entre ambos (Mukherjee *et al.*, 2016). De igual manera algunas investigaciones indicaron que los NTCPM podrían atrapar contaminantes mediante redox o la adsorción ya que los nanoporos proporcionan una buena relación superficie/volumen, favoreciendo la superficie activa o el número de posibles sitios activos (figura 2). La cantidad y fortaleza de los grupos reactivos va a influir sobre el carácter hidrofílico-hidrofóbico y ácido-base de la superficie de los NTCPM (Rodríguez-Reinoso, 1998; Zheng y Diner, 2004). Sin embargo, uno de los mayores problemas de los NTCPM es su poca dispersión en los medios acuosos lo que ha dificultado ciertas aplicaciones, en especial las biológicas (Andrade *et al.*, 2012).



Figura 2. Esquema de la adsorción y oxidación de cobre por nanotubos de carbono de pared múltiple.



(Imagen tomada de Yu *et al.*, 2014)

1.4.2. Interacción de nanotubos de carbono de pared múltiple con plantas

En la última década se ha observado el efecto de las nanopartículas sobre la B_p y el transporte de los nutrientes dentro de las plantas. Entre las diversas nanopartículas, los NTCPM han destacado debido a sus posibles aplicaciones en la regulación del crecimiento de las plantas (Khot *et al.*, 2012). Es importante destacar que las investigaciones acerca de los NTCPM muestran efectos tanto como positivos como negativos en las especies de plantas, pero no en el medio de crecimiento (Mukherjee *et al.*, 2016). La primera evidencia de los efectos positivos



de los NTCPM en las plantas de cultivo fue informada por Khodakovskaya *et al.* 2009. Usando un rango de concentraciones de 10 a 40 mg.l⁻¹, ellos observaron que los NTCPM podían penetrar las capas de semillas de tomate, aumentando las tasas de germinación y estimulando el crecimiento en plántulas jóvenes. En un estudio más reciente, Khodakovskaya *et al.*, 2013 demostraron que los NTCPM, introducidos en el suelo a través del riego, pueden afectar el fenotipo de las plantas adultas. Sin embargo se ha observado que los NTCPM a concentraciones bajas conducen más agua hacia los tejidos de las plantas, mejoran la B_p y las concentraciones de elementos nutritivos en los tejidos de las plantas (Tiwari *et al.*, 2014; Martínez-Ballesta *et al.*, 2016; Mukherjee *et al.*, 2016). Por otro lado los efectos negativos muestran que los NTCPM causan daños a las plantas y disminuyen sus índices de crecimiento (Mukherjee *et al.*, 2016; Vithanage *et al.*, 2017). Tiwari *et al.*, (2014) mostraron que los NTCPM pueden mejorar los índices de crecimiento de la planta de maíz, además de mejorar el transporte de ciertos micronutrientes a la planta. Sin embargo la gran mayoría de estos trabajos fueron en medios *in vitro*, hidropónico y/o con NTCPM funcionalizados para el motivo de disolver los NTCPM y en tal manera sean biodisponibles.

La aplicación de NTCPM para ambientes contaminados estaba encaminado para la remoción de MP en aguas residuales, como hasta entonces utilizado carbón activado (CA), ya que son un nuevo tipo de adsorbentes de la familia del carbón, se comenzaron a utilizar debido a su capacidad excepcional para la eliminación de diversos contaminantes inorgánicos y orgánicos, y radionúcleidos a partir de grandes volúmenes de aguas residuales (Rubio *et al.*, 2015). Sin embargo en otro estudio realizado por Chen *et al.*, (2015) demostraron por primera vez que los NTCPM en suelo pueden actuar como adsorbentes de contaminantes, tales como pesticidas organoclorados, plaguicidas organofosforados, insecticidas piretroides, entre otros; además de que estos pueden transportarse a las plantas. También demostraron que los NTCPM a bajas concentraciones mejoraron la acumulación de estos contaminantes en el cultivo y mejoraron el crecimiento de raíz y aumento de biomasa, sin embargo su estudio no comprende los contaminantes por MP.



1.4.3. Normatividad de los nanotubos de carbono de pared múltiple

Toda nueva tecnología supone riesgos, y las nanotecnologías no son la excepción. El uso de NTCPM no se reduce al impacto que pueden ejercer en la salud humana, sino también en cómo afecta al medio ambiente, donde la acumulación de estas nanopartículas pueden causar estragos en los ecosistemas. Sin embargo, no se cuenta con la suficiente información para mediar el uso de las nanotecnologías.

En México la normatividad relacionada con el uso y aplicación de NTCPM está contemplada en la norma **NMX-R-10929-SCFI-2014** de Nanotecnologías- Caracterización de muestras de nanotubos de carbono de múltiples capas (NTCMC). Esta norma mexicana identifica las propiedades físicas y químicas básicas de los NTCPM y el contenido de impurezas que caracterizan las muestras de NTCPM; muestra los principales métodos de medición disponibles para la industria en la determinación de estos parámetros. También ofrece una base firme para la investigación, desarrollo y comercialización de estos materiales, pero no especifica el uso cuantitativo o máximos y mínimos para el uso en biotecnologías, como es la remediación de ambientes impactados.

Por su parte la agencia de protección al ambiente de los Estados Unidos (EPA) busca facilitar la innovación y garantizar la seguridad de las sustancias, mediante la recolección de información de las sustancias producidas a nanoescala por los productores y procesadores. La EPA no pretende concluir que los materiales a nanoescala causan daño a la salud humana o al medio ambiente. La EPA usará la información para determinar si se necesita alguna acción adicional (EPA, 2017)

Finalmente la organización internacional de normalización (ISO) ha establecido un comité técnico para desarrollar estándares internacionales para la nanotecnología, este comité técnico, ISO/TC229, está trabajando para desarrollar estándares para terminología y nomenclatura, metrología e instrumentación, incluyendo metodologías de ensayo, modelación y simulación, y las prácticas científicas de salud, seguridad y medio ambiente (EPA, 2017).



II. Antecedentes

Carvajal de la Haza (2016), estudió la extracción de Cu (II) en presencia de ramnolípidos en *B. juncea*. a) Observó la influencia del ramnolípidos en el crecimiento de *B. juncea* y b) la capacidad de fitoextracción de Cu (II). Los resultados demostraron que *B. juncea* no tenía un buen desarrollo a dosis superiores a 1000 mg.kg⁻¹ Cu (II), y el crecimiento de las plantas disminuyó a partir de una concentración de ramnolípidos de 1000 mg.kg⁻¹.

Sin embargo no existen trabajos que demuestren que *B. juncea* mediante la aplicación NTCPM en el suelo, aumenta/desminuye su capacidad como HAM en FITO de Cu (II).

III. Justificación

Por la creciente preocupación en materia de la contaminación del ambiente en las últimas décadas, se ha generado un enorme interés en la remediación de suelos impactados a bajo costo y que además no propicien a efectos secundarios en el ambiente.

Con base en lo anterior y debido a la escasa investigación sobre el mejoramiento de FITO de suelos impactados por Cu (II) mediante la fitoextracción y/o fitoestabilización con *B. juncea*, se plantea lo siguiente: implementar el uso de NTCPM para potenciar a *B. juncea* como HAM induciendo la biodisponibilidad del Cu (II) para la FITO de un suelo contaminado.



IV. Hipótesis

La FITO de un suelo contaminado por Cu (II) por *B. juncea*, será mejorada con nanopartículas de carbono.

V. Objetivo

Analizar el uso de NTCPM 95% de pureza en la FITO de un suelo impactado a diferentes concentraciones de Cu (II); para mejorar la capacidad de fitoextracción/fitoestabilización por *B. juncea*.

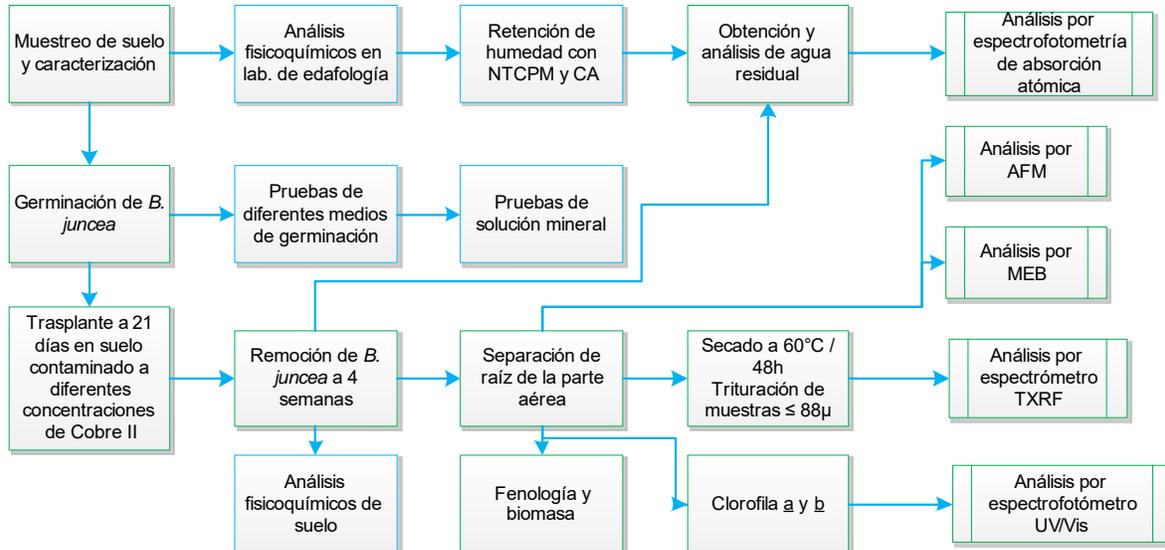
Objetivos específicos

- Comparar la efectividad del uso de NTCPM 95% de pureza con CA 90% de pureza, en la FITO de suelo contaminado con Cu (II).
- Determinar la capacidad de *B. juncea* en la FITO de suelo mediante la concentración de Cu (II) en biomasa y lixiviación de agua del suelo.
- Determinar el efecto de NTCPM y CA en el crecimiento y producción de biomasa seca en *B. juncea* en suelo contaminado con Cu (II).
- Determinar si con la baja concentración usada de NTCPM 95% de pureza reducen el estrés en *B. juncea* causado por altas concentraciones de Cu (II).



VI. Materiales y métodos

Figura 1. Diagrama del diseño experimental para determinar el efecto de los NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado con Cu(II) por *B. juncea*.



NTCPM: nanotubos de carbono de pared múltiple; CA: carbón activado; TXRF: espectroscopia de fluorescencia de rayos X de reflexión total; MEB: microscopia electrónica de barrido; AFM: microscopia de fuerza atómica.

6.1. Propiedades físico-químicas de suelo para crecimiento de *Brassica juncea*

Se realizó un análisis físico-químico de 4 suelos diferentes: a) un suelo que corresponde a la primer capa superficial de un bosque de encino, b) sustrato con contenido de materia orgánica “tierra negra” de la marca nutrigarden, c) suelo vertisol de la Ciénega de Zacapu (INEGI, 2014) y d) suelo andosol de la comunidad de Atecuaro Michoacán (INEGI, 2014), de uso agrícola. Así también para la posible germinación y crecimiento de *B. juncea*, se utilizó un sustrato artificial preparado en el CINVESTAV Irapuato, que consiste de turba, vermiculita y perlita en proporciones de 50-25-25% respectivamente.

Las propiedades fueron determinadas en el laboratorio de Edafología de la UMSNH. Siendo estos: materia orgánica (MO), carbono orgánico (CO), pH, textura, densidad, bases intercambiables (BI), capacidad de intercambio catiónico (CIC), todos ellos

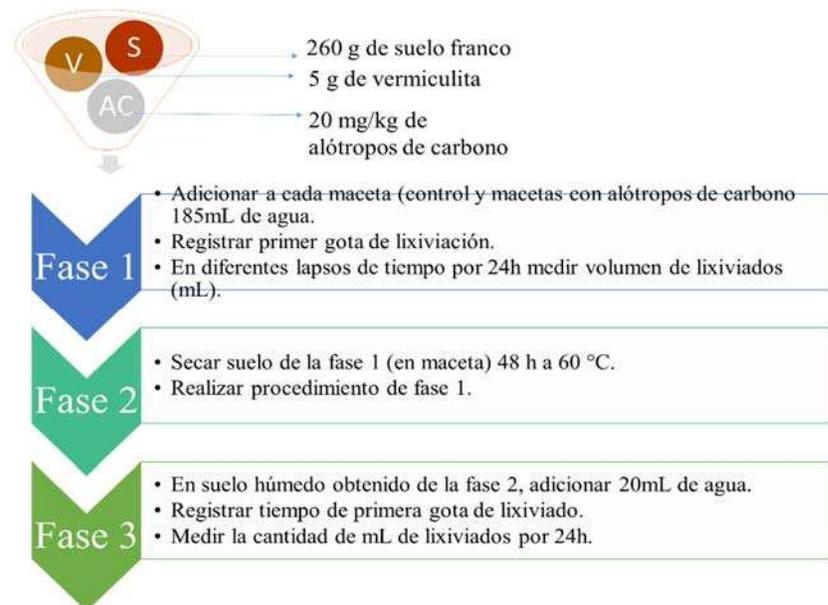


según la norma oficial mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece la fertilidad de un suelo.

6.2. Retención de humedad por nanotubos de carbono de pared múltiple y carbón activado en suelo contaminado con Cu (II)

La influencia de cantidad de agua retenida por NTCPM en comparación con CA fue medida mediante una simulación de la dinámica ambiental (lluvia y sequía). Se utilizó la cantidad de suelo franco, que corresponde a 90% de suelo y 10% de vermiculita de la capacidad de una maceta columnar. Utilizando concentraciones de 20 mg.Kg⁻¹ de NTCPM 95% de pureza y CA, y una concentración de 1000 mg/Kg de Cu (II) en 260 g de suelo y 5 g de vermiculita por maceta, y un control sin los compuestos del carbono (Chard y Bugbee, 2005; Tiwari, 2013). Se realizó además otro ensayo con las mismas características, utilizando un detergente para dispersión de NTCPM y CA para comparar y observar si existe algún efecto negativo en las propiedades de estos compuestos. El experimento se dividió en tres fases (figura 2).

Figura 2. Retención de humedad por NTCPM y CA en suelo.





6.3. Semilla de *B. juncea* germinada en suelo no impactado

Para la germinación de semilla se utilizó el suelo que mostró las propiedades requeridas por *B. juncea*. Se adicionó además vermiculita para aumentar la porosidad del suelo sin modificar sus propiedades químicas, esto se comprobó realizando la comparación del análisis de suelo en el laboratorio de Edafología de la UMSNH, secado a temperatura ambiente y tamizado en malla de 2000 μ , posteriormente secado a 60 °C por 48 h y esterilizado a 1 ATM por 40 min (Castillo, 2011).

Las semillas utilizadas fueron *B. juncea*, nombre común mostaza de la India, fenotipo Garnet Giant, a las cuales se realizó una esterilización superficial con cloro durante 1min al 10%, 1 minuto con metanol al 70% y aplicando cinco enjuagues con agua destilada estéril, posteriormente se colocaron 2 semillas en un vaso de plástico desechable del No. 0 con 19.5 g de suelo estéril (90% suelo y 10% vermiculita), se consideró usar 2 plantas en cada maceta y 3 macetas por el tipo de tratamiento a realizar para obtener un número de 6 plantas por tratamiento (N+6 réplicas). Los tres primeros días para la germinación de *B. juncea* se realizaron en completa oscuridad y al cuarto día se continuó el crecimiento en una cámara de crecimiento a 2000 lux con un fotoperiodo de 14 h, temperatura media de 24.8 °C y humedad media de 26.5% (Chard y Bugbee, 2005).

6.3.1. *B. juncea* trasplantada en suelo contaminado con Cu (II)

El crecimiento de *B. juncea* se continuó durante cuatro semanas en las cuales se alimentó con 1 mL de solución mineral cada semana "Ultrasol Multipropósito 18-18-18", solución preparada 1 g.L⁻¹, aumentando la cantidad a 10 mL después de cuatro semanas después de la germinación, momento en el que se realizó el trasplante para la FITO de suelo contaminado con Cu (II).

Para los tratamientos aplicados en la contaminación de suelo con Cu (II) se utilizó una concentración fija de 20 mg.Kg⁻¹ de NTCPM y CA enmiendas para potenciar a *B. juncea* en la fitoextracción de Cu (II) en suelo, las características generales se



muestran en la tabla 1; el contaminante fue Cupravit® (BAYER) $\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ (Oxicloruro de Cobre) en diferentes concentraciones de 0-10,000 mg/Kg de Cu (II).

Tabla 1. Características generales de Sigma Aldrich para NTCPM y CA.

	Ensayo	Color	Diámetro	Longitud	Densidad	Estado físico
NTCPM	> 95% de carbono	Negro	6-9 nm	5 μ	~ 2,1 g / cm ³ a 25 ° C.	Polvo
CA	>95%	Negro	0.25mm (250 μ)	NA	0.250 – 0.600 g/cm ³	Polvo

NTCPM: nanotubos de carbono de pared múltiple; CA: carbón activado; NA: no aplica.

El crecimiento de *B. juncea* en los diferentes tratamientos fue seguido por 4 semanas, tiempo previo al comienzo de la fase de reproducción (Castillo, 2011; Tiwari, 2013). El diseño experimental se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Diseño experimental de la fitorremediación de un suelo contaminado con Cu (II) mediante *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA.

Concentración de Cobre (II) (mg/Kg)	0	10	100	1000	10000
Control/Cupravit	NA	NA	NA	NA	NA
NTCPM (mg/kg)	20	20	20	20	20
Carbón activado (mg/kg)	20	20	20	20	20

NTCPM 95%, nanotubos de carbono de pared múltiple, NA= no se aplica NTCPM/Carbón activado.

6.3.2. Remoción de *B. juncea* del suelo fitorremediado

Después de cuatro semanas de crecimiento de en macetas columnares a partir del trasplante se realizó la remoción de *B. juncea* del suelo: a) se retiró de la maceta intentando no dañar la raíz; b) se lavó la raíz con agua estéril para retirar las partículas de suelo adheridas; c) se separaron parte aérea y raíz registrando las



medidas de longitud radicular, altura de planta y ancho de hoja y d) se registró el peso fresco y se llevaron a secado por 48 h a 60 °C la raíz y parte aérea en bolsas de papel estraza V) se registró el peso seco de la biomasa de raíz y parte aérea de *B. juncea* (Castillo, 2011).

6.4. Recolección de lixiviados de suelo fitorremediado

Para la recolección del agua lixiviada del suelo durante el crecimiento de *B. juncea* en suelo impactado y tratado con NTCPM y CA, se utilizó un frasco de cristal estéril de 200 mL. Para obtener el agua residual de suelo de cada maceta columnar con los diferentes tratamientos se adicionó 180 mL de agua destilada estéril en cada maceta con *B. juncea* con el fin de sobrepasar la capacidad de campo del suelo para la obtención de agua residual cuando se realizó el trasplante, y después cada semana 40 mL de agua destilada estéril, para posteriormente realizar el análisis por absorción atómica y cuantificar la concentración de Cu (II) (Chard y Bugbee, 2005).

6.5. Análisis físico-químicos de suelo utilizado para fitorremediación por *B. juncea*

Posteriormente de haber realizado los tratamientos con las diferentes concentraciones de Cu (II) y el uso de NTCPM y CA en interacción con *B. juncea* en suelo se realizó la caracterización de suelo en el laboratorio de Edafología de la UMSNH. Siendo estos: MO, CO, pH, textura, porosidad, BI, CIC, todos ellos según la norma oficial mexicana NOM-021-RECNAT-2000 (Ayala *et al.*, 2014); además de la formación de agregados a través de tamices de diferente diámetro de malla.

6.6. Determinación de concentración del Cu (II) en lixiviados de suelo y biomasa de *B. juncea*

6.6.1. Concentración de Cu (II) lixiviado del suelo fitorremediado

El contenido de Cu (II) lixiviado de suelo con y sin *B. juncea*, fueron analizados por espectrofotometría de absorción atómica, para lo cual se tomó una alícuota de 30mL y se centrifugó a 14,500rpm durante 30min, posteriormente se hizo una digestión



del remanente con 5mL de agua regia al 100% a una temperatura de 100°C, con la finalidad de disolver las partículas de suelo o MO. Finalmente se mezcló el sobrenadante y se aforó a 30mL con agua destilada si este se requería en cada muestra, finalmente se llevó a lectura por espectrofotómetro de absorción atómica, en el laboratorio de análisis químicos, IIMM, UMSNH.

6.6.2. Cuantificación de Cu (II) en biomasa de *B. juncea* después del periodo de FITO

El análisis de la cuantificación de Cu (II) en parte aérea y raíz de *B. juncea* fue por TXRF (Total reflection X-Ray Fluorescence) del Laboratorio de Biofísicoquímica y Estudios de Radiación (LBER) de la Facultad de Ciencias Físico Matemáticas (FCFM) UMSNH (Ver anexo 1). La preparación de las muestras consistió en el secado de la parte aérea y raíz de *B. juncea* a 60°C durante 48h, posteriormente se hizo la trituration en molino Restch™ a 25hz por 5min, después de esto se trituró en mortero de cristal para obtener un tamaño de partícula $\leq 88\mu$. Para el análisis por TXRF se utilizaron 60mg de muestra, y esta se disolvió en 2.5mL de surfactante TRITON X-100 al 1%. Se agregó 10 μ L de estándar de nitrato de galio (Ga) como elemento de referencia. Esta mezcla se llevó a baño ultrasónico durante 15min para dispersar las partículas que estuvieran unidas por sus cargas. Después de este tiempo se procedió a agitar en vortex durante 1min e inmediatamente se colocaron con la ayuda de una micropipeta 10 μ L de la mezcla sobre un disco de acrílico del TXRF, el disco previamente secado con un material hidrófobo (SERVA™). La muestra se secó durante 30min a 35°C, esto para obtener una capa fina sobre el portamuestras (disco) y se procedió a su análisis (Bruker, 2013).

6.6.3. Índices de FITO

Para calcular los índices de FITO se consideraron los valores obtenidos de biomasa seca de *B. juncea*, concentración de Cu (II) contenido en planta (raíz y parte aérea) y concentración de Cu (II) lixiviado del suelo.



6.6.3.1. Masa del cobre fitoextraída por la parte aérea y raíz de *B. juncea*

En la concentración de Cu (II), las plantas se consideran como HAM, si en su parte aérea tienen concentraciones superiores a 1000 mg/Kg de Cu (II) (Medina *et al.*, 2014).

$$M_p = C_p * B_p$$

Donde:

M_p = masa del Cu (II) fitoextraída por parte aérea o raíz de *B. juncea*

C_p = Concentración de Cu (II) obtenido por TXRF

B_p = Biomasa seca de la parte aérea o raíz de *B. juncea*

Si (%) M_p de raíz \geq (%) M_p de parte aérea la planta es una estabilizadora.

Si (%) M_p de raíz \leq (%) M_p de parte aérea la planta es una fitoextractora.

6.6.3.2. Factor de biodisponibilidad

La biodisponibilidad (Bd) comprende fracción de Cu (II) que está disponible para su absorción por las plantas y corresponde a las formas solubles e intercambiables en equilibrio con la solución del suelo, controladas por distintas reacciones químicas. La Bd de los MP es un buen indicador de calidad de suelos ya que la concentración total de MP no tiene relación alguna con su absorción por las plantas (Méndez *et al.*, 2009).

$$FBd = C_{lix} / C_s$$

C_{lix} concentración de Cu (II) en lixiviado

C_s concentración de Cu (II) en suelo

6.6.3.3. Factor de Bioconcentración (FBc)

El FBc factor se utiliza para medir la capacidad de *B. juncea* en la captación de Cu (II) por raíz y parte aérea, con relación a su concentración en el suelo. Para las plantas el factor de bioacumulación, se utiliza como una medida de la eficiencia de



acumulación de Cu (II) en la biomasa seca, donde valores mayores a 1 indican que las especies fueron potencialmente acumuladoras e HAM, mientras que las especies excluidoras menores a 1, cuanto más menor sea este valor, mayor es su capacidad de exclusión (Medina *et al.*, 2014). Las HAM tienen valores de FBc >>1, aunque aún no se ha proporcionado la definición exacta de una HAM, generalmente se dice que las plantas con FBc>10 son verdaderas HAM.

$$FBc = C_{p,T} / C_s$$

$C_{p,T}$ concentración de Cu (II) en biomasa total de la planta

C_s concentración de Cu (II) en suelo

Si el FBc aérea < 1 la planta es excluidora

Si el 1 < FBc aérea < 10 la planta es acumuladora simple

Si el FBc aérea > 10 la planta es HAM

Dado que la planta solo puede absorber la fracción biodisponible del metal, también es útil definir el FBc en términos de la fracción de metal absorbida de la solución del suelo, por la planta. En ese caso, el FBc se convierte a la fracción

$C_{p,T} / C_{ix}$. Este último FBc indica la capacidad de absorción de la planta cuando el metal está disponible libremente, mientras que la definición anterior solo indica la fracción que la planta ha absorbido sin especificar qué tan fácilmente disponible está el metal. Ambas definiciones se usarán en el análisis de los resultados de los experimentos (Medina *et al.*, 2014).

6.6.3.4. Factor de Translocación

El factor de translocación (FTI) es la relación entre la concentración en este trabajo *B. juncea* sea tallo, hojas, flores, semillas o frutos con la concentración en la raíz. Un FTI mayor a 1 sugieren gran capacidad para transportar Cu (II) desde las raíz hasta la parte aérea, explicada en su mayor parte, por eficientes sistemas de transporte de Cu (II) y, probablemente, por secuestro de Cu (II) en las vacuolas de las hojas y en el apoplasto. (Medina *et al.*, 2014).



$$FTI = C_{p,a} / C_{p,r}$$

$C_{p,a}$ concentración de Cu (II) en la parte aérea

$C_{p,r}$ concentración de Cu (II) en la raíz

Si $FTL > 1$, significa que la planta traslada eficazmente los MP de la raíz a la parte aérea de la planta, por lo que su potencial es la de acumular MP. Si $FTL \geq 5-10$ su potencial es hiperacumular Cu (II). Si $FTL < 1$, significa que la planta no traslada eficazmente los MP de la raíz a la parte aérea de la planta, por lo que su potencial es la de fitoestabilizar metales en sus raíces o ser una exclusora (Medina *et al.*, 2014).

6.7. Determinación del efecto que causan los NTCPM y CA en tejidos de *B. juncea*

6.7.1. Cuantificación de pigmento clorofila a y b en hojas de *B. juncea*

La medición de pigmentos, tal es el caso de clorofila se realizó por el método propuesto por Hansmann (1973), donde se utilizó 10mL de acetona al 90% para macerar las hojas de *B. juncea*, se reposó la muestra macerada durante 24h a 4°C en completa oscuridad, después de este periodo se colocó a temperatura ambiente, adicionando acetona a 10 ml en el caso de que pudiera evaporarse, se centrifugó a 2500 rpm en un tiempo de 5min y se realizó la lectura del sobrenadante, tomando como blanco acetona al 90%. La absorbancia se midió por espectrofotometría UV/Vis a una longitud de onda de 665, 645 y 630nm, en el laboratorio de limnología, CRIP, Pátzcuaro.

6.7.2. Microscopia de fuerza atómica en ápice de raíz de *B. juncea*

El microscopio de fuerza atómica (AFM) NT-MDT Spectrum Instruments® del laboratorio de biofísica en el IFM de la UMSNH fue utilizado para conocer el efecto de los NTCPM y CA en la pared celular de la raíz de *B. juncea* a una concentración



de 1000 mg/Kg de Cu (II) en suelo. El AFM es una herramienta básica en el estudio de la materia a micro y nano escala. Se utiliza para la obtención de imágenes, no utiliza ondas electromagnéticas ni haz de partículas. Su principio de operación básicamente estudia la deflexión de una sonda, que está constituida por una punta finísima adjunta a una micropalanca, la cual interactúa con la superficie de la muestra. Como consecuencia de esa interacción, una imagen tridimensional de la topografía de la muestra o de las fuerzas entre la sonda y la superficie es generada (López y Solares, 2014). El estudio de las curvas de fuerza-distancia analizó por el método de Oliver y Pharr, que permite obtener información sobre el comportamiento elástico, viscoelástico y plástico. Este método se centra únicamente en el análisis de la curva de retracción. Para ello se usó una punta R-tespa, de Bruker, con una constante de resorte promedio de 40N/m (Oliver y Pharr, 1992).

6.7.3. Microscopia electrónica de barrido en ápice de raíz de *B. juncea*

Se utilizó un Microscopio electrónico de barrido convencional, modelo JSM-6400 de JEOL[®], del instituto de investigación en metalurgia y materiales, de la UMSNH. El microscopio electrónico de barrido, proporciona imágenes y datos fisicoquímicos de la superficie de cuerpos generalmente opacos a los electrones, por medio de un delgado haz de electrones que recorre dicha superficie y de detectores que traslucen las señales que de ella emanan, transformándolas en corrientes eléctricas que se emplean en formar una imagen en un monitor (Vázquez y Echeverría, 2000).



En la figura 1, se observó que *B. Juncea* no mostró signos aparentes de daño anatómico a bajas concentraciones de Cu (II) en el suelo. Solo a concentraciones de Cu ≥ 1000 mg / Kg comenzó a manifestarse la disminución morfológica visible. Además se ilustra la capacidad de *B. Juncea* para ser tolerante a los altos niveles de contaminación de Cu (II) en el suelo. La mayoría de las plantas agronómicas muestran los efectos de la toxicidad de Cu en concentraciones más bajas de Cu en el suelo (Sacristán y Carbó, 2016). Sin embargo, la extremadamente alta concentración de Cu (II) de 10,000 mg/Kg, provoca daño anatómico irreversible a *B. Juncea*, que afecta seriamente su capacidad de supervivencia (figura 1). Por esta razón, en las secciones que siguen, los resultados y su discusión se limitarán a las concentraciones de Cu (II) del suelo ≤ 1000 mg / kg. También se puede discernir de la figura 1, aunque indistintamente, que la adición de los alótropos de carbón parece mejorar el crecimiento de la planta a pesar de la presencia de Cu (II). Estas preguntas se abordan cuantitativamente en las siguientes secciones mediante un examen de los índices de crecimiento, las concentraciones de Cu (II) en la solución del suelo (lixiviado) y el tejido de la planta y los efectos de los tratamientos en la fisiología de la planta.



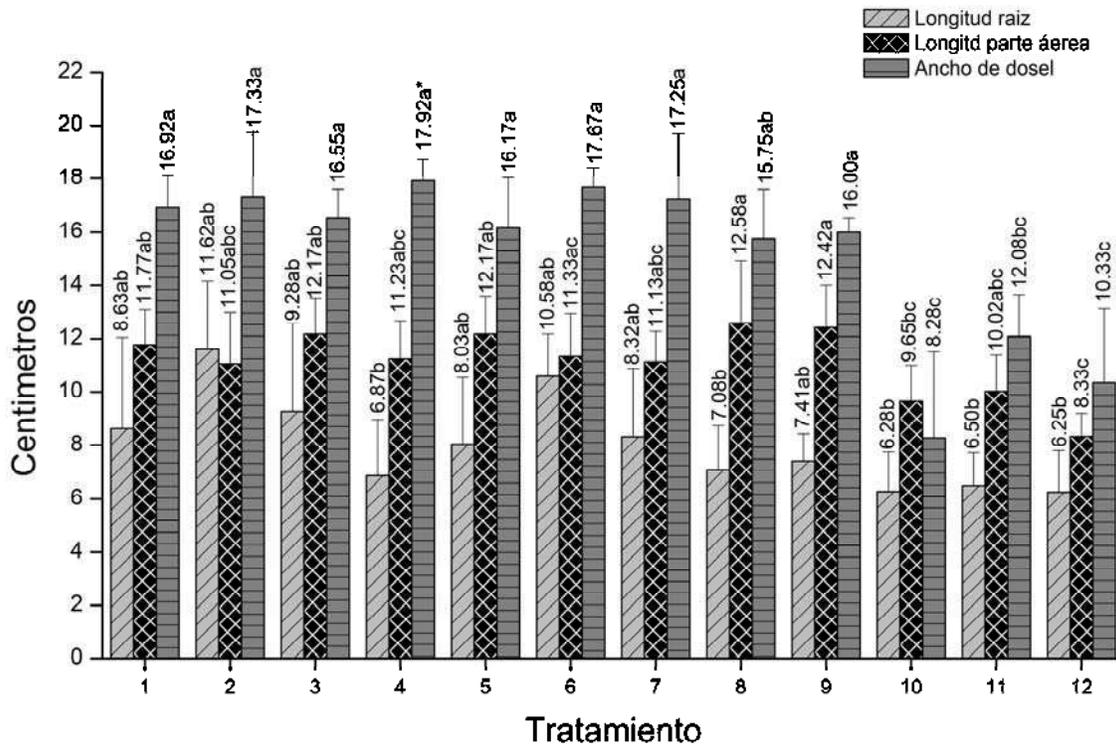
Índice de crecimiento y biomasa de *B. juncea* en la FITO del suelo

En la figura 2, se muestra la longitud radicular, altura y ancho de dosel de *B. juncea* potenciada con NTCPM y CA en la FITO del suelo contaminado con Cu (II) después de cuatro semanas de crecimiento en suelo impactado. Se registró la mayor longitud de raíz 11.61 cm y ancho de dosel 17.33 cm en *B. juncea* en suelo tratado con NTCPM; la altura 12.58 cm, en suelo con NTCPM con 100 mg/Kg de Cu (II). Estos valores fueron estadísticamente diferentes en comparación cuando se aplicó NTCPM y CA con 1000 mg/Kg de Cu (II) en la cual esta concentración realizó un acercamiento a un suelo impactado, donde el uso de NTCPM brindó una mejora para el crecimiento de *B. juncea*, con altura (10.01 cm) y ancho de dosel (12.08 cm) con diferencias significativas entre el uso de CA y sin el uso de ambos alótopos del carbono. La longitud radicular disminuyó significativamente en la concentración de 1000 mg/Kg de Cu (II) con respecto del control y suelo con NTCPM sin Cu (II). La mayor longitud de raíz, altura y ancho de dosel de *B. juncea* obtenidas por el uso de NTCPM, Tiwari, (2014) lo asoció a la posible entrada de estas nanopartículas a nivel radicular; Tiwari (2013) demostró que el uso de NTCPM optimizaban la absorción de nutrientes en la germinación, crecimiento y biomasa vegetal, lo cual se relaciona a la disminución de Cu (II) lixiviado del suelo por la FITO por *B. juncea* potenciada con NTCPM. Jiang *et al.*, (2001) demostraron que la inhibición del crecimiento es por el efecto tóxico de Cu (II), teniendo como resultado una reducción en el proceso de división celular y del daño estructural o muerte del meristemo apical. En suelo con el uso de NTCPM para potenciar a *B. juncea* en concentraciones de Cu (II) a 1000 mg/Kg se observó mejor longitud radicular, altura y ancho de dosel. Los NTCPM y CA adsorben iones metálicos, lo que podría ser la razón de la mejora de la toxicidad de Cu (II) en *B. juncea* en el suelo que contenía estos alótopos de carbono. Los iones de Cu (II) en la solución del suelo se adsorben en las superficies de los alótopos de carbono impidiendo su entrada en las células de *B. juncea*, reduciendo así la toxicidad del Cu (II). En este aspecto, los NTCPM es mejor en adsorción que CA debido a que su área superficial es más grande dado por sus dimensiones de escala nanométrica (Tiwari *et al.*, 2014). La concentración de Cu (II) a 10 y 100 mg/Kg sin NTCPM y CA no registró cambios significativos respecto del



control ya que cuando el Cu (II) se encuentra a bajas concentraciones es un elemento esencial para *B. juncea* y no presenta efectos negativos sobre ella (León-Morales y Sepúlveda-Jiménez, 2012).

Figura 2. Longitud de raíz, altura y ancho de dosel de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado Cu (II).



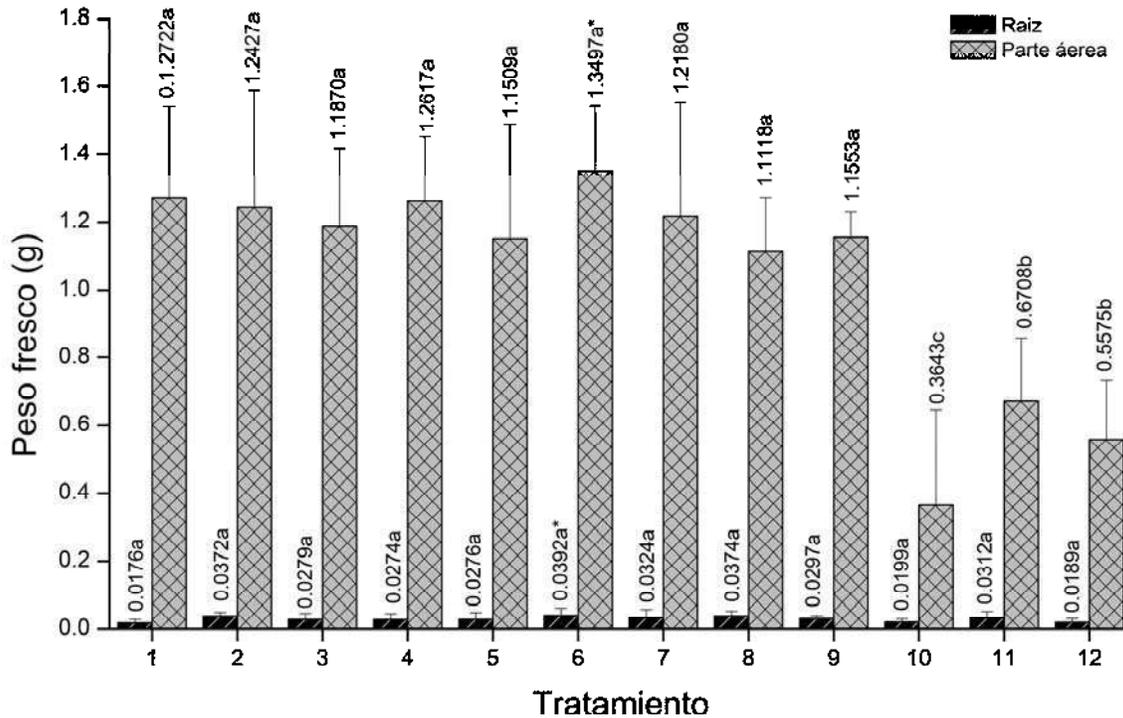
1) Control 2) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza. 3) En suelo con Carbón activado. 4) En suelo con Cobre 10mg/Kg. 5) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza más cobre 10mg/Kg. 6) En suelo con Carbón activado más cobre 10 mg/Kg. 7) En suelo con Cobre 100 mg/Kg. 8) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza más cobre 100 mg/Kg. 9) En suelo con Carbón activado más cobre 100 mg/Kg. 10) En suelo con Cobre 1000 mg/Kg. 11) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza más cobre 1000 mg/Kg. 12) En suelo con Carbón activado más cobre 1000 mg/Kg Prueba Tukey (0.05)*. Letras iguales, no muestran diferencia significativa.



En la figura 3 se muestra el peso fresco de la parte aérea y radicular de *B. juncea* potenciada con NTCPM y CA en suelo contaminado de 10 - 1000 mg/Kg de Cu (II). En el control absoluto fue mayor el peso de la parte aérea, alcanzó 1.2722 g, se registró diferencia estadística comparado con el suelo impactado cuando se utilizó 1000 mg/Kg de Cu (II) donde se observó una gran disminución de biomasa. El uso de NTCPM con 1000 mg/Kg de Cu (II) registró un ligero peso mayor 0.6708 g en comparación con CA 0.5575 g, por lo que no presenta diferencia estadística entre ambos tratamientos. Pero sin el uso de estos alótropos de carbono, el peso fresco aéreo de *B. juncea* crecida durante cuatro semanas en suelo contaminado con Cu (II) fue estadísticamente diferente con 0.3646 g; En cuanto al peso fresco radicular no se observó diferencia estadística en los tratamientos, pero en *B. juncea* potenciada con NTCPM con 100 mg/Kg de Cu (II) fue mejor. Kasim (2006) indicó que la disminución de la peso fresco puede atribuirse a la reducción de la longitud de planta y a la pérdida de hojas, pero también podría deberse a la toxicidad originada por la alta concentración del metal disponible en el suelo, debido probablemente a un cierre de los estomas, que afecta el intercambio de gases y el transporte de electrones de la fotosíntesis debido a que el Cu (II), a concentraciones ligeramente superiores a las requeridas, causa efectos tóxicos (Yu *et al.*, 2010).



Figura 3. Peso fresco parte aérea y radicular de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado con Cu (II).



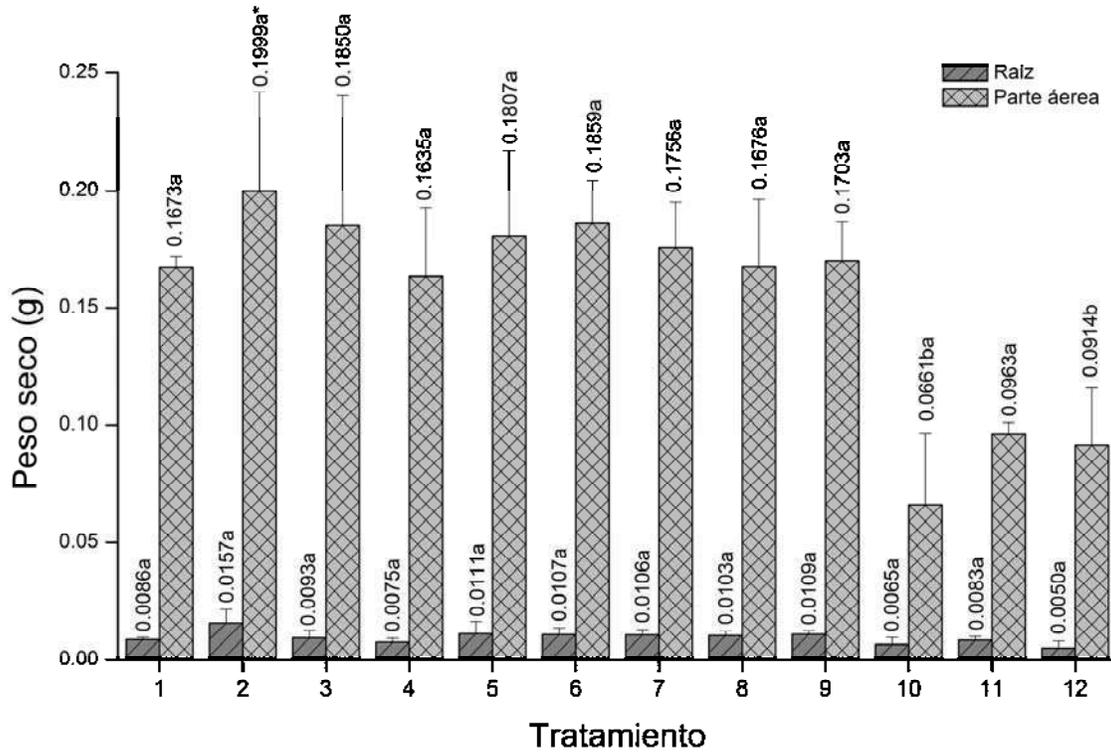
1) Control 2) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza. 3) En suelo con Carbón activado. 4) En suelo con Cobre 10mg/Kg. 5) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza más cobre 10mg/Kg. 6) En suelo con Carbón activado más cobre 10 mg/Kg. 7) En suelo con Cobre 100 mg/Kg. 8) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza más cobre 100 mg/Kg. 9) En suelo con Carbón activado más cobre 100 mg/Kg. 10) En suelo con Cobre 1000 mg/Kg. 11) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza más cobre 1000 mg/Kg. 12) En suelo con Carbón activado más cobre 1000 mg/Kg Prueba Tukey (0.05)*. Letras iguales, no muestran diferencia significativa.



La figura 4 muestra los datos de peso seco de parte aérea y radicular de *B. juncea*, se observó que los valores del peso seco radicular no difieren estadísticamente. Sin embargo en el peso seco de la parte aérea fue significativamente afectado por el incremento de la concentración de Cu (II) a 1000 mg/Kg. La biomasa final de *B. juncea* en este ambiente impactado es mejor cuando se potenció con NTCPM, seguido por CA en comparación con el suelo impactado sin NTCPM o CA. Estos Datos coinciden con lo reportado por Turan y Esringu, (2007) que reportaron que el peso seco total de biomasa de mostaza de la India fue afectada por la contaminación del suelo; que en promedio, el Cu (II) causó una reducción aproximada del 75% en biomasa de raíz y parte aérea de las plantas. En resumen los resultados obtenidos para biomasa, se observó que el uso de NTCPM y CA, principalmente NTCPM aumentan la biomasa fresca como la seca de *B. juncea* incluso en presencia de una alta concentración de Cu (II) como es 1000 mg/Kg en suelo. El aumento de biomasa seca implica que los NTCPM mejoran los procesos metabólicos de *B. juncea*, lo que resulta en un mayor contenido celular; mientras que el aumento de la biomasa fresca indica que también ayuda en la adquisición y retención de agua en planta, estas mismas observaciones fueron encontradas por Tiwari *et al* (2014).



Figura 4. Peso seco parte aérea y raíz de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado con Cu (II).

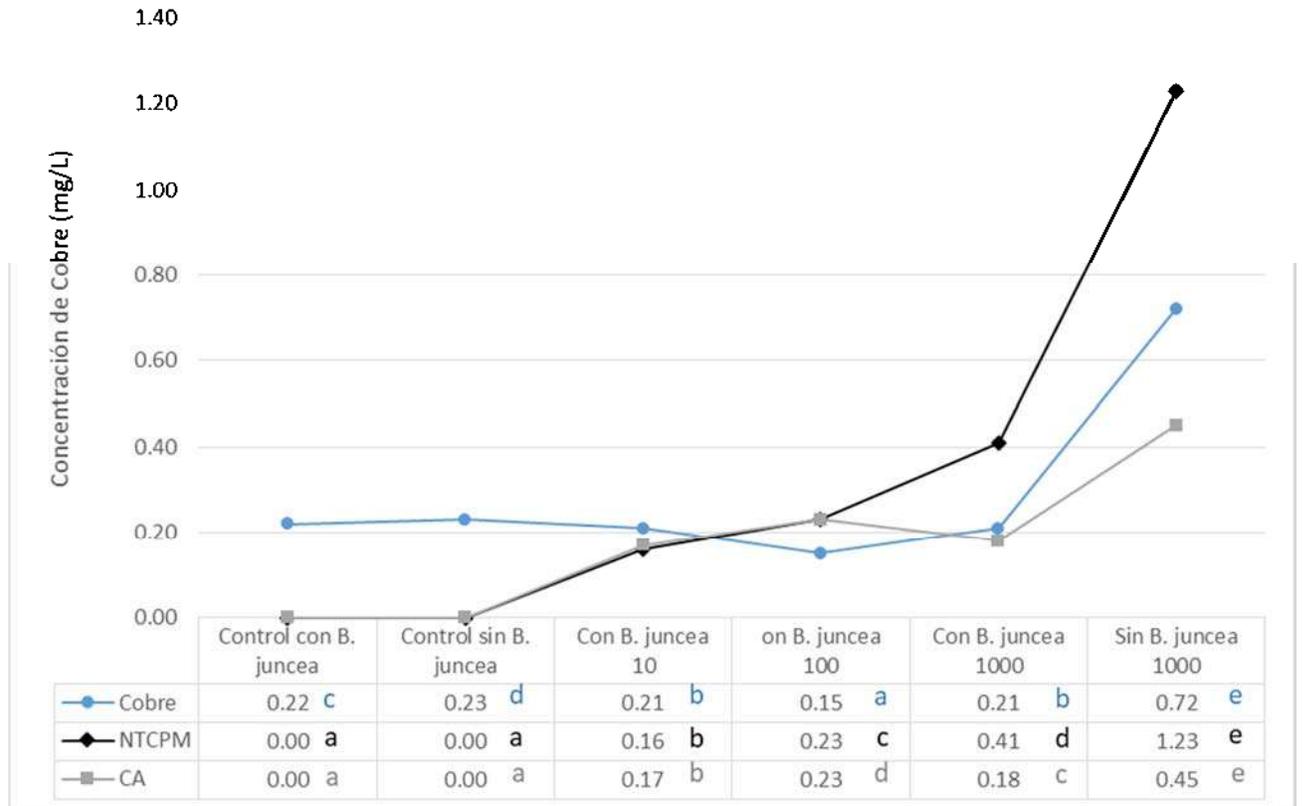


1) Control 2) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza. 3) En suelo con Carbón activado. 4) En suelo con Cobre 10mg/Kg. 5) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza más cobre 10mg/Kg. 6) En suelo con Carbón activado más cobre 10 mg/Kg. 7) En suelo con Cobre 100 mg/Kg. 8) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza más cobre 100 mg/Kg. 9) En suelo con Carbón activado más cobre 100 mg/Kg. 10) En suelo con Cobre 1000 mg/Kg. 11) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza más cobre 1000 mg/Kg. 12) En suelo con Carbón activado más cobre 1000 mg/Kg Prueba Tukey (0.05)*. Letras iguales, no muestran diferencia significativa.



Determinación de concentración de Cu (II) en lixiviados de suelo y biomasa de *B. juncea* por la FITO

Figura 5. Concentración de Cu (II) en lixiviados del suelo fitorremediado mediante *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA.



En suelo: NTCPM: Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza más; CA: Carbón activado. Las concentraciones de cobre mg/Kg de cobre. Prueba Tukey (0.05)*. Letras iguales, no muestran diferencia significativa.

En la figura 5, se muestran los valores obtenidos de la concentración de Cu (II) en el lixiviado del suelo impactado a 10, 100, 1000 mg/Kg con NTCPM o CA y fitorremediado por *B. juncea*, en comparación con el Cu (II) lixiviado del suelo con NTCPM o CA impactado con 1000 mg/Kg sin *B. juncea*; cierto volumen de agua residual de las macetas columnares con los diferentes tratamientos en suelo fue analizado por espectrofotometría de absorción atómica. El hallazgo más notable es que la adición de NTCPM aumenta significativamente la solubilidad del Cupravit en



la solución del suelo y esto es particularmente evidente en las concentraciones más altas del Cu aplicado. En este trabajo, el Cu se introdujo en el suelo como fungicida Cupravit, cuyo ingrediente activo es el trihidróxido de cloruro de dicobre $[\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}]$ que es una base débil. La solución nutriente de pH ~ 6.5 se añadió por igual a todos los suelos. Por lo tanto, a un pH ligeramente ácido, se produciría la siguiente reacción ácido-base, que libera el Cu en su forma disuelta de $\text{Cu}^{2+}(\text{ac})$:



Esta reacción se produciría incluso sin adición de NTCPM o CA, está claro que la adición de los alótropos de carbono altera la cantidad de $\text{Cu}^{2+}(\text{ac})$ disponible en la solución del suelo. Así su gran área superficial y sitios activos con átomos de carbono insaturados, los NTCPM adsorben grupos funcionales, tales como grupos funcionales ácidos o básicos. Estos grupos adsorbidos se convierten en sitios activos que catalizan reacciones tales como ácido base, redox, etc. (Serp y Machado, 2015). Dicha adsorción superficial también se ocurre en las partículas de CA. Sin embargo, la concentración de estos sitios activos depende de la estructura microcristalina del alótropo de carbono. Los pequeños cristales presentan más bordes, por lo tanto, se pueden formar más grupos superficiales. La segunda cuestión es la accesibilidad a los sitios activos que está determinada por el tamaño de poro (Zhao, 2010; Serp y Machado, 2015). CA es un material microporoso; el cual contiene pequeños poros de bajo volumen, con el diámetro $\sim 2\text{nm}$. Debido a esta característica, la difusión en el poro y, por lo tanto, la accesibilidad de los sitios activos dentro de CA, se vuelve limitada, lo que afecta a las reacciones en fase líquida como la citada anteriormente. Por otro lado, los NTCPM pertenecen a la clase de materiales conocidos como materiales mesoporosos que son materiales con diámetros de poro más grandes, aproximadamente entre 2 y 50 nm. Estos poros más grandes implican un mayor acceso a los sitios activos. Por lo tanto, tanto en términos del número de sitios activos como de su accesibilidad, se espera que los NTCPM funcionen mejor como catalizadores de reacción (Serp y Machado, 2015). Esto explicaría por qué en la figura 5, se obtiene una concentración más alta de concentración de Cu en lixiviados de suelo cuando los NTCPM se aplican. La



concentración biodisponible de Cu en el suelo tratado con CA es más alta que en el suelo sin alótropos de carbono. De hecho, este disminuye en comparación con el último en la concentración más alta del Cu añadido (1000 mg / Kg). La menor biodisponibilidad de Cu con el tratamiento con CA en comparación con el tratamiento con NTCPM, cumple con el análisis antes mencionado. La concentración más baja de Cu del lixiviado en el caso de la concentración más alta de Cupravit aplicado al suelo (1000 mg / Kg sin *B. juncea*) sugiere que el CA podría adsorber cierta cantidad del $\text{Cu}^{2+}(\text{ac})$ liberado por él. La Figura 5 también muestra que la concentración de $\text{Cu}^{2+}(\text{ac})$ en el lixiviado, disminuye cuando la planta *B. juncea* crece en el suelo con varias concentraciones de Cu aplicada en forma de Cupravit. Esto es porque las raíces de la planta son absorbentes eficientes del Cu disuelto, lo que reduce la concentración de Cu en la solución del suelo. De acuerdo con Kabata-Pendias (2000), otra causa del contenido de Cu (II) lixiviado del suelo con NTCPM puede relacionarse con las propiedades físicas del suelo, la cual no retiene al Cu por la ausencia de espacios disponibles para su adsorción, además de afectar la capacidad de intercambio catiónico del suelo.

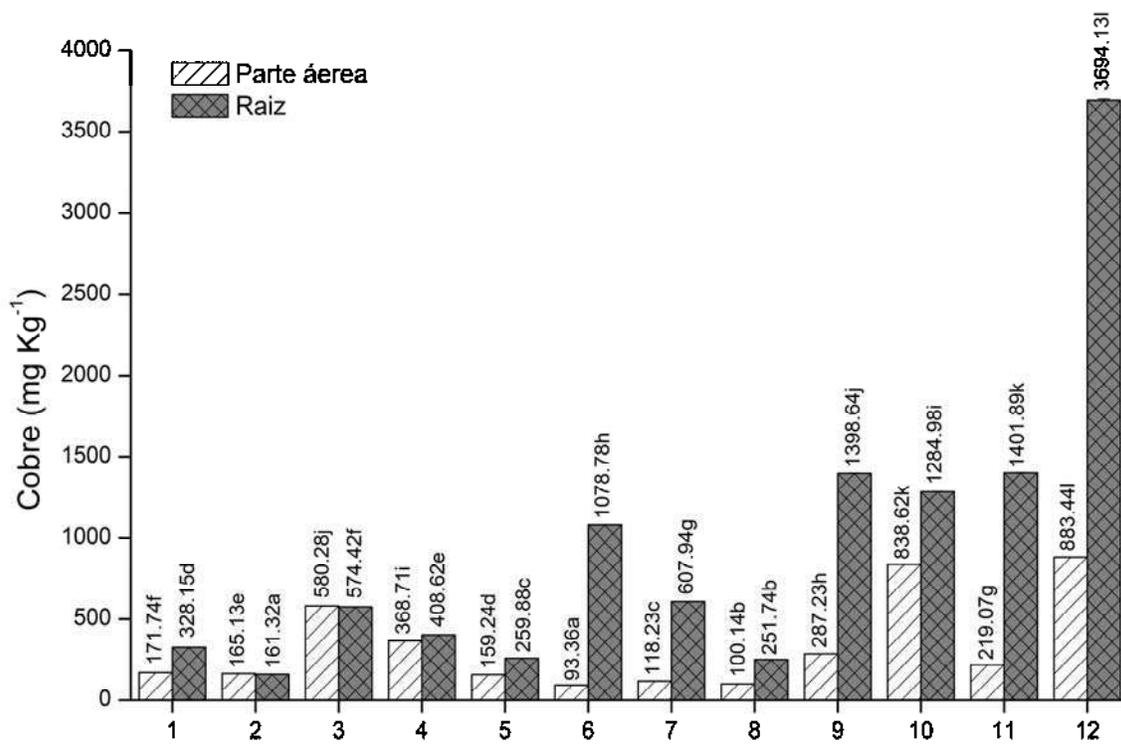


Concentración de Cu (II) en la parte aérea y raíz de *B. juncea* y masa de Cu (II) extraída

En la figura 6, se muestra la cuantificación de la concentración de Cu (II) en biomasa de la parte aérea y radicular de *B. juncea*, potenciada con NTCPM y CA en FITO de suelo impactado con Cu (II), en donde se observó que la concentración de Cu (II) absorbido por *B. juncea*, fue captado en mayor cantidad en la parte raíz que en la parte aérea. La mayor captación de Cu (II) fue con CA con las diferentes concentraciones del Cu (II) en comparación con el uso de NTCPM, que incluso la fitoabsorción en raíz fue menor que sin el uso de los alótropos de carbono en comparación con el control y la concentración de 100 y 1000 mg/Kg de Cu (II), no obstante se comprueba que el suelo agrícola contenía cierta cantidad de Cu (II). Se observó además que *B. juncea* potenciada con CA acumuló más del 60% de Cu (II) que con NTCPM en la parte aérea y raíz cuando el suelo fue contaminado con 1000 mg/Kg de Cu (II). De acuerdo con *Singh et al.*, (2003), esta mayor acumulación de Cu (II) en las raíces puede atribuirse a la formación de complejos de Cu (II) y grupos sulfhidrilo a nivel celular, lo cual resulta en menor transporte del Cu (II) a las partes aéreas. Aunque existió aumento de biomasa por el uso de NTCPM, la extracción de Cu (II) por *B. juncea* potenciada con esta enmienda, se mostró escasa en comparación de CA, *Lu et al.*, (2006) y *López-Gómez et al.*, (2014) mencionan que los mecanismos de adsorción de iones de metales pesados en NTCPM son atribuidos a la adsorción física, atracción electrostática, precipitación química en la superficie de los NTCPM y los grupos funcionales en sitios activos. Por lo que el Cu (II) es retenido en estos lugares de adsorción de los NTCPM impidiendo la fitoextracción a *B. juncea* a diferencia del CA. La mayor absorción de $\text{Cu}^{2+}(\text{ac})$ por *B. juncea* en suelo tratado con CA, sugiere que esta también podría ser la razón de la concentración menor de $\text{Cu}^{2+}(\text{ac})$ en el lixiviado de suelo tratado con CA (figura 5).



Figura 6. Concentración de Cu (II) en parte aérea y radicular de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo impactado.



1) Control 2) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza. 3) En suelo con Carbón activado. 4) En suelo con Cobre 10mg/Kg. 5) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza más cobre 10mg/Kg. 6) En suelo con Carbón activado más cobre 10 mg/Kg. 7) En suelo con Cobre 100 mg/Kg. 8) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza más cobre 100 mg/Kg. 9) En suelo con Carbón activado más cobre 100 mg/Kg. 10) En suelo con Cobre 1000 mg/Kg. 11) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza más cobre 1000 mg/Kg. 12) En suelo con Carbón activado más cobre 1000 mg/Kg Prueba Tukey (0.05)*. Letras iguales, no muestran diferencia significativa.

La M_p de *B. juncea* el mayor contenido fue acumulado en la parte aérea, siendo más del 60% al acumulado en la parte de raíz; que de acuerdo al M_p (%) se determinó que *B. juncea* es una planta fitoextractora y HAM, de acuerdo a $M_{p,r} (\%) \leq M_{p,a} (\%)$ (Medina *et al.*, 2014). Dado que se sabe que *B. juncea* es una HAM, el uso de CA aumenta su capacidad fitoextractora, mientras que los NTCPM disminuyen la entrada de Cu (II) en *B. juncea* (Tabla 1).



Tabla 1. Masa de Cu (II) extraída por *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA de suelo contaminado por Cu.

Muestra	Masa de Cu extraída M _p (mg)		M _p (total)	Masa de Cu extraída Mp (%)	
	Parte aérea	Parte raíz		Aérea	Raíz
Control	2.87E-02	2.82E-03	3.16E-02	91.06	8.94
NTCPM	3.30E-02	2.53E-03	3.55E-02	92.87	7.13
CA	1.08E-01	5.34E-03	1.13E-01	95.27	4.73
Cu10	6.03E-02	3.03E-03	6.33E-02	95.21	4.79
NTC_Cu10	2.88E-02	2.88E-03	3.17E-02	90.89	9.11
CA_Cu10	1.74E-02	1.15E-02	2.89E-02	60.06	39.94
Cu100	2.08E-02	6.44E-03	2.72E-02	76.31	23.69
NTC_Cu100	1.68E-02	2.59E-03	1.94E-02	86.62	13.38
CA_Cu100	4.89E-02	1.52E-02	6.42E-02	76.24	23.76
Cu1000	5.54E-02	8.35E-03	6.38E-02	86.91	13.09
NTC_Cu1000	2.11E-02	1.16E-02	3.27E-02	64.45	35.55
CA_Cu1000	9.51E-02	1.85E-02	1.14E-01	83.73	16.27

NTCPM: nanotubos de carbono de pared múltiple; CA: carbón activado; Cu (II): cobre con las diferentes concentraciones en mg/Kg.

Factores de bioconcentración, translocación y biodisponibilidad de Cu

El FTL *B. juncea* se presentan en la Tabla 2, este cálculo no depende las concentraciones de suelo, si no de la raíz y parte aérea. El FTL fue menor a 1, lo que indica una baja translocación, excepto los tratamientos con NTCPM y CA sin Cu (II) con 1.02 y 1.01mg.kg⁻¹ respectivamente; *B. juncea* no traslada eficazmente el Cu (II) de la raíz a la parte aérea, teniendo así una mayor concentración de Cu (II) retenido en la raíz, por lo que su potencial es fitoestabilizar el Cu (II) en sus raíces. Por ello puede minimizar la migración de Cu (II) en el suelo, y de esta manera el Cu (II) se puede considerar relativamente estable en lo que refiere a su liberación al ambiente (Riffo-Estay, 2016).



Tabla 2. Factor de translocación y de bioconcentración de Cu (II) en *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo impactado.

Tratamiento	Factor de Translocación de Cu (II) en <i>B. juncea</i>	Factor de bioconcentración de Cu (II) en <i>B. juncea</i>
Control	0.52	-
NTCPM	1.02	-
CA	1.01	-
Cu10	0.91	37.03
NTC_Cu10	0.61	16.51
CA_Cu10	0.09	14.70
Cu100	0.19	1.46
NTC_Cu100	0.40	1.09
CA_Cu100	0.21	3.54
Cu1000	0.65	0.88
NTC_Cu1000	0.16	0.31
CA_Cu1000	0.24	1.18
Cu10,000	-	0.80
NTC_Cu10,000	-	0.46
CA_Cu10,000	-	1.43

NTCPM: nanotubos de carbono de pared múltiple; CA: carbón activado; Cu: cobre (II) con las diferentes concentraciones en mg/Kg.

El FBc (Tabla 2), de acuerdo a los valores obtenidos, *B. juncea* a 10 mg/Kg de Cu (II) en suelo tratada con NTCPM y CA se comportó como una HAM; a 100 mg/Kg se denominó acumuladora ya que los valores de FBc fueron de 1.09 a 3.54; y con 1000 mg/Kg se observó que se comportó como firoestabilizadora o exclusora (Medina *et al.*, 2014). Para este factor los NTCPM disminuyeron los valores del FBc en las concentraciones de 100, 1000 y 10,000 mg/Kg de Cu (II) por lo que se considera que el Cu (II) quedó adsorbido en ellos evitando la entrada a *B. juncea* (López-Gómez *et al.*, 2014). Sin embargo el uso de CA aumento los valores del FBc en comparación con *B. juncea* impactada con Cu (II) sin NTCPM y CA, por lo que el aumento de la capacidad de *B. juncea* de extraer el Cu (II) se vio beneficiada.



Tabla 3. Factor de biodisponibilidad de Cu (II) en el lixiviado del suelo en la fitorremediación mediante *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA.

Tratamiento	Factor de biodisponibilidad de Cu (II) lixiviado del suelo	
	Con <i>B. juncea</i>	sin <i>B. juncea</i>
Control	-	-
NTCPM	-	-
CA	-	-
Cu_10	2.02E-03	-
NTC_Cu10	1.37E-03	-
CA_Cu10	1.11E-03	-
Cu100	1.18E-04	-
NTC_Cu100	1.13E-04	-
CA_Cu100	1.66E-04	-
Cu1000	1.92E-05	5.61E-05
NTC_Cu1000	2.94E-05	8.45E-05
CA_Cu1000	1.54E-05	2.73E-05
Cu10,000	1.47E-04	-
NTC_Cu10,000	3.71E-05	-
CA_Cu10,000	9.58E-05	-

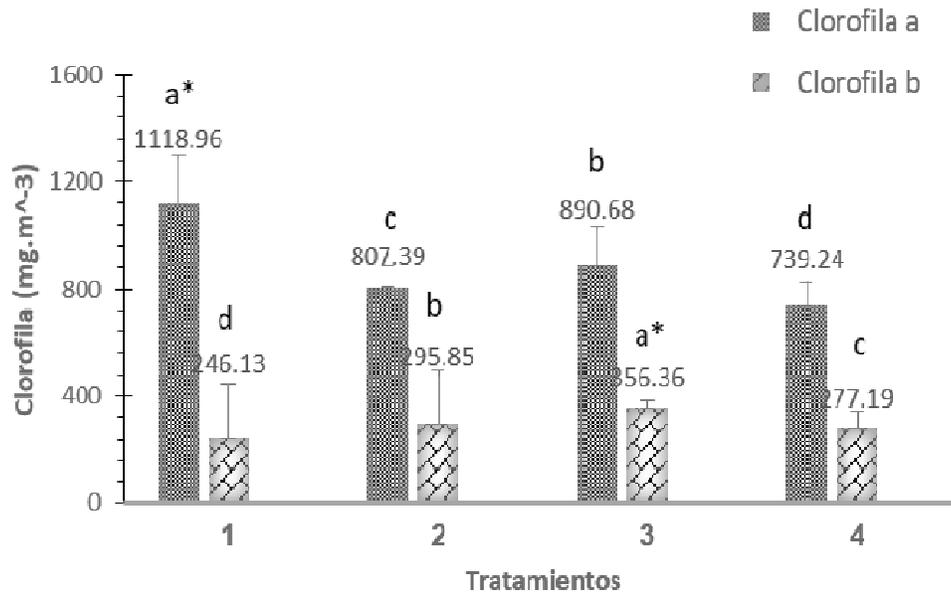
NTCPM: nanotubos de carbono de pared múltiple; CA: carbón activado; Cu: cobre (II) a diferentes concentraciones en mg/Kg.

El FBd de Cu (II) lixiviado del suelo fitorremediado con *B. juncea* se muestra en la tabla 3, obteniendo valores muy bajos, lo que es muy aceptable evitando así que el Cu (II) biodisponible lixiviado pueda entrar en mantos acuíferos en grandes cantidades y depositarse en algunas otras zonas (González-Flores *et al.*, 2011). En el caso de los lixiviados de los tratamientos a 1000 mg/Kg de Cu (II) con NTCPM y CA, se ve un aumento en el FBd con el uso de NTCPM 2.94E-05 a diferencia del uso de CA que disminuye a 1.54E-05 en comparación del suelo contaminado con Cu (II) sin las enmiendas 1.92E-05. A diferencia del FBd encontrado en lixiviados sin el uso de *B. juncea* los valores son bajos, pero se mostraron más altos en comparación de cuando se utilizó *B. juncea* en los tratamientos. Sin embargo se comporta de la misma manera, donde los NTCPM tienen el valor más alto 8.45E-05 en comparación con CA 2.73E-05.



Determinación del efecto que causan los NTCPM y CA en tejidos de *B. juncea*

Figura 7. Concentración clorofila a y b en hojas verdaderas de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado con Cu (II).



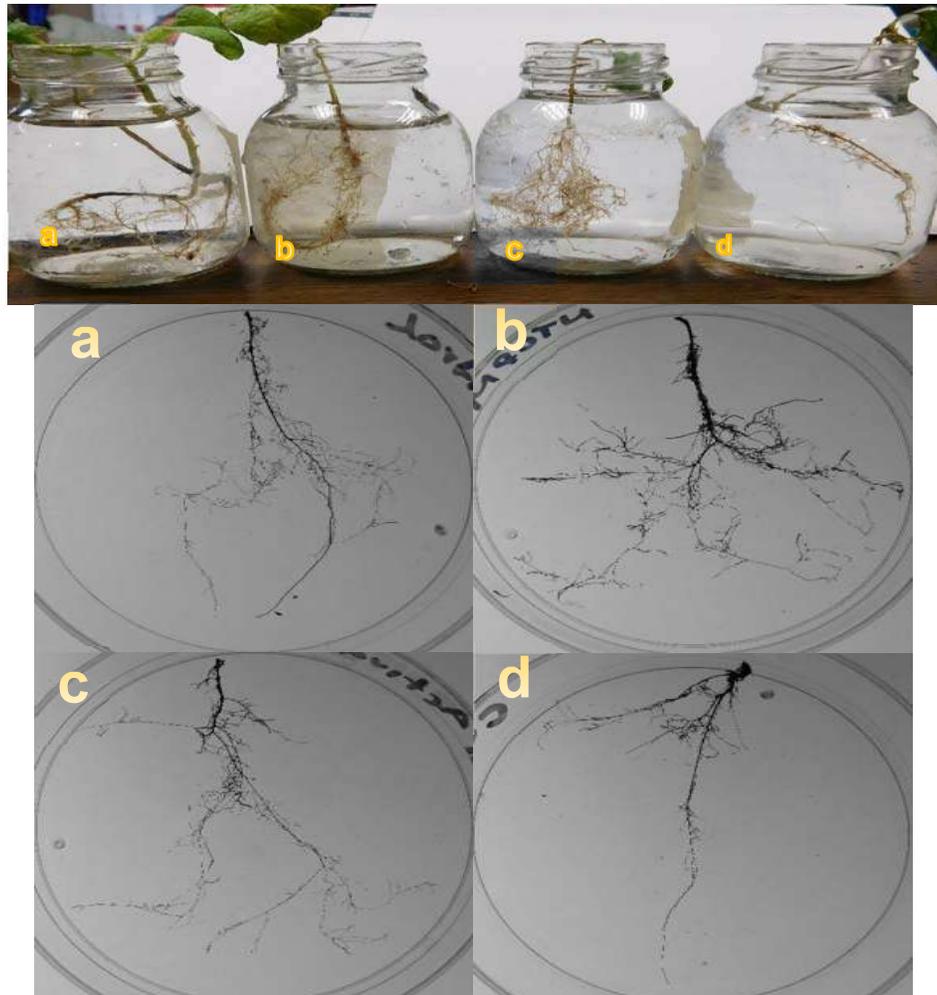
1) Control. 2) En suelo con Nanotubos de carbono de pared múltiple 95% de pureza más cobre 1000mg/Kg. 3) En suelo con Carbón activado más cobre 1000 mg/Kg. 4) En suelo con Cobre 1000 mg/Kg. Prueba Tukey (0.05)*. Letras iguales, no muestran diferencia significativa.

En la figura 7, se muestra la concentración de clorofila a y b contenida en las hojas verdaderas de *B. juncea* potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado con 1000 mg/Kg de Cu (II). Se observó que existió disminución de clorofila a en todos los tratamientos con respecto al control, sin embargo por el uso de las enmiendas se redujo el estrés causado por Cu (II), estadísticamente todos los tratamientos presentan diferencias significativas. García *et al.*, 2011 menciona que algunas plantas utilizan como respuesta fisiológica la defensa antioxidante al estrés por Cu (II) con una reducción de pigmentos, esta reducción en las concentraciones de pigmentos fotosintéticos pueden ser el resultado del efecto directo de los iones de Cu (II) que pueden inhibir la síntesis de la clorofila y carotenoides, por lo que la disminución de clorofila a está relacionada a que 1000



mg/Kg de Cu (II) afectan la producción normal de clorofila en *B. juncea* esta respuesta fisiológica pudo representar el máximo esfuerzo de esta especie para sobrevivir ante las condiciones de estrés a la cual fue sometida (Madera-Parra *et al.*, 2014), ya que se mostró una disminución del pigmento con respecto al control.

Figura 8. Raíz de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado con Cu (II).



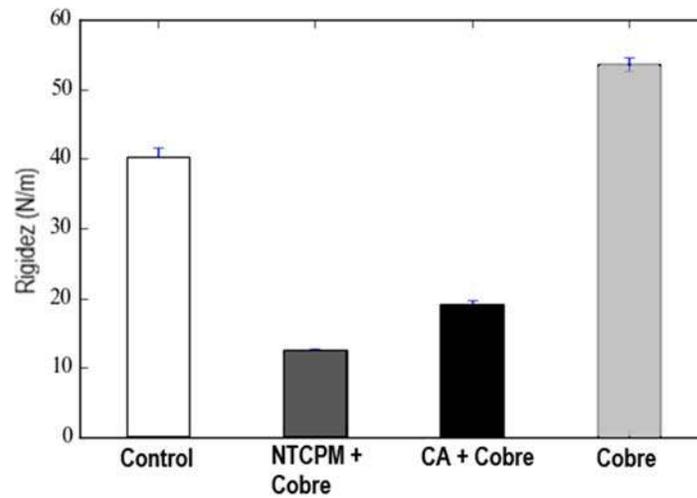
Tratamientos aplicados en suelo; raíces lavadas para su análisis. a) Raíz control; b) Raíz tratada con NTCPM y 1000 mg/Kg de Cu (II); c) Raíz tratada con CA 1000 mg/Kg de Cu (II); d) Raíz contaminada con 1000 mg/Kg de Cu (II).



Se analizó el ápice de raíz por la microscopia de fuerza atómica (AFM), NT-MDT Spectrum Instruments® asistido por la MC. Maricela Rodríguez-Nieto, del IIFM, para conocer el efecto de rigidez en la pared celular que pudieron causar el uso de NTCPM y CA, así como el Cu (II), ya que se observó a simple vista que con el uso de NTCPM se incrementaban las ramificaciones en la raíz de *B. juncea*, figura 8. Este incremento en la biomasa de raíz por el uso de NTCPM fue mayor comparada con el control, sin embargo se observó que el Cu (II) sin el uso de NTCPM o CA, como contaminante redujo el crecimiento de la raíz. En la figura 12, se muestra la pared del ápice de raíz de *B. juncea* en 3D, donde se observan las deformaciones que causan los diferentes tratamientos y la magnitud por lo que con el método de Oliver y Pharr (1992), en el equipo de AFM se pudo determinar la rigidez (figura 9), dureza (figura 10) y elasticidad (figura 11) del ápice de raíz de *B. juncea* de los tratamientos con NTCPM y CA a una concentración de Cu (II) de 1000 mg/Kg, obteniendo que la raíz en presencia del contaminante Cu (II) aumentó la rigidez y dureza de la pared celular, pero con el uso de NTCPM y CA tanto la rigidez como la dureza fueron disminuidas incluso más que en el control; algunas de las causas de reducción de crecimiento radicular por la toxicidad de MP es la rigidez y elasticidad, dado que las membranas y la pared celular sufren cambios en las propiedades de semipermeabilidad y de transporte, así como de extensibilidad y crecimiento (Barcelo y Poschenrieder, 1992). Martínez-Ballesta, (2016) demostró que los efectos positivos de los nanomateriales artificiales en las plantas aumenta el porcentaje de longitud de la raíz y biomasa vegetativa con la participación de distintos procesos fisiológicos relacionados con el balance hídrico de la planta, la actividad fotosintética y el metabolismo del nitrógeno, además de que el exceso de partículas de metales ofrecía como resultado efectos tóxicos que implicaban una disminución del crecimiento y anomalías en la división celular ya que las nanopartículas de cobre/óxido de cobre (Cu/Cu₂O) bloquean los canales de agua y reducen la absorción de agua.

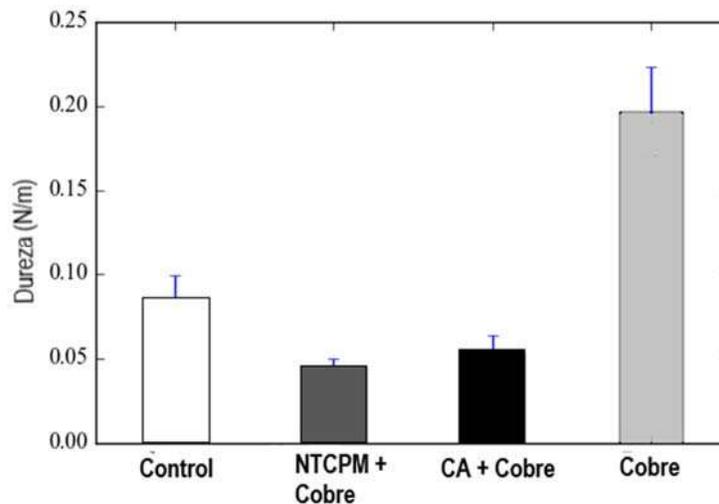


Figura 9. Rigidez de la pared del ápice de raíz de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en fitorremediación de suelo impactado por Cu (II).



a) Raíz control; b) Raíz tratada con NTCPM y 1000 mg/Kg de Cu (II); c) Raíz tratada con CA 1000 mg/Kg de Cu (II); d) Raíz contaminada con 1000 mg/Kg de Cu (II). Método de Oliver-Pharr en AFM.

Figura 10. Dureza de la pared del ápice de raíz de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en fitorremediación de suelo impactado por Cu (II).

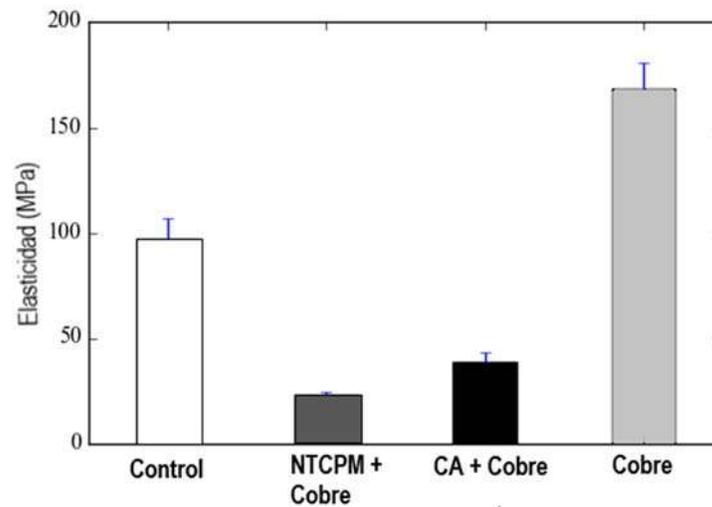


a) Raíz control; b) Raíz tratada con NTCPM y 1000 mg/Kg de Cu (II); c) Raíz tratada con CA y 1000 mg/Kg de Cu (II); d) Raíz contaminada con 1000 mg/Kg de Cu (II). Método de Oliver-Pharr en AFM.



La elasticidad fue mayor en la raíz tratada con 1000 mg/Kg de Cu (II), esto ya que una de las adaptaciones al estrés hídrico a nivel de tejidos es la capacidad de la planta para mantener la turgencia, puede ser obtenido por ajuste osmótico (aumento de solutos y/o disminución del volumen de agua simplástica) o por el aumento de la elasticidad de las paredes celulares (Silva y Acevedo, 1993).

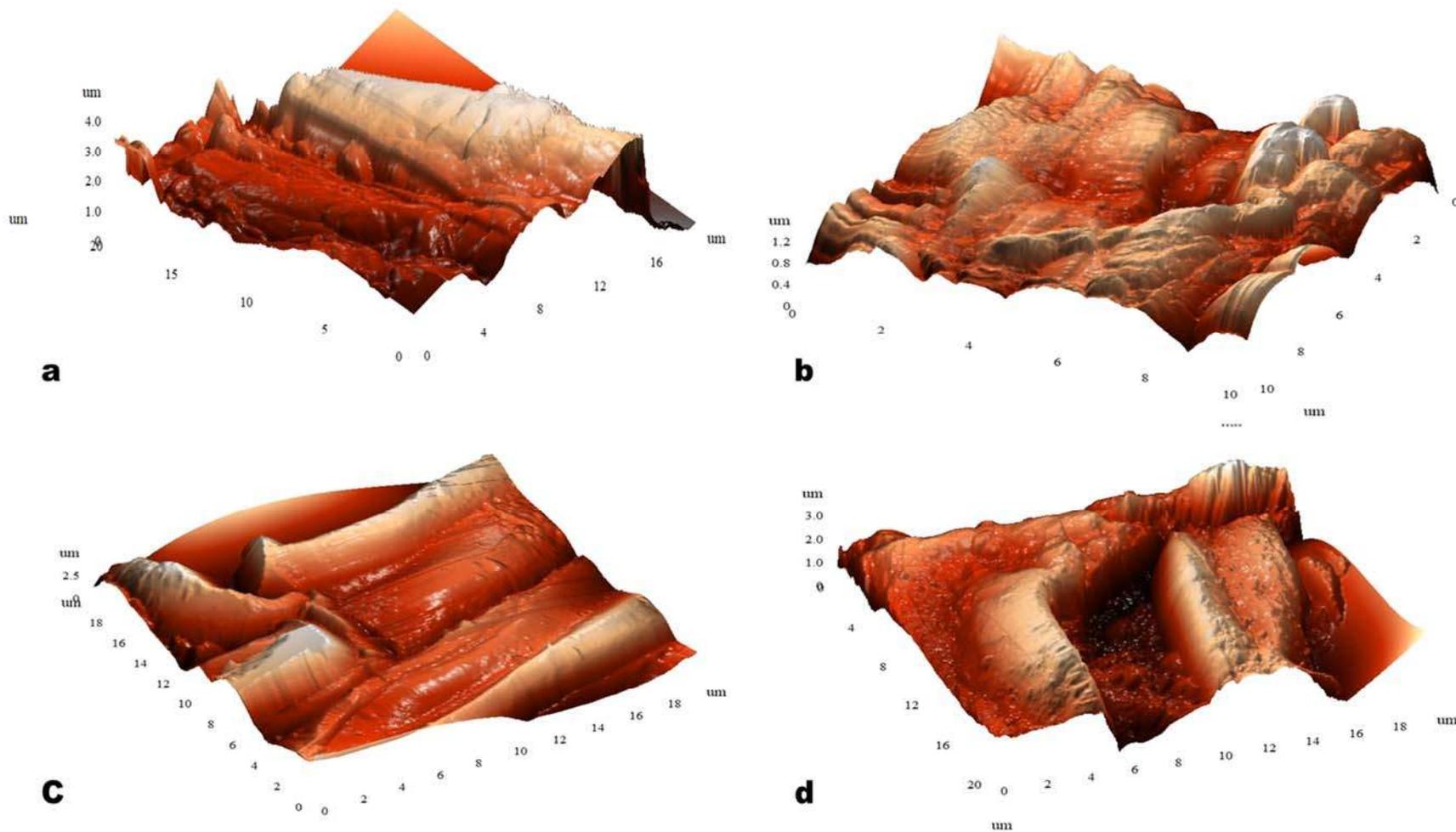
Figura 11. Elasticidad de la pared del ápice de raíz de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en fitorremediación de suelo impactado por Cu (II).



a) Raíz control; b) Raíz tratada con NTCPM y 1000 mg/Kg de Cu (II); c) Raíz tratada con CA 1000 mg/Kg de Cu (II); d) Raíz contaminada con 1000 mg/Kg de Cu (II). Método de Oliver-Pharr en AFM



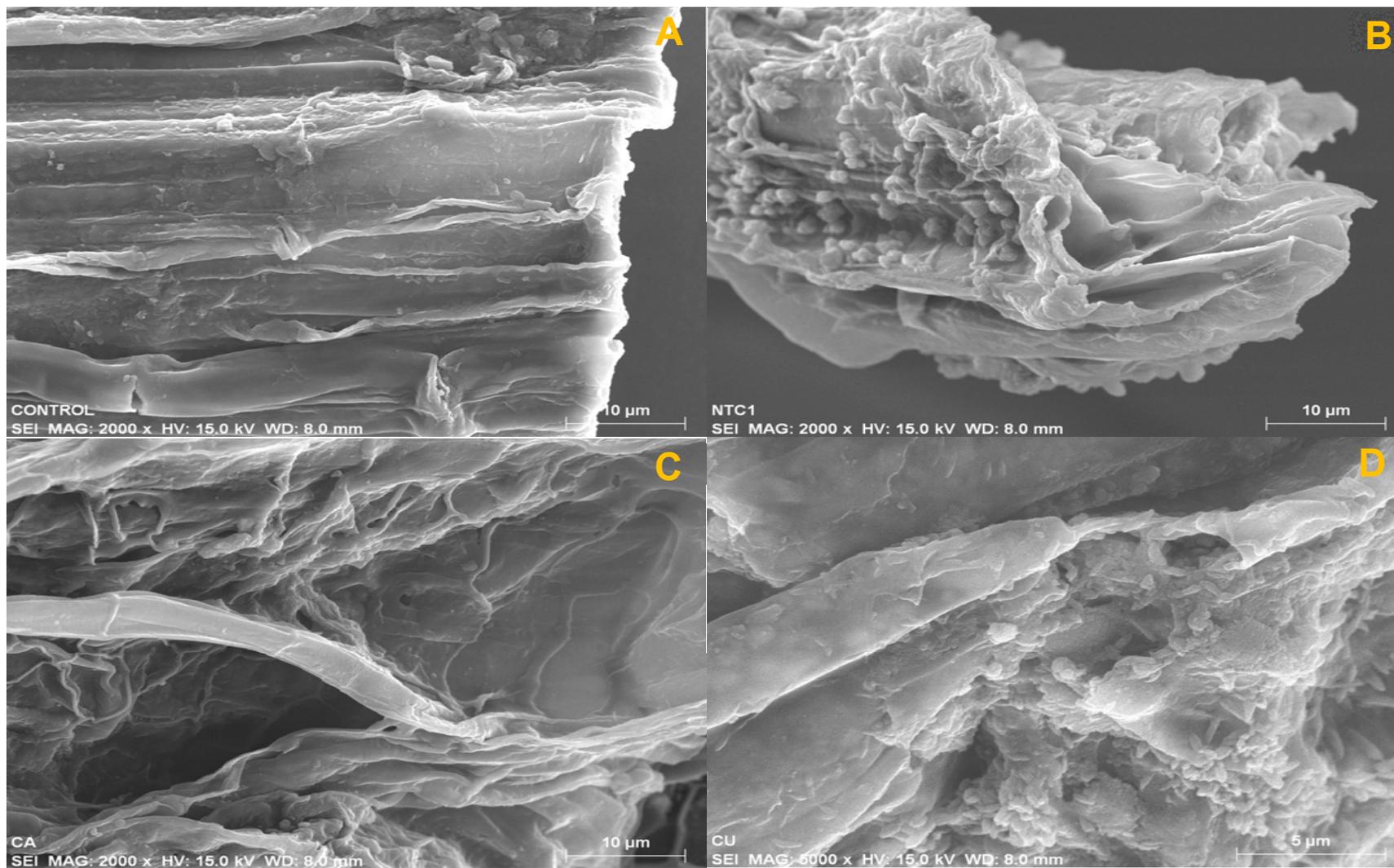
Figura 12. Imagen en 3D de ápice de raíz de *Brassica juncea* potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado con Cu (II).



a) Raíz control; b) Raíz tratada con NTCPM y 1000 mg/Kg de Cu (II); c) Raíz tratada con CA 1000 mg/Kg de Cu (II); d) Raíz contaminada con 1000 mg/Kg de Cu (II). Imagen tomada en microscopio de fuerza atómica.



Figura 13. Ápice de raíz de *Brassica juncea* observada a 10 μ m potenciada con NTCPM y CA en la fitorremediación de suelo contaminado con Cu (II).



a) Raíz control; b) Raíz tratada con NTCPM y 1000 mg/Kg de Cu (II); c) Raíz tratada con CA 1000 mg/Kg de Cu (II); d) Raíz contaminada con 1000 mg/Kg de Cu (II). Imagen tomada en microscopio electrónico de barrido.



En la figura 13, se observaron las imágenes de ápice de raíz de *B. juncea* por MEB a 2000X de los tratamientos de NTCPM, CA y contaminadas con 1000 mg/Kg de Cu (II). Se puede observar en la imagen A, que corresponde al control, que no se presentan deformaciones en la pared celular, a diferencia de la imagen B, que corresponde al tratamiento de NTCPM con 1000 mg/Kg de Cu (II), en el cual se observaron diversas formaciones esféricas, que posiblemente fueron causadas por los NTCPM que se utilizaron, además se pudo observar que en la punta del ápice de la raíz se formaban varios pliegues lo que podría sugerir la formación de nuevas ramificaciones radicales. En la imagen C, que corresponde al tratamiento de CA y 1000 mg/Kg de Cu (II) se pudieron notar algunas rugosidades pronunciadas sobre la pared del ápice de raíz. En la imagen D, que corresponde al ápice de raíz contaminada con 1000 mg/Kg de Cu (II), en la parte inferior derecha se pueden observar algunas partículas en formas cilíndricas alargadas y terminación esférica lo que sugiere que podría ser el atascamiento de Cu (II) sobre la pared del ápice. Algunos estudios microscópicos realizados por Wild y Jones (2009), demostraron **que no hay** internalización de NTC en las raíces de plantas; solo la adsorción en superficie fue evidente. Por lo tanto, los autores plantearon la hipótesis de que los NTCPM podrían imponer efectos indirectos en los sistemas de raíces de las plantas, tales como impedir las interacciones microbiana-raíz.



VIII. Conclusión

La FITO de suelo contaminado por Cu (II) por *B. juncea* fue mejorada con el uso de nanopartículas de carbono.

Un aspecto innovador en esta investigación fue el uso de NTCPM en la FITO de suelo por *B. juncea*, debido a que los NTCPM ofrecen enormes posibilidades para mejorar y aumentar la salud de la planta y en tal manera mejorar la FITO de suelos impactados por Cu (II). *B. juncea* es una HAM, en la cual se potenció su capacidad como fitoestabilizadora por NTCPM, lo que le permitió aumentar su biomasa en condiciones de suelo impactado por altas concentraciones de Cu (II), debido a que la mayor cantidad de Cu (II) fue acumulado en las raíces y atrapado por los sitios activos de los NTCPM impidiendo la entrada de altas concentraciones de Cu (II). Los NTCPM en *B. juncea* limitaron el transporte de Cu (II) a los tejidos aéreos, por lo cual brindan protección a *B. juncea* del estrés causado por las altas concentraciones de Cu (II).



IX. Bibliografía

Alam, M. N., Roy, N., Mandal, D., Begum, N. A. (2013). Green chemistry for nanochemistry: exploring medicinal plants for the biogenic synthesis of metal NPs with fine-tuned properties. *RSC Advances*, 3(30): 11935-11956.

Andrade, G. M. L., López L. L. I., Sáenz, G. A. (2012). Carbon nanotubes: functionalization and biological applications. *FCQ. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 36:50-52.

Andrés Colás, N. (2008). Caracterización de transportadores de cobre de *Arabidopsis thaliana*: efectos de la alteración de su expresión en plantas transgénicas. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. (Inédita)

Ayala, G. J. M., González, C. J. C., Alcalá-De Jesus, M., Rosas, M. S. (2014). Manual para el laboratorio de edafología laboratorio y campo. UMSNH. Facultad de Biología. Morelia Mich.
http://bios.biologia.umich.mx/obligatorias/ecologia/manual_laboratorio_edafologia2016-17.pdf

Barceló, J. and Poschenrieder, C. (2003). Fitorremediación: Principios y Perspectivas. *Contributions to Science*, 2(3): 333-344.

Barceló, J., & Poschenrieder, C. (1992). Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo y Planta*, 2(2), 345-361.

Bauddh, K., & Singh, R. P. (2012). Cadmium tolerance and its phytoremediation by two oil yielding plants *Ricinus communis* (L.) and *Brassica juncea* (L.) from the contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 14(8): 772-785.

Bruker (2013). Sample types and preparation TXRF. Germany.
<https://www.bruker.com/products/x-ray-diffraction-and-elemental-analysis/micro-xrf-and-txrf/s2-picofox/applications/sample-preparation-of-tissue.html>



Carrasco Marín, F., Maldonado Hódar, F. J., & Álvarez Merino, M. Á. (2014). Desarrollo y aplicaciones de materiales avanzados de carbón. Universidad Internacional de Andalucía. <http://hdl.handle.net/10334/3621>

Carvajal de la Haza, S. (2016). Efecto de la aplicación de ramnolípido en la fitoextracción de Cu^{2+} por plantas de *Hordeumvulgare* y *Brassica juncea* en suelo contaminados artificialmente. (Inédita).

Castillo O. S., (2011). Estudio de la absorción y transporte de Cu(II) en la planta micorrizada *Tagetes erecta* L. (cempasúchil): Implicaciones para la Fitorremediación. Tesis Doctoral. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Castro, J. L. P., Rojas, M. C. P., de Mesa, J. B. L. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Nova*, 2(2).

Chard, J. K., & Bugbee, B. (2005). SIMULATING THE FIELD: How to Grow Plants in Soil Columns in the Greenhouse. http://digitalcommons.usu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1007&context=cpl_techniquesinstruments

Chen, G., Qiu, J., Liu, Y., Jiang, R., Cai, S., Liu, Y., Ouyang, G. (2015). Carbon Nanotubes Act as Contaminant Carriers and Translocate within Plants. *Scientific Reports*, 5, 15682. <http://doi.org/10.1038/srep15682>

Clemente, R., Almela, C., Bernal, M. P. (2006). A remediation strategy based on active phytoremediation followed by natural attenuation in a soil contaminated by pyrite waste. *Environmental pollution*, 143(3), 397-406.

COFEPRIS (2006). Catálogo de plaguicidas. <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>



Cordero, A., y Ramírez, G. F. (1979). Acumulamiento de cobre en los suelos del Pacífico Sur de Costa Rica y sus efectos detrimentales en la agricultura. *Agronomía Costarricense*, 3(1), 63-78.

Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W. (1995). Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 13: 393-397.

Dasgupta-Schubert N., Alexander S., Sommer L., Whelan T., Alfaro Cuevas Villanueva R., Mendez Lopez M.E., Persans M.W. (2007b). The light quantum modulated physiological response of *Brassica Juncea* seedlings subjected to Ni(II) stress. *Engineering in the life sciences*, 7:259-267.

Dasgupta-Schubert, N., Méndez-López, M. E., Sánchez-Yáñez, J. M., Farías-Rodríguez, R., Madrigal-Sánchez, X. (2008). Fitorremediación e hiperacumuladores de metales: usando plantas para limpiar el ambiente. *Biorremediación (antología)*. Sanchez-Yañez, J. M. UMSNH, 13:978-970-95424-2-4.

Delgadillo-López, Angélica Evelin, González-Ramírez, César Abelardo, Prieto-García, Francisco, Villagómez-Ibarra, José Roberto, Acevedo-Sandoval, Otilio. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 14(2): 597-612.

EPA, 2017. Legislación Agentes ambientales Nanotecnología en Estados Unidos. https://ws003-universitatpolit.netdna-ssl.com/php_preencionintegral/sites/default/files/noticia/38894/field_adjuntos/august2017guidance8-7-2017002.pdf

Fernández, V. L. (2009). Nanomateriales basados en carbono (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Madrid). <https://dialnet.unirioja.es/servlet/dctes?codigo=31037>



Gadiou, R., Saadallah, S. E., Piquero, T., David, P., Parmentier, J., Vix-Guterl, C. (2005). The influence of textural properties on the adsorption of hydrogen on ordered nanostructured carbons. *Microporous and Mesoporous Materials*, 79(1): 121-128.

García, D. C., González-Mendoza, D., Cervantes-Díaz, L., Trejo, A. M., Juárez, O. G., Zamora-Bustillos, R. (2011). Respuesta fisiológica de *Euglenagracilis* al estrés por cobre. *Química Nova*, 34(7): 1211-1214.

Gaymard, F., Pilot, G., Lacombe, B., Bouchez, D., Bruneau, D., Boucherez, J., Sentenac, H. (1998). Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K⁺ release into the xylem sap. *Cell*, 94(5): 647-655.

Ghosh, M., & Singh, S. P. (2005). A Review on Phytoremediation of Heavy Metals and Utilization of It's by Products. *Asian Journal on Energy and Environment*, 6(04): 214-231.

Ginocchio, R., y Narvaez, J. (2002). Importancia de la forma química y de la matriz del sustrato en la toxicidad por cobre en *Noticastrumsericeum* (Less.) Less. ex Phil. *Revista chilena de historia natural*, 75(3): 603-612.

Gonzalez-Flores, E., Tornero-Campante, M. A., Sandoval-Castro, E., Pérez-Magaña, A., Gordillo-Martinez, A. J. (2011). Biodisponibilidad y fraccionamiento de metales pesados en suelos agrícolas enmendados con biosolidos de origen municipal. *Revista Internacional Contaminación Ambiental*. 27(4): 291-301.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía 2004. Guía para la Interpretación de Cartografía. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México. <http://www.inegi.org.mx/inegi/SPC/doc/INTERNET/EDAFI.pdf>

Jara-Peña, E., Gómez, J., Montoya, H., Chanco, M., Mariano, M., Cano, N. (2014). Capacidad fitorremediadora de cinco especies altoandinas de suelos contaminados con metales pesados. *Revista peruana de biología*, 21(2): 145-154.



Jiang, W., Liu, D., Liu, X. (2001). Effects of copper on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays*. *Biologia Plantarum*, 44(1): 105-109.

Kabata-Pendias A., Pendias H. (2000): Trace Elements in Soils and Plants. 3rd ed. CRC Press LLC, Boca Raton, London, New York, Washington D.C. 0-8493-1575-1

Karley, A. J., Leigh, R. A., Sanders, D. (2000). Where do all the ions go? The cellular basis of differential ion accumulation in leaf cells. *Trends in plant science*, 5(11): 465-470.

Kasim, W. A. (2006). Changes induced by copper and cadmium stress in the anatomy and grain yield of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *International Journal Agriculture Biology*, 8(1), 123-128.

Khodakovskaya, M. V., Kim, B. S., Kim, J. N., Alimohammadi, M., Dervishi, E., Mustafa, T., & Cernigla, C. E. (2013). Carbon nanotubes as plant growth regulators: effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. *Small*, 9(1): 115-123.

Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., Xu, Y., Li, Z., Watanabe, F., Biris, A. S. (2009). Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. *ACS nano*, 3(10): 3221-3227.

Khot, L. R., Sankaran, S., Maja, J. M., Ehsani, R., Schuster, E. W. (2012). Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review. *Crop protection*, 35: 64-70.

León-Morales, J. M. Sepúlveda-Jiménez, G. (2012). El daño por oxidación causado por cobre y la respuesta antioxidante de las plantas. *Interciencia* 37:805-811.

López Gómez, F. A., Alguacil, F. J., Álvarez Centeno, T., Cerpa Naranjo, A. (2014). Utilización de nanotubos de carbono para la eliminación de metales tóxicos en aguas. <http://abacus.universidadeuropea.es/handle/11268/3824>



López, E. A., y Solares, S. D. (2014). El microscopio de fuerza atómica: métodos y aplicaciones. Revista de la Universidad del Valle Guatemala, 14-28.

Lu, C., Chiu, H., Liu, C. (2006). Removal of zinc (II) from aqueous solution by purified carbon nanotubes: kinetics and equilibrium studies. Industrial & Engineering Chemistry Research, 45(8): 2850-2855.

MacFarlane, G. R., y Burchett, M. D. (2002). Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Marine Environmental Research, 54(1): 65-84.

Madera-Parra, Carlos A., Peña-Salamanca, Enrique J., & Solarte-Soto, Juliana A.. (2014). Efecto de la concentración de metales pesados en la respuesta fisiológica y capacidad de acumulación de metales de tres especies vegetales tropicales empleadas en la fitorremediación de lixiviados provenientes de rellenos sanitarios. Ingeniería y competitividad, 16(2): 179-188.

Marrero-Coto, J., Amores-Sánchez, I., Coto-Pérez, O. (2012). Fitorremediación, una tecnología que involucra a plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 46(3): 52-61.

Martínez-Ballesta, M. C., Zapata, L., Chalbi, N., Carvajal, M. (2016). Multiwalled carbon nanotubes enter broccoli cells enhancing growth and water uptake of plants exposed to salinity. Journal of nanobiotechnology, 14(1), 42.

Maubert, M., Soto, L., León, A. M., Flores, J. (2009). Nanotubos de Carbono-La era de la nanotecnología. Razón y palabra, 14(68).

Medina Marcos, K. D., Chávez, M., Nayclin, Y. (2014). Determinación del factor de Bioconcentración y Traslocación de metales pesados en el *Juncus arcticus* Willd y *Cortaderia rudiusscula* Stapf, de áreas contaminadas con el pasivo ambiental minero. (Inédita).



Melgarejo García, J., y Avella Portilla, F. (2011). Fungicidas: mecanismos de acción de los fungicidas. *Revista Ventana al Campo Andino*, 15: 193-2021657-5482.

Méndez, J. P., Ramírez, C. A. G., Gutiérrez, A. D. R., García, F. P. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 29-44.

Movahed, N., & Maeiyat, M. M. (2009). Phytoremediation and sustainable urban design methods. In 45th ISOCARP International Congress, Porto, Portugal, 18-22.

Mukherjee, A., Majumdar, S., Servin, A. D., Pagano, L., Dhankher, O. P., & White, J. C. (2016). Carbon nanomaterials in agriculture: a critical review. *Frontiers in plant science*, 7: 172.

NOM-021-RECNAT-2000. NORMA Oficial Mexicana, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/DO2280n.pdf>

NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. <https://www.gob.mx/profepa/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-147-semarnat-ssa1-2004>

Norkus, E., Vaiciuniene, J., Virbalytė, D. (2002). Interaction of copper (II) with cellulose pulp. *Chemija (Vilnius)*, 13: 75-84.

Núñez, R., Meas, Y., Ortega, R., Olgún, E. (2004). Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia. Revista de la Academia Mexicana Deficiencias*, 55: 69-82.



Oliver, W. C., y Pharr, G. M. (1992). An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Journal of materials research*, 7(6), 1564-1583.

Pasternak, T., Rudas, V., Potters, G., Jansen, M. A. (2005). Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 53: 299-314.

Peer, W., Baxter, I., Richards, E., Freeman, J., & Murphy, A. (2006). Phytoremediation and hyperaccumulator plants. *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification*. Springer, 84-84.

Peñarrubia, L., Andres-Colas, N., Moreno, J., and Puig, S. (2010) regulación del transporte de cobre en *Arabidopsis thaliana*: un oscilador bioquímico. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15(1): 29.

Pietrzak, U., y McPhail, D. C. (2004). Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. *Geoderma*, 122(2): 151-166.

Pilon-Smits, E., y Pilon, M. (2002). Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Critical reviews in plant sciences*, 21(5), 439-456.

Prieto M.J., González R. C.A., Román G. A.D. y Prieto G.F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropic. Subtropic. Agroecosyst.* 10: 29-44.

Puerto Rodríguez, A. M., Suárez Tamayo, S., & Palacio Estrada, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3): 372-387.

Riffo Estay, C. A. (2016). Transferencia de metales pesados Cu, Pb, Zn, Ni, Co y Cr desde un suelo de la comuna de Talcahuano a las plantas *Salicornia* y *Lolium Perenne*. Universidad Católica de la Santísima Concepción (Inédita).



Robinson, B. H., Chiarucci, A., Brooks, R. R., Petit, D., Kirkman, J. H., Gregg, P. E. H., De Dominicis, V. (1997). The nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii* as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. *Journal of Geochemical Exploration*, 59(2): 75-86.

Rodríguez-Reinoso, F. (1998). The role of carbon materials in heterogeneous catalysis. *Carbon*, 36(3): 159-175.

Rubio, D. I. C., Calderón, R. A. M., Gualtero, A. P., Acosta, D. R., Rojas, I. J. S. (2015). Tratamientos para la Remoción de Metales Pesados Comúnmente Presentes en Aguas Residuales Industriales. Una Revisión. *Ingeniería y Región*, 13(1): 73-90.

Sánchez-Yáñez, J. M. (2011). Estrategias contra la contaminación ambiental. *Ecología y medio ambiente*. pp 154-156. Libros en red. www.librosenred.com

Sarabia Meléndez, I. F., Cisneros Almazán, R., Aceves De Alba, J., Durán García, H. M., Castro Larragoitia, J. (2011). Calidad del agua de riego en suelos agrícolas y cultivos del Valle de San Luis Potosí, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 27(2), 103-113.

Sheoran, I. S., Aggarwal, N., Singh, R. (1990). Effects of cadmium and nickel on in vivo carbon dioxide exchange rate of pigeon pea (*Cajanuscajan L.*). *Plant and soil*, 129(2): 243-249.

Silva Arroyave, Sandra Milena, & Correa Restrepo, Francisco Javier. (2009). Análisis de la contaminación del suelo: revisión de la normativa y posibilidades de regulación económica. *Semestre Económico*, 12(23), 13-34.

Silva, H., & Acevedo, E. (1993). Relaciones hídricas de *Atriplex repanda* Phil., a dos niveles de disponibilidad de agua. *Revista Chilena de Historia Natural*, 66, 467-477.



Singh, O. V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., & Jain, R. K. (2003). Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied microbiology and biotechnology*, 5(61): 405-412.

Tiwari, D. K., Dasgupta-Schubert, N., Cendejas, L. V., Villegas, J., Montoya, L. C., Garcia, S. B. (2014). Interfacing carbon nanotubes (CNT) with plants: enhancement of growth, water and ionic nutrient uptake in maize (*Zea mays*) and implications for nanoagriculture. *Applied Nanoscience*, 4: 577-591.

Tiwari, D. K., Dasgupta-Schubert, N., Villasenor, L. M., Tripathi, D., Villegas, J. (2013). Interaction of carbon nanotubes with mineral nutrients for the promotion of growth of tomato seedlings. *Nano Studies*, 7: 87-96.

Trejo, J. A. V. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT, No. F/631.41 V6.

Turan, M., y Esringu, A. (2007). Phytoremediation based on canola (*Brassica napus* L.) and Indian mustard (*Brassica juncea* L.) planted on spiked soil by aliquot amount of Cd, Cu, Pb, and Zn. *PlantSoil and Environment*, 53(1): 7.

Vázquez Nin, G.H. y Echeverría, O.M., 2000. *Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas*. UNAM. Fondo de Cultura Económica, México D.F.

Vergara Sánchez, M. Á., Etchevers Barra, J. D., Padilla Cuevas, J. (2005). La fertilidad de los suelos de ladera de la sierra norte de Oaxaca, México. *Agrociencia*, 39(3): 259-266.

Vithanage, M., Herath, I., Almaroai, Y. A., Rajapaksha, A. U., Huang, L., Sung, J. K., Ok, Y. S. (2017). Effects of carbon nanotube and biochar on bioavailability of Pb, Cu and Sb in multi-metal contaminated soil. *Environmental Geochemistry and Health*, 1-12.



Wild, E., y Jones, K. C. (2009). Novel method for the direct visualization of in vivo nanomaterials and chemical interactions in plants. *Environmental science & technology*, 43(14), 5290-5294.

Wintz, H., Fox, T., Wu, Y. Y., Feng, V., Chen, W., Chang, H. S., Vulpe, C. (2003). Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48): 47644-47653.

Wolterbeek, H. T., y Van der Meer, A. J. G. M. (2002). Transport rate of arsenic, cadmium, copper and zinc in *Potamogeton pectinatus* L. radiotracer experiments with ^{76}As , $^{109,115}\text{Cd}$, ^{64}Cu and $^{65,69\text{m}}\text{Zn}$. *Science of the total environment*, 287(1): 13-30.

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.

Yu, J. G., Zhao, X. H., Yu, L. Y., Jiao, F. P., Jiang, J. H., Chen, X. Q. (2014). Removal, recovery and enrichment of metals from aqueous solutions using carbon nanotubes. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 299(3): 1155-1163.

Zhao, S., Liu, Q., Qi, Y., Duo, L. (2010). Responses of root growth and protective enzymes to copper stress in turfgrass. *Acta Biológica Cracoviensia Series Botánica*, 52(2): 7-11.

Zheng, M., y Diner, B. A. (2004). Solution redox chemistry of carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, 126(47): 15490-15494.



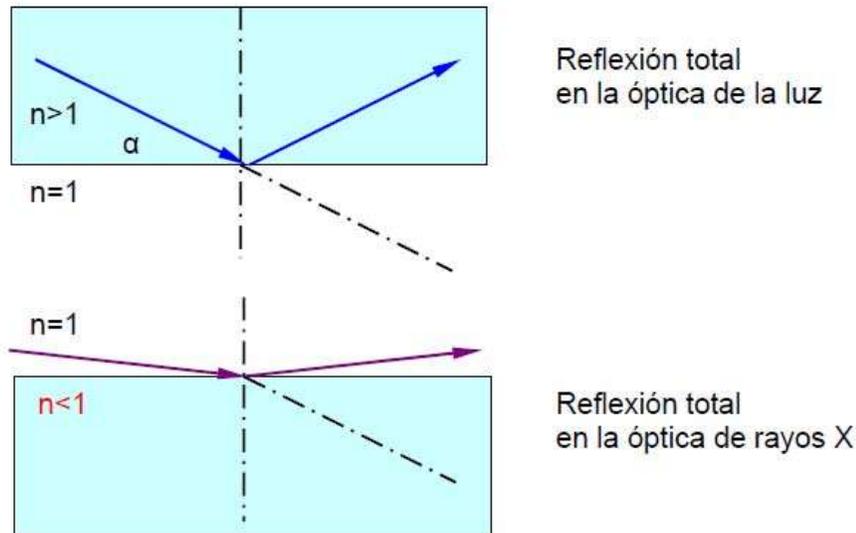
Anexo I. Análisis de fluorescencia de rayos X de reflexión total TXRF

El S2 PICOFOX es un equipo de sobremesa transportable para el rápido microanálisis multielemental cuantitativo y semicuantitativo de líquidos y sólidos, con límites de detección en el rango de partes por mil millones (ppb) a partes por millón (ppm), que resulta ideal para el análisis de trazas (Bruker, 2013).

Descripción del funcionamiento de la Reflexión total de la radiación X

En óptica, por reflexión total entendemos un efecto por el cual la luz, al pasar de un medio ópticamente más denso (índice de refracción más elevado) a un medio ópticamente más sutil, es reflejada de nuevo hacia el material con el índice de refracción más elevado (Figura 3). Es decir, para la radiación X la reflexión total se produce en el lado del vacío de la superficie de los cuerpos sólidos (Bruker, 2013).

Figura 3. Reflexión total en la óptica de la luz y en la de rayos X



En la óptica de la luz, materiales típicos como el cristal, el plástico o los líquidos tienen un índice de refracción mayor que el vacío, que tiene un índice de refracción 1. En este caso la reflexión total sólo se puede producir al pasar del material al vacío (o al aire). Lo dicho no es de aplicación a la interacción entre la radiación X y la materia. Para la radiación X, todo material es ópticamente más sutil que el vacío, es decir, el índice de refracción es < 1 .

El requisito indispensable para ello es que el ángulo de incidencia en la capa límite no supere un determinado ángulo crítico.

$$\alpha_{\text{crit}} = \arccos n_1/n_2$$

Donde α_{crit} es el ángulo crítico de la reflexión total; n_1 , el índice de refracción del material ópticamente más sutil; y n_2 , el índice de refracción del material ópticamente más denso. En el caso del cristal de cuarzo, por ejemplo, para un ángulo $\alpha < 46,7^\circ$ se produce reflexión total en la capa límite cristal/aire.

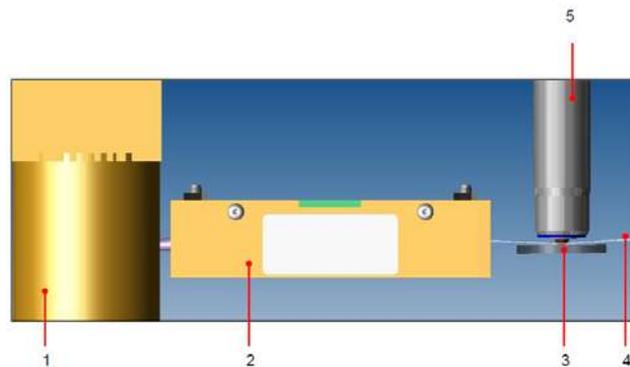
El ángulo crítico de la reflexión total desempeña un papel fundamental en el TXRF. Sólo cuando el ángulo de incidencia de la radiación de excitación sobre el porta muestras es menor que el ángulo crítico para esa energía y para el material de ese portamuestras.

El método de medición del TXRF



El análisis de fluorescencia de rayos X de reflexión total (TXRF) es una forma especial, relativamente joven, de análisis de fluorescencia de rayos X que, como tecnología disponible comercialmente, existe tan sólo desde finales de los años ochenta. La figura 4 muestra la disposición de los principales componentes y la focalización del haz en el TXRF.

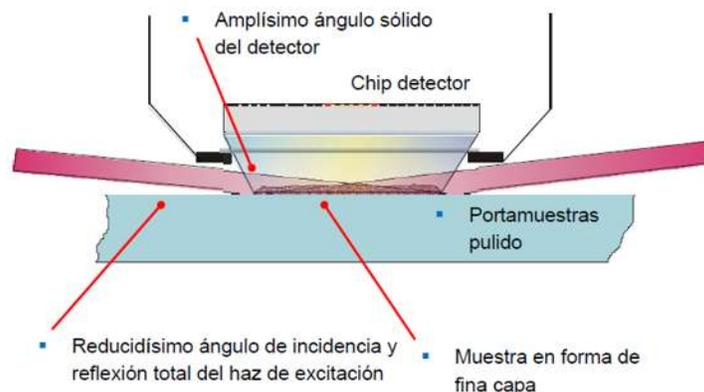
Figura 4. Disposición de los componentes en el TXRF



1: Tubo de rayos X, 2: Monocromador, 3: Portamuestras con la muestra, 4: Haz de excitación reflejado, 5: Detector

En el TXRF se aprovecha también el principio físico fundamental del análisis de fluorescencia de rayos X de energía dispersiva. En comparación con la XRF convencional hay, no obstante, algunas diferencias fundamentales en lo que respecta a la geometría de excitación y detección, así como a la preparación de las muestras (Figura 5).

Figura 5. Las particularidades geométricas más importantes en el TXRF





De ello se derivan las siguientes ventajas:

- a) Mediante la reflexión del haz de excitación sobre la superficie del portamuestras se produce una doble excitación del material de la muestra. Este efecto contribuye a la elevada sensibilidad del método.
- b) Debido a la escasísima distancia existente entre la muestra y el detector, la fluorescencia de la muestra se detecta con gran eficacia. Ello, a su vez, contribuye a garantizar una elevada sensibilidad absoluta del método.
- c) Dado que la muestra se analiza bajo la forma de una fina capa, los efectos de excitación secundarios y terciarios en el interior de la muestra que conocemos del análisis de fluorescencia de rayos X convencional no llegan a aparecer. Ello implica que las sensibilidades elementales relativas son una función del equipo y no dependen de la composición de la muestra. De ello se deriva la gran ventaja de poder llevar a cabo una determinación cuantitativa de los elementos con ayuda de un estándar interno (Bruker, 2013).

Anexo II. Caracterización físico-química de suelo para crecimiento de *B. juncea*

Tabla 1. Propiedades físico-químicas de cuatro muestras diferentes de suelo, para el crecimiento de *Brassica juncea*

Suelo	"tierra negra"	Suelo andosol	Bosque de encino	Suelo vertisol
Textura	Sin textura	Franco limoso	Franco	Franco arenoso
% Arenas	46.8	42	60.4	54.4
% Limos	38	30	30	28
% Arcillas	7.6	27	9.6	17.6
Materia Orgánica (%)	15.13	6.13	23.23	7.30
Carbono Orgánico (%)	8.77	3.56	19.78	4.23
Densidad (gcm ⁻³)				
Real	2.11	2.3	1.53	2.29
Aparente	0.61	0.9	0.41	1.09
Porosidad (%)	71	61.77	73.35	52.57



pH	5.32	5.4	6.16	7.11
Bases Intercambiables (cmol/Kg)				
Calcio	3.33	12.54	0	32.74
Magnesio	0	0.57	0	5.55
Capacidad de Intercambio Catiónico (cmol/Kg)	26.95	9.99	0	33.69

De acuerdo a las propiedades fisicoquímicas obtenidas de las muestras de suelos, La textura de acuerdo al porcentaje de arenas, limos y arcillas es para suelo andosol franco limoso y suelo vertisol franco arenoso. Los cuatro suelos son ricos en MO (NOM-021-RECNAT-2000). Por otro lado la densidad real y aparente confirma la textura de cada muestra, ya que la porosidad para un suelo franco arenoso corresponde a más del 50%. El pH 5.32, 5.4 y 6.16 que corresponden a nutrigarden, andosol y suelo con material orgánico de bosque de encino respectivamente, son ácidos, mientras que vertisol es neutro. El contenido de BI es intermedia, según la NOM-021-RECNAT-2000, excepto para el suelo vertisol que rebasa los parámetros establecidos, teniendo para calcio 32.74 y para magnesio 5.55cmol/kg; considerándose alta.

Tabla 2. Propiedades de la composición del sustrato artificial del CINVESTAV Irapuato.

	Perlita	PeatMoss	Vermiculita
Densidad	135 g/L	60-300 g/L	120 g/L
Retención de Humedad	45 %	48 %	35 %
Poros	35 %	20 %	25 %
Materia sólida	20 %	32 %	40 %
Esterilidad	Muy alta	Media	Alta
Durabilidad	3 años	1 año	1 año
Composición	Silicatos	Fibra vegetal	Mineral
pH	Neutro	Ácido	Neutro
Nutrientes	No	Si	No

La composición del sustrato preparado por el CINVESTAV Irapuato, la composición es 25% perlita, 50% peatmoss y 25% vermiculita, la retención de humedad es menor al 50%. La materia sólida y la porosidad son menores al 50% y por la naturaleza de



los compuestos perlita y vermiculita permite tener una esterilidad muy alta en el sustrato. El pH en peatmoss es ácido, mientras que perlita y vermiculita son neutros. Los nutrientes del sustrato son otorgados por peatmoss.

Anexo III. Retención de humedad en suelo contaminado por cobre (II) por nanotubos de carbono de pared múltiple y carbón activado.

	Tiempo de primer gota de agua residual	Volumen final (mL)	Tiempo de primer gota de agua residual	Volumen final (mL)
	Sin detergente		Con detergente	
	Primera fase			
Control	0:48:44	14.50±2.00	0:57:40	24.17±1.44
NTCPM	0:44:50	9.00±3.50	0:47:59	21.33±2.08
CA	0:36:23	9.67±2.52	0:56:23	20.00±2.65
Cu_1000	0:47:02	17.00±1.32	0:51:37	18.83±4.65
NTCPM_Cu_1000	0:44:34	11.17±2.75	0:58:50	19.67±3.51
CA_Cu_1000	1:03:00	12.00±1.80	1:02:23	23.00±2.65
	Segunda fase			
Control	0:11:31	42.00±3.46	0:15:12	31.33±10.89
NTCPM	0:07:44	40.00±1.00	0:16:43	27.00±2.65
CA	0:06:50	39.33±2.36	0:22:20	28.00±3.00
Cu_1000	0:07:47	47.50±2.50	0:13:13	26.50±3.77
NTCPM_Cu_1000	0:07:28	46.00±3.04	0:15:55	30.83±5.97



CA_Cu_1000	0:07:00	37.67±2.52	0:18:19	36.17±3.18
Tercera fase				
Control	0:01:47	12.67±1.04	0:01:52	16.00±0.87
NTCPM	0:02:01	10.33±0.29	0:02:09	16.33±1.15
CA	0:01:41	11.67±1.76	0:03:13	16.67±1.53
Cu_1000	0:01:03	13.50±1.32	0:01:58	15.50±1.80
NTCPM_Cu_1000	0:02:09	11.33±0.58	0:03:02	17.00±0.50
CA_Cu_1000	0:02:36	11.33±4.62	0:02:45	16.83±0.76

NTCPM: nanotubos de carbono de pared múltiple; CA: carbón activado; Cu: cobre (II) con las diferentes concentraciones en mg/Kg.

La retención de humedad por el uso de NTCPM y CA en suelo contaminado con Cu^{2+} a 1000mg/Kg, se presenta en tres fases (tabla 1), con y sin detergente en un periodo de 24h después del inicio de la primer gota de agua residual. De acuerdo a los valores obtenidos en la primera fase, para NTCPM, el uso de detergente (C/S) limitó las propiedades de retención hídrica, los tratamientos sin detergente (S/S) mostraron diferencias significativas con respecto del control y volumen de agua residual de Cu^{2+} . Los valores de NTCPM y CA con y sin detergente, mostraron una diferencia estadística $\pm 50\%$. La retención de humedad se observó en los tratamientos de NTCPM y CA S/S con 9mL y 9.67 mL respectivamente, los cuales muestran estadísticamente una diferencia significativa con respecto al control con 14.5 mL y el suelo con mg/Kg de Cu^{2+} 1000 siendo 17 mL, por lo que el uso de NTCPM y CA proporcionaron un mejoramiento en la retención de líquido. En la segunda fase, después de secar el suelo durante 48h a 60°C, se observó un aumento de volumen de agua residual en donde no se adicionó detergente, a diferencia de los suelos C/S donde la pérdida de la capacidad hídrica fue menor con una diferencia de 8.67mL hasta 16.67mL entre sus pares C/S y S/S en cada caso. La disminución de líquido se presentó nuevamente en los tratamientos con NTCPM y CA. En la tercera fase, el aumento de volumen de agua residual se siguió observando en los tratamientos C/S. Los NTCPM y el CA presentaron mejor retención de humedad en los tratamientos S/S. Estadísticamente no hay una diferencia significativa, pero se pudo observar que el Cu^{2+} aumentó ligeramente la lixiviación del suelo y en uso de NTCPM y CA una ligera disminución de ± 1 mL.



Anexo IV Análisis físico-químicos de suelo utilizado para fitorremediación por *B. juncea*

Tabla 1. Porcentaje de carbono y materia orgánica de los diferentes tratamientos utilizados para fitorremediación de suelo por *B. juncea*.

Muestra	% carbono orgánico		% materia orgánica			
	Suelo sin tratamientos					
Blanco	3.56±0.64			6.13±1.11		
	Suelo con el uso de NTCPM y CA					
		Diferencia con el blanco			Diferencia con el blanco	
Control	3.33±1.60	0.23		5.74±2.77	0.39	
NTCPM	4.69±1.39	-1.13		8.09±2.40	-1.96	
CA	2.88±0.11	0.68		4.96±0.18	1.17	
Cu 1000	3.03±0.11	0.53		5.22±0.18	0.91	
NTCPM Cu 1000	2.72±0.11	0.83		4.70±0.18	1.43	
CA Cu 1000	2.35±0.00	1.21		4.04±0.00	2.09	
	Suelo con tratamientos y <i>Brassica juncea</i>					
			Diferencia con suelo sin <i>B. juncea</i>			Diferencia con suelo sin <i>B. juncea</i>
Control	3.10±0.64	0.45	0.23	5.35±1.11	0.78	0.39



NTCPM	3.25±0.21	0.30	1.44	5.61±0.37	0.52	2.48
CA	4.01±0.64	-0.45	-1.13	6.91±1.11	-0.78	-1.96
Cu 10	3.33±0.53	0.23		5.74±0.92	0.39	
NTCPM Cu 10	3.18±0.11	0.38		5.48±0.18	0.65	
Ca Cu 10	4.01±0.86	-0.45		6.91±1.48	-0.78	
Cu 100	3.18±0.32	0.38		5.48±0.55	0.65	
NTCPM Cu 100	2.57±0.32	0.98		4.43±0.55	1.70	
Ca Cu 100	3.18±0.11	0.38		5.48±0.18	0.65	
Cu 1000	3.25±0.64	0.30	-0.23	5.61±1.11	0.52	-0.39
NTCPM Cu 1000	3.78±0.11	-0.23	-1.06	6.52±0.18	-0.39	-1.83
Ca Cu 1000	2.80±0.00	0.76	-0.45	4.83±0.00	1.30	-0.78
Cu 10,000	2.80±0.00	0.76		4.83±0.00	1.30	
NTCPM Cu 10,000	3.10±0.21	0.45		5.35±0.37	0.78	
Ca Cu 10,000	2.88±0.32	0.68		4.96±0.55	1.17	

NTCPM: nanotubos de carbono de pared múltiple; CA: carbón activado; Cu: cobre (II) con las diferentes concentraciones en mg/Kg.

Tabla 2. Análisis de bases intercambiables como calcio y magnesio de los diferentes tratamientos utilizados para fitorremediación de suelo por *B. juncea*.

Muestra	Calcio cmol(+).kg ⁻¹		Magnesio cmol(+).kg ⁻¹		
Suelo sin tratamientos					
	12.54±0.00		0.5±0.81		
Suelo con el uso de NTCPM y CA					
		Diferencia con el blanco		Diferencia con el blanco	
Control	11.40±0.00	1.14	1.71±2.42	-1.14	
NTCPM	11.40±0.00	1.14	4.56±0.00	-3.99	
CA	9.69±0.81	2.85	3.99±0.81	-3.42	
Cu 1000	10.83±0.81	1.71	3.42±1.61	-2.85	
NTCPM Cu 1000	10.83±0.81	1.71	2.28±0.00	-1.71	
CA Cu 1000	10.83±0.81	1.71	4.56±1.61	-3.99	
Suelo con tratamientos y <i>Brassica juncea</i>					
			Diferencia con suelo sin <i>B. juncea</i>		Diferencia con suelo sin <i>B. juncea</i>
Control	11.40±0.00	1.14	0.00	1.71±2.42	-1.14
NTCPM	8.55±2.42	3.99	2.85	6.27±5.64	-5.70
CA	9.69±0.81	2.85	0.00	3.99±0.81	-3.42
Cu 10	8.55±2.42	3.99		3.99±0.81	-3.42



NTCPM Cu 10	9.12±1.61	3.42		2.85±0.81	-2.28	
Ca Cu 10	9.12±1.61	3.42		3.99±4.03	-3.42	
Cu 100	7.98±1.61	4.56		6.84±0.00	-6.27	
NTCPM Cu 100	11.40±0.00	1.14		2.28±1.61	-1.71	
Ca Cu 100	10.83±0.81	1.71		3.99±0.81	-3.42	
Cu 1000	9.69±2.42	2.85	1.14	3.99±0.81	-3.42	-0.57
NTCPM Cu 1000	11.40±0.00	1.14	-0.57	3.42±0.00	-2.85	-1.14
Ca Cu 1000	11.40±0.00	1.14	-0.57	2.85±4.03	-2.28	1.71
Cu 10,000	9.69±0.81	2.85		3.42±1.61	-2.85	
NTCPM Cu 10,000	9.12±1.61	3.42		6.84±3.22	-6.27	
Ca Cu 10,000	7.98±1.61	4.56		6.84±1.61	-6.27	

NTCPM: nanotubos de carbono de pared múltiple; CA: carbón activado; Cu: cobre (II) con las diferentes concentraciones en mg/Kg.

Tabla 3. Análisis correspondientes a capacidad de intercambio catiónico y pH de los diferentes tratamientos utilizados para fitorremediación de suelo por *B. juncea*.

Muestra	Capacidad de intercambio Catiónico cmol(+).kg ⁻¹			pH		
Suelo sin tratamientos						
	9.99±0.00			5.39±0.06		
Suelo con el uso de NTCPM y CA						
		Diferencia con el blanco			Diferencia con el blanco	
Control	18.87±1.57	-8.88		5.58±0.01	-0.19	
NTCPM	19.98±1.57	-9.99		5.60±0.04	-0.21	
CA	12.21±3.14	-2.22		5.40±0.14	-0.01	
Cu 1000	17.76±3.14	-7.77		5.45±0.11	-0.06	
NTCPM Cu 1000	18.87±3.14	-8.88		5.60±2.72	-0.21	
CA Cu 1000	22.76±0.78	-12.77		5.40±0.14	-0.01	
Suelo con tratamientos y <i>Brassica juncea</i>						
			Diferencia con suelo sin <i>B. juncea</i>			Diferencia con suelo sin <i>B. juncea</i>
Control	18.87±1.57	-8.88	0.00	5.45±0.05	-0.06	0.13



NTCPM	20.54±0.78	-10.55	-0.55	5.24±0.28	0.15	0.36
CA	12.21±3.14	-2.22	0.00	5.18±0.07	0.21	0.22
Cu 10	23.87±3.92	-13.88		5.34±0.06	0.05	
NTCPM Cu 10	17.21±3.92	-7.22		5.39±0.06	0.00	
Ca Cu 10	14.99±5.49	-4.99		5.26±0.02	0.13	
Cu 100	14.43±0.00	-4.44		5.35±0.20	0.04	
NTCPM Cu 100	12.21±7.85	-2.22		5.46±0.21	-0.07	
Ca Cu 100	21.09±10.99	-11.10		5.29±0.23	0.10	
Cu 1000	19.43±5.49	-9.44	-1.66	5.35±0.01	0.04	0.10
NTCPM Cu 1000	16.10±2.35	-6.11	2.77	5.22±0.04	0.17	0.38
Ca Cu 1000	15.54±3.14	-5.55	7.21	5.41±0.06	-0.02	-0.01
Cu 10,000	13.32±1.57	-3.33		5.27±0.06	0.12	
NTCPM Cu 10,000	12.77±0.78	-2.77		5.28±0.05	0.11	
Ca Cu 10,000	12.77±0.78	-2.78		5.33±0.07	0.06	

NTCPM: nanotubos de carbono de pared múltiple; CA: carbón activado; Cu: cobre (II) con las diferentes concentraciones en mg/Kg.

Tabla 4. Densidad real y aparente de los diferentes tratamientos para suelo fitorremediado por *B. juncea*.

Muestra	Densidad real (g.cm ⁻³)			Densidad aparente (g.cm ⁻³)		
Suelo sin tratamientos						
	0.83±0.00		0.90±0.00			
Suelo con el uso de NTCPM y CA						
		Diferencia con el blanco			Diferencia con el blanco	
Control	0.83±0.00	0.00		0.98±0.03	-0.08	
NTCPM	0.83±0.00	0.00		0.93±0.02	-0.03	
CA	0.83±0.01	-0.01		0.93±0.01	-0.03	
Cu 1000	0.83±0.00	0.00		0.89±0.02	0.01	
NTCPM Cu 1000	0.83±0.00	0.00		0.97±0.02	-0.07	
CA Cu 1000	0.83±0.00	0.00		0.95±0.01	-0.05	
Suelo con tratamientos y <i>Brassica juncea</i>						
			Diferencia con suelo sin <i>B. juncea</i>			Diferencia con suelo sin <i>B. juncea</i>
Control	0.84±0.01	-0.01	-0.01	0.86±0.02	0.04	0.12
NTCPM	0.85±0.00	-0.02	-0.02	0.90±0.01	0.00	0.03



CA	0.83±0.00	0.00	0.00	0.84±0.00	0.06	0.09
Cu 10	0.84±0.01	-0.01		0.84±0.03	0.06	
NTCPM Cu 10	0.83±0.00	0.00		0.86±0.02	0.04	
Ca Cu 10	0.84±0.01	-0.01		0.87±0.02	0.03	
Cu 100	0.84±0.02	-0.01		0.92±0.04	-0.02	
NTCPM Cu 100	0.83±0.00	0.00		0.84±0.03	0.06	
Ca Cu 100	0.85±0.85	-0.02		0.87±0.87	0.03	
Cu 1000	0.83±0.00	0.00	0.00	0.88±0.00	0.02	0.01
NTCPM Cu 1000	0.83±0.01	0.00	0.00	0.79±0.02	0.11	0.18
Ca Cu 1000	0.83±0.00	0.00	0.00	0.86±0.02	0.04	0.09
Cu 10,000	0.83±0.00	0.00		0.84±0.07	0.06	
NTCPM Cu 10,000	0.83±0.00	0.00		0.85±0.08	0.05	
Ca Cu 10,000	0.83±0.00	0.00		0.79±0.01	0.11	

NTCPM: nanotubos de carbono de pared múltiple; CA: carbón activado; Cu: cobre (II) con las diferentes concentraciones en mg/Kg.

Tabla 5. Análisis correspondientes a textura de los diferentes tratamientos utilizados para fitorremediación de suelo por *B. juncea*.

Muestra	Textura					
	Arcillas (%)		Arenas (%)		limos	
	Suelo sin tratamientos					
Blanco	23		49		28	
	Suelo con el uso de NTCPM y CA					
		Diferencia con el blanco		Diferencia con el blanco		Diferencia con el blanco
Control	29	-6	43	6	28	0
NTCPM	29	-6	45	4	26	2
CA	29	-6	43	6	28	0
Cu 1000	29.6	-6.6	41	8	29.4	-1.4
NTCPM Cu 1000	29	-6	45	4	26	2
CA Cu 1000	29	-6	49	0	22	6
	Suelo con tratamientos y <i>Brassica juncea</i>					
		Diferencia con suelo sin <i>B. juncea</i>		Diferencia con suelo sin <i>B. juncea</i>		Diferencia con suelo sin <i>B. juncea</i>



Control	27	-4	2	49	0	-6	24	4	4
NTCPM	25	-2	4	49	0	-4	26	2	0
CA	25	-2	4	44.4	4.6	-1.4	30.6	-2.6	-2.6
Cu 10	27	-4		43	6		30	-2	
NTCPM Cu 10	25	-2		41	8		34	-6	
Ca Cu 10	25	-2		47	2		28	0	
Cu 100	27	-4		45	4		28	0	
NTCPM Cu 100	27	-4		49	0		24	4	
Ca Cu 100	27	-4		45	4		28	0	
Cu 1000	27	-4	2.6	47	2	-6	26	2	3.4
NTCPM Cu 1000	27	-4	2	39	10	6	34	-6	-8
Ca Cu 1000	27	-4	2	49	0	0	24	4	-2
Cu 10,000	27	-4		45	4		28	0	
NTCPM Cu 10,000	27	-4		47	2		26	2	
Ca Cu 10,000	25	-2		45	4		30	-2	

NTCPM: nanotubos de carbono de pared múltiple; CA: carbón activado; Cu: cobre (II) con las diferentes concentraciones en mg/Kg.

Las características iniciales del suelo de la comunidad de Atecuaro de acuerdo al porcentaje de arenas, limos y arcillas, corresponde, a un suelo franco, el suelo es rico en MO, $\geq 4.2\%$ es un contenido alto, la densidad real y aparente confirma la textura, ya que la porosidad corresponde a más del 50%. Con pH ácido: 5.4, con BI para Ca alta y Mg baja, con CIC baja (NOM-021-RECNAT-2000). Después de los tratamientos aplicados en el suelo las características físicas y químicas de suelo, no se vieron alteradas ya que siguen estando dentro de los parámetros de la norma, excepto la capacidad de intercambio catiónico donde el aumento es el doble respecto al blanco (suelo de Atecuaro sin tratar), el contenido de magnesio es dado por la solución multipropósito utilizada como solución mineral. El pH: ácido, y la textura fue un suelo franco y M.O. no presentaron cambios notables aun con contenido de NTCPM y CA y *B. juncea*.

Tabla 6. Formación de agregados.

Tamaño de malla



	2000 μ	1000 μ	500 μ	149 μ	<149 μ
Tratamientos	Suelo sin <i>B. juncea</i>				
Control	0.32±0.21	35.03±4.25	60.18±2.85	97.40±2.45	66.32±8.00
NTCPM	0.45±0.30	34.81±2.91	59.64±2.85	105.39±8.84	59.61±11.66
CA	0.69±0.21	45.32±3.14	68.84±1.13	104.73±4.74	41.71±2.24
Cu_1000	0.43±0.07	51.58±3.73	73.44±6.57	100.50±4.38	41.72±11.81
NTCPM_Cu_1000	0.63±0.36	43.81±6.65	66.87±2.47	109.72±5.18	39.00±4.73
CA_Cu_1000	0.49±0.15	47.36±6.21	69.47±5.97	103.85±5.13	41.88±7.16
	Suelo fitorremediado por <i>B. juncea</i>				
control	9.37±6.62	16.63±1.97	19.97±0.77	33.07±4.45	20.96±3.34
NTCPM	22.47±15.68	18.59±2.80	19.43±3.19	26.67±8.88	12.84±6.06
CA	19.77±6.06	17.66±3.76	20.46±2.70	29.27±1.23	12.83±1.60
Cu_10	10.96±13.68	17.53±1.86	21.46±3.10	33.27±7.40	16.77±4.30
NTCPM_Cu_10	22.14±19.15	18.90±1.87	19.47±3.12	27.07±9.35	12.42±5.34
CA+Cu 10	14.28±0.95	15.79±1.19	20.63±0.79	33.63±0.31	15.66±1.09
Cu_100	10.07±10.15	17.02±0.67	22.07±0.69	32.66±5.65	18.18±4.49
NTCPM_Cu_100	22.46±11.08	18.83±0.76	18.77±3.05	27.88±4.89	12.06±4.26
CA_Cu_100	11.45±3.84	18.76±1.90	22.13±1.39	32.35±3.45	15.31±1.95
Cu_1000	18.08±7.83	17.88±3.97	21.02±2.79	29.68±2.23	13.34±1.34
NTCPM_Cu_1000	24.66±10.96	22.41±6.21	23.74±6.42	30.39±10.21	24.12±5.57
CA_Cu_1000	30.35±10.31*	18.17±1.87	17.38±1.40	23.24±5.29	10.86±4.82
Cu_10,000	26.90±15.39	14.95±2.36	18.27±2.91	26.90±7.97	12.98±4.54
NTCPM_Cu_10,000	23.49±9.75	17.90±3.31	24.43±6.11	23.49±5.42	10.70±2.74
CA_Cu_10,000	19.99±7.34	18.64±1.51	20.73±0.90	27.59±4.01	13.04±2.93

NTCPM: nanotubos de carbono de pared múltiple; CA: carbón activado; Cu: cobre (II) con las diferentes concentraciones en mg/Kg.

Para obtener la cantidad de partículas de acuerdo a su tamaño se realiza la prueba con tamices de diferente diámetro de abertura. Donde el suelo de cada maceta columnar utilizado para FITO por *B. juncea* se pasó a través del tamiz #2000 (2mm) registrando el peso en gramos, seguido de tamiz #1000 y así sucesivamente hasta completar todos los diámetros de abertura de tamiz seleccionados.

El aumento de partículas de suelo por *B. juncea*, se concentra en las que son mayores o iguales a 2000 μ , y que se comprueban con el método de bouyoucos, en los cuales existe un aumento de arenas, en comparación con el suelo cuyas



características son naturales y sin tratamiento alguno, se puede observar que en la mayoría de los casos los tratamientos con CA tienen mejor respuesta a la formación de agregados, debido a que estudios demuestran que el CO del suelo tiene un efecto importante en la agregación de las partículas del suelo (Folletty Stewart, 1985), existiendo una relación entre tamaño de los agregados y contenido de COS (carbono orgánico en suelo). “Mientras mayor es el contenido de Carbono Orgánico en Suelo lábil, mayor es el tamaño de los agregados”, Martínez et al. 2008.