

# DESARROLLO DE MICROECONOMÍAS REGIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

## COSECHADOS EN SUELOS MINEROS - ATN/RF 16110

### Producto 8: Informe sobre Proyecto Piloto de remediación

Saran Anabel  
Fernández Lucia  
Merini Luciano

2021





Códigos JEL: Q16

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un programa de cooperación administrado por el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), pero con su propia membresía, estructura de gobernabilidad y activos. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo, FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por la Lic. Anabel Saran, la Lic. Lucia Fernandez y el Dr. Luciano Merini.

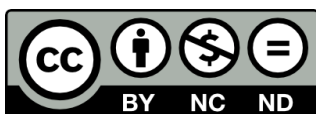
Copyright © 2021 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

**FONTAGRO**

Correo electrónico: [fontagro@fontagro.org](mailto:fontagro@fontagro.org)

[www.fontagro.org](http://www.fontagro.org)



## Resumen

En este piloto a campo de remediación, propusimos la implantación de *H. petiolaris*, en una antigua área de tiro en Argentina contaminada con 400 mg Kg<sup>-1</sup> de plomo (Pb). Las propiedades fisicoquímicas y la concentración de Pb, tanto total como biodisponible, en el área se caracterizaron para realizar el diseño experimental de revegetación. Durante el ensayo a campo, la supervivencia de las plantas, el desarrollo de biomasa vegetal y la acumulación de Pb en el tejido vegetal fueron monitoreados. Las plantas de *H. petiolaris* implantadas en el área contaminada de estudio acumularon en el tejido radicular alrededor de 195 y 304 mg Kg<sup>-1</sup> de Pb. Solo una pequeña fracción de Pb absorbido (10-14%) fue translocado a las partes aéreas de las plantas. En un solo ciclo de cultivo disminuyó el contenido de Pb biodisponible en el suelo entre un 28 y 45%. También se evaluó la diversidad de las comunidades rizo-microbianas y el metabolismo secundario de las plantas, específicamente el rendimiento y la composición de aceite esencial (AE) frente a la presencia de Pb en el suelo. El predominio del género *Serratia* en la rizósfera de las plantas cultivadas en el sitio contaminado podría ser considerado como un taxón indicador de la presencia de Pb en el suelo. La producción de AE estuvo altamente influenciada por la fracción de Pb disponible en el suelo, sin embargo, la composición del aceite no se vio afectada por la presencia de Pb en el suelo. Estas características hacen a *H. petiolaris* una especie vegetal candidata para fitoestabilizar y biogestionar suelos mineros contaminados con metales pesados, especialmente cuando no son adecuados para la implantación de otros cultivos comerciales convencionales. Este producto se enmarca en las actividades propuestas para el año 2018, 2019 y 2020.

### Palabras Clave:

Plomo, revegetación, comunidades rizo-microbianas.

## Información de Relevancia con una discusión técnica

Las áreas de tiro son la segunda fuente más grande de contaminación por Pb en los suelos, ya que entre 10 y 60.000 toneladas de balas se depositan anualmente en los suelos en diferentes países (Ahmad *et al.*, 2011). Los metales que constituyen las balas pueden infiltrarse en el terreno mediante procesos químicos como la oxidación, la carbonatación y la hidratación a través de acciones de meteorización del aire, el agua, los ácidos orgánicos y la actividad microbiana. En estos procesos, el pH del suelo receptor de los fragmentos de bala juega un rol muy importante (Ma *et al.*, 2007). Si el mismo es bajo (menor a 5), puede resultar en concentraciones elevadas de metales solubles en el suelo, el agua subterránea y el agua superficial (Sorvari *et al.*, 2006). Una bala está compuesta principalmente por un 90% de Pb, 2-7% de Sb, 0,5-2% de As, 0,5% de Ni y trazas de Ag (Ahmad *et al.*, 2012). Varios estudios han reportado contaminación de Pb en suelos de campos de tiro que exceden las concentraciones totales de 10.000 mg Kg<sup>-1</sup> (Cao *et al.*, 2009; Spuller *et al.*, 2007), siendo esta concentración ampliamente mayor a los niveles recomendados por US EPA de 400 mg Kg<sup>-1</sup> de Pb (US EPA 1996).

Las concentraciones elevadas de elementos como Pb en los suelos pueden afectar negativamente a las comunidades microbianas del suelo, las plantas, los animales y a la salud humana (Roman-Ponce *et al.*, 2016). El riesgo de transferencia de Pb a la cadena alimentaria es un problema grave (Robinson *et al.*, 2008), ya que muchas de estas áreas se utilizan para pastoreo después de su desmantelamiento y algunas incluso se utilizan para la producción de cultivos agrícolas (Kettler y Schenk, 2006). Los cereales, granos y vegetales (especialmente papas y vegetales de hoja) son los principales contribuyentes al ingreso de Pb en la alimentación de la población europea (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, 2012).

*Helianthus petiolaris* Nutt. es una especie vegetal anual naturalizada en Argentina, considerada el ancestro salvaje de *H. annuus* (Poverene *et al.*, 2004). Esta especie crece en suelos arenosos xéricos en el centro de América del Sur con un período de floración de diciembre a marzo (Rieseberg *et al.*, 2003). Además, esta especie tiene potencial para aplicaciones biotecnológicas, ya que sus aceites esenciales pueden usarse para el control de plagas en granos almacenados (Saran *et al.*, 2019). La combinación de tales características y las particularidades de su tolerancia a metales que describimos en ensayos previos de invernadero (Saran *et al.*, 2019), hacen de esta planta aromática una excelente candidata para diseñar estrategias de fitorremediación a campo.

### OBJETIVOS

El objetivo de este piloto fue evaluar la contaminación crónica con Pb de un sitio militar de tiro abandonado y monitorear la revegetación con *H. petiolaris*, así como evaluar la estabilización de los metales en el tejido vegetal y los cambios inducidos en la composición de las comunidades microbianas y la producción de aceite esencial. El mismo se enmarca en las actividades propuestas para el año 2018, 2019 y 2020.

## METODOLOGÍA

### **Muestreo del suelo y caracterización**

El ensayo de fitoestabilización se estableció en dos áreas de tiro en La Pampa, Argentina: el Sitio 1: 36° 37' 11.302" S, 64° 15' 25.366" W y el Sitio 2: 36° 37' 11.543" S, 64° 15' 26.884" W, a los que se sumó un área no contaminada fuera del campo de tiro utilizada como sitio control (36° 37' 9.264" S, 64° 15' 27.295" W) (Figura 1). El muestreo del suelo se realizó antes y después del cultivo, y se recogieron al azar seis muestras compuestas por cada sitio, cada una de ellas conformada por tres submuestras de suelo recolectado de los 0-15 cm y de los 15-30 cm de profundidad, que luego se mezclaron por cuarteo para obtener cada muestra compuesta. Las muestras de suelo fueron secadas al aire, se trituraron, homogeneizaron y se tamizaron a <2 mm para los análisis fisicoquímicos. La concentración total de metales se determinó usando el método US EPA 3051 de digestión asistida por microondas con HNO<sub>3</sub> (Agencia de Protección Ambiental [EPA], 1994). La fracción potencialmente disponible o "lábil" de Pb se determinó realizando una extracción con EDTA 0,05 M (Chrastný *et al.*, 2008). Para esto, 5 g de muestra de suelo molido (preparada como se mencionó anteriormente) se colocaron en tubos de 50 ml, se agitó durante 1 hora a 210 rpm con 25 ml de acetato de amonio/EDTA 0,05 M pH 4,65. Las suspensiones se equilibraron durante 16 h a temperatura ambiente. Luego se filtró el sobrenadante y se midió el contenido de Pb mediante Espectrometría de Emisión Atómica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES, Agilent Technologies, serie 700, Bélgica).



**Figura 1.** Mapa del campo de tiro, los sitios experimentales se encuentran marcados con números. Google Earth (versión 7.1.8.3036) y ArcGIS (versión 10.2.0).

El porcentaje de remoción de Pb (R) del suelo luego del cultivo de *H. petiolaris* se calculó de acuerdo con la ecuación establecida por Li *et al.*, (2019):

$$R = \frac{C(\text{antes del cultivo})_{\text{suelo}} - C(\text{después del cultivo})_{\text{suelo}}}{C(\text{después del cultivo})_{\text{suelo}}} \times 100$$

Donde C (antes del cultivo) suelo es la concentración de Pb disponible antes de la revegetación con *H. petiolaris* y C (después del cultivo) suelo es la concentración de Pb disponible en el suelo después de la cosecha.

### **Diseño experimental**

El trasplante se realizó en octubre de 2018. El diseño experimental de plantación se realizó teniendo en cuenta los procedimientos de remediación reportados por Yang *et al.* (2010): Treinta pozos fueron cavados en cuadrantes de 1×1 m a través del sitio a remediar a lo largo de una transecta desde la parte superior hasta la parte inferior de la pendiente. Se crearon 8 franjas de plantación de 6×5 m (intervalos de 1 m) a lo largo de la pendiente. Las plantas se colocaron en los pozos y se rellenaron con una mezcla de suelo-hidrogel en una proporción 9/1. Posteriormente, se permitió que las plantas crecieran en condiciones naturales, sin fertilización ni riego.

### **Supervivencia al trasplante, desarrollo de biomasa y concentración de metales en el tejido vegetal**

Se monitoreó la supervivencia de las plantas y la cubierta vegetal desarrollada a lo largo del ensayo. La cosecha se realizó 6 meses después de la siembra, luego de la fenofase de floración. En el laboratorio, las raíces se lavaron cuidadosamente con agua estéril para eliminar completamente las partículas de tierra adheridas. Las muestras se secaron en horno a 60 °C durante 1 semana, se pesaron, se digirieron con HNO<sub>3</sub> al 70% en un bloque de calor y se disolvieron en 5 ml de HCl al 2% usando el protocolo de digestión ácida US EPA 3050B de sedimentos, lodos y suelos (Protección del medio ambiente Agencia [EPA], 1996). Las concentraciones de metales en la parte aérea del tejido vegetal y en las raíces se determinó usando Espectrometría de Emisión Atómica de Plasma Acoplada Inductivamente (ICP-OES, Agilent Technologies, serie 700, Bélgica). Se incluyeron como blancos tubos conteniendo solo HNO<sub>3</sub>. Los factores de bioacumulación (FBA) se calcularon dividiendo el contenido total de elementos en el tejido de la planta por el contenido total de elementos en el suelo (Abbas y Abdelhafez, 2013). Mientras que el factor de translocación raíz-parte aérea (FT), definido como la relación entre la concentración de metal en los tallos y hojas (parte aérea vegetal) y la concentración en las raíces, se calculó de acuerdo con Gupta *et al.* (2008).

### **Análisis de las comunidades bacterianas por Illumina Miseq™**

Se investigó el efecto de la contaminación por Pb en la diversidad bacteriana de la rizoplana (suelo directamente adherido a la superficie de la raíz) y las bacterias endófitas de semilla (microorganismos dentro de las semillas) de *H. petiolaris*. De cada sitio, se recolectaron cinco muestras (1 g de suelo de rizoplana y 10 semillas por planta). La extracción de ADN de rizoplana se realizó utilizando el kit de aislamiento MOBIO PowerSoil (MOBIO). La extracción de ADN de las bacterias endófitas de la

semilla se realizó utilizando el kit Invisorb Spin Plant Mini (Stratec Biomedical AG). Previo a la extracción 150 mg de semillas se esterilizaron superficialmente, lavándolas con etanol al 70% (v/v) durante 10 minutos, seguido de hipoclorito de sodio al 15% (v/v) durante 5 minutos y posteriormente se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril. La esterilización se confirmó colocando 100 µl del último enjuague en extracto sólido glucosa-levadura (glucosa: 10 g l<sup>-1</sup>; levadura: 5 g l<sup>-1</sup>). Las semillas estériles se maceraron usando un mortero estéril con 200 µl de solución buffer fosfato estéril.

El ADN extraído se sometió a dos reacciones en cadena de polimerasa (PCR). En la primera reacción de PCR, se usaron los primers 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGTAA-3') y 806R (5'-GGACTACHVHHHTWTCTAAT-3') para amplificar el gen 16S rRNA (región V4). La primera mezcla de PCR contenía: 1,8 mmol l<sup>-1</sup> de buffer de reacción de alta fidelidad, 1,8 mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mmol l<sup>-1</sup> desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP), 0,2 µmol l<sup>-1</sup> primer directo, 0,2 µmol l<sup>-1</sup> primer inverso, 1 U de polimerasa Taq de alta fidelidad (Roche 205 Applied Science, Mannheim, Alemania), 1 µl de ADN y agua libre de nucleasas hasta el volumen total de 25 µl (Beckers *et al.*, 2016). Las condiciones de ciclo para la primera PCR fueron: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, seguido de 32 ciclos a 94 °C durante 30 s, a 54 °C durante 45 s y a 72 °C durante 1 min, y alargamiento final de 7 min a 72 °C (Techne TC 5000 PCR Thermal Cycler, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Reino Unido). Los amplicones bacterianos producidos por la primera reacción de PCR se purificaron utilizando el kit de purificación de ADN NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select (Macherey-Nagel, GmbH & Co, Düren, Alemania). Se usaron 5 µl para la segunda PCR. Para la secuenciación multiplexada, en la segunda PCR se adjuntó un código de barras de 10 pb específico de la muestra (MID) al primer directo, seguido de la clave y una secuencia de combinación de adaptadores Lib-L N y S (Illumina, San Diego, EE. UU.). Las condiciones de ciclado para la segunda PCR fueron: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguido de 18 ciclos a 95 °C durante 30 s, a 55 °C durante 45 s y a 72 °C durante 45 s, y el alargamiento final de 7 min a 72 °C. Los amplicones bacterianos producidos por la segunda PCR se purificaron y se determinó la concentración de ADN purificado con el kit de ensayo Qubit® dsDNA HS (Life Technologies Europe, Gante, Bélgica) según el protocolo del fabricante. Finalmente se prepararon mezclas equimolares de las diferentes muestras y la secuenciación se llevó a cabo utilizando bibliotecas de amplicones de extremo emparejado de 2 × 300 pb en la plataforma Miseq™ (Illumina) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las lecturas 16S rRNA obtenidas por Miseq™ se procesaron y analizaron utilizando la versión 1.12 de la tubería DADA2 en el proyecto R. El conjunto de archivos fastq secuenciados por Illumina se reprocesó siguiendo los siguientes pasos: i) las lecturas se filtraron, se eliminaron las duplicaciones y se eliminaron los singletons, ii) el recorte de lecturas de mala calidad se realizó utilizando un valor de error máximo esperado de 2,2; iii) las lecturas de longitud más cortas que 250 pb se eliminaron y las más largas se cortaron; iv) las lecturas directas e inversas se fusionaron para obtener las secuencias completas; v) se eliminaron las secuencias quimeras ambiguas. Las secuencias así procesadas se agruparon en la variante de secuencia de amplicon (OTU), que registra el número de veces que se observó cada variante de secuencia de amplicon exacta en cada muestra. Después del agrupamiento, las secuencias se alinearon y se clasificaron taxonómicamente utilizando la base de datos de referencia SILVA 132 (Quast *et al.*,

2013). Para el análisis del microbioma, se utilizó el paquete phyloseq R. La abundancia relativa de grupos bacterianos se estimó dividiendo el número de secuencias clasificadas como grupos bacterianos por el número total de secuencias clasificadas como bacterias por muestra.

### **Extracción de aceite esencial y análisis de su composición**

Las partes aéreas de las plantas de *H. petiolaris* se cosecharon 6 meses después del cultivo, durante el período de floración y se secaron en el laboratorio durante 7 días a temperatura ambiente (25-28 °C). El aceite esencial (AE) se extrajo por hidrodestilación de la biomasa vegetal seca mediante el uso de un extractor de escala semi industrial (Figmay, SRL, Argentina), en el departamento de Química de La Universidad Nacional de La Pampa. Las condiciones de extracción fueron: 1 Kg de biomasa en polvo, 5 L de agua, 4 h de destilación. Se utilizó sulfato de sodio anhidro para eliminar las trazas de agua en AE después de la extracción. El rendimiento de los aceites extraídos se calculó luego de la destilación y se almacenaron a 4°C hasta el análisis de la composición. La concentración de Pb se determinó mediante Espectrometría de Emisión Atómica de Plasma Acoplada Inductivamente (ICP-OES, Agilent Technologies, serie 700, Bélgica), tanto en el agua floral (subproducto), como en el residuo vegetal obtenido luego de la extracción. De cada sitio, se filtraron cinco muestras de agua floral (Nylon 0,22 µm) y se procesaron cinco muestras de residuo vegetal de la misma forma que se procesó el material vegetal en la sección 6.2.3.

La composición del aceite esencial de *H. petiolaris* se analizó en un cromatógrafo de gases HP 6890N Series Plus (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE. UU.), equipado con un detector selectivo de masas modelo 5973N (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE. UU.) y un autoinyector de la serie HP 6890. La separación de los analitos se logró utilizando una columna capilar HP-5 MS (30 mx 0,25 mm de diámetro interno, 0,25 m de grosor de película y 5% de fenilmetilsiloxano), suministrada por J & W Scientific (Folsom, CA, EE. UU.). El gas portador (helio) se ajustó a un caudal constante. El volumen de inyección fue de 2 µl en modo sin división (splitless), el puerto de inyección y las temperaturas de la línea de transferencia se ajustaron a 250 °C y 280 °C, respectivamente. El espectrómetro de masas se hizo funcionar con una corriente de filamento de 300 mA y una energía de electrones de 70 eV en el modo de ionización electrónica positiva. Basado en el rango de exploración de masa de 50-550 unidades de masa atómica (amu) con el modo SCAN. Los tiempos de retención de los compuestos se determinaron comparando el patrón de fragmentación de MS de los estándares y el banco de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) 2.0 GC-MS library. La versión D.01.00 de Chemstation se utilizó para la adquisición de datos, el procesamiento de los datos y el control de los equipos.

### **Análisis estadístico**

Los datos se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA). Cuando ANOVA mostró efecto del tratamiento, se aplicó una prueba post-hoc de Tukey para hacer comparaciones entre las medias en  $p < 0.05$ . Se analizó la diversidad de las lecturas de Illumina mediante el índice de Shannon y el análisis de diversidad de Chao, además de la distribución no paramétrica NMDS, utilizando la versión 3.6.1 del proyecto R (The R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).



## RESULTADOS

Las propiedades fisicoquímicas generales de cada sitio seleccionado para la fitoestabilización se presentan en la **Tabla 1**. El pH de los suelos fluctuó en el rango de 7.4 a 7.7, lo que se considera adecuado para el crecimiento y desarrollo saludable de las plantas. La conductividad eléctrica (CE) es un indicador de la disponibilidad de nutrientes en el suelo. Los niveles óptimos de CE en el suelo oscilaron entre 110-570 miliSiemens por metro (mS/m). Los niveles bajos de CE como los encontrados en el sitio 2 indican una baja disponibilidad de nutrientes. La arena fue la textura predominante en las áreas estudiadas. Comparativamente, el sitio 2 tenía la mitad de la materia orgánica que los otros sitios. El nivel de contaminación no fue significativamente diferente en los sitios 1 y 2 en términos de concentración total de Pb. Sin embargo, en el sitio 2 se registró el mayor valor de Pb disponible, tanto en la capa superficial como en profundidad.

**Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas, Pb disponible y total (mg Kg<sup>-1</sup>) de los sitios experimentales antes del cultivo y después de la cosecha.**

	Materia Orgánica (%)	Textura	CE (mS/m)	pH	Pb Total	Pb disponible superficial <sup>a</sup>	Pb disponible en profundida <sup>b</sup>	Pb disponible después de la cosecha
Sitio 1	1.8	Arcilloso-arenoso	271±51 <sup>a</sup>	7,7±0,7 <sup>a</sup>	427,8±135,54 <sup>a</sup>	15,1±5,1 <sup>b</sup>	7,3±4,0 <sup>b</sup>	10,4±6,8 <sup>a</sup>
Sitio 2	0.5	Arenoso	18±6 <sup>b</sup>	7,4±0,3 <sup>a</sup>	416,5±102,1 <sup>a</sup>	31,1±8,3 <sup>a</sup>	23,6±9,9 <sup>a</sup>	24,2±13,5 <sup>a</sup>
Control	1.9	Arcilloso-Arenoso	200±43 <sup>a</sup>	7,4±0,5 <sup>a</sup>	20,5±3,4 <sup>b</sup>	3,9±2,1 <sup>c</sup>	4,3±1,4 <sup>b</sup>	2,8±6,8 <sup>b</sup>

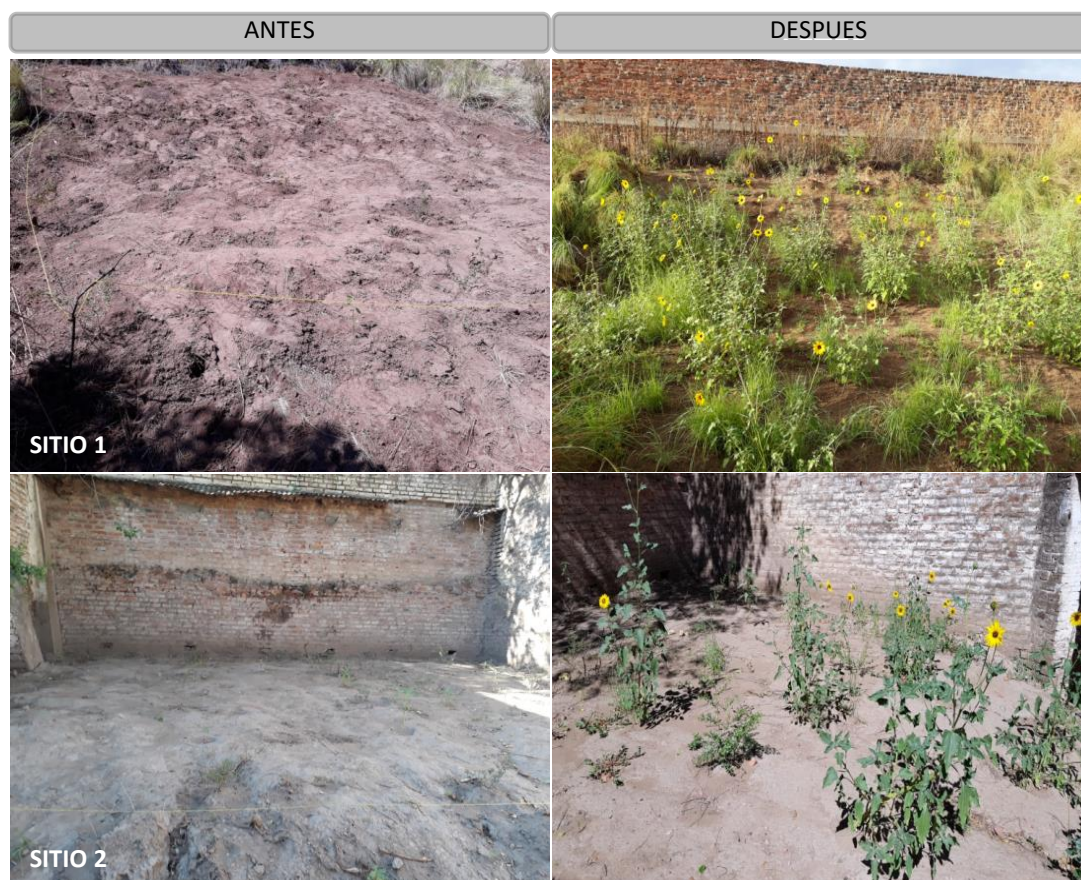
Valores promedio ± desvío estándar. (n = 6); <sup>a</sup> (0-15 cm); <sup>b</sup> (15-30 cm). Los valores en una columna seguidos de la misma letra (s) no son significativamente diferentes  $p \leq 0,05$  según la prueba de ANOVA y Tukey.

Treinta plántulas de *H. petiolaris* fueron trasplantadas en cada sitio experimental. Se permitió que las plantas crecieran en condiciones naturales, sin fertilización o riego. Después de 6 meses, se cosecharon y se determinaron parámetros de biomasa y la concentración de Pb en raíces, hojas y flores (**Tabla 2**). La adaptación de las plantas fue monitoreada durante las primeras semanas. El sitio 2 fue el más perjudicial en términos de supervivencia para *H. petiolaris*. La mitad de las plantas trasplantadas en este sitio murieron, lo que puede estar relacionado con el bajo contenido de MO y la alta fracción de Pb disponible. Sin embargo, aquellas plantas que pudieron adaptarse y crecer en los sitios 1 y 2 desarrollaron una cobertura de biomasa significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) (expresada como peso fresco) en comparación con las plantas que crecieron en el sitio control no contaminado. En la Figura 2 se presentan las fotografías de los sitios experimentales antes y durante el experimento de vegetación.

**Tabla 2. Supervivencia al trasplante (%), tasa de crecimiento, peso fresco total (g) y concentración de Pb en los distintos compartimentos vegetales (mg Kg<sup>-1</sup>) de las plantas de *H. petiolaris* cultivadas en los sitios experimentales.**

	Supervivencia	Tasa de crecimiento	Peso fresco	Pb (mg Kg <sup>-1</sup> )		
				Raíces	Parte aérea	Flores
Sitio 1	97	90,5±23,5 <sup>ab</sup>	205,8±49,53 <sup>b</sup>	309,12±134,17 <sup>a</sup>	23,29±10,84 <sup>a</sup>	10,45±6,25 <sup>a</sup>
Sitio 2	50	66,4±31,1 <sup>a</sup>	257,8±99,04 <sup>b</sup>	195,24±55,48 <sup>a</sup>	26,76±19,28 <sup>a</sup>	4,09±1,21 <sup>a</sup>
Control	100	126,4±23,5 <sup>b</sup>	92,6±54,74 <sup>a</sup>	8,53±3,20 <sup>b</sup>	1,85±0,58 <sup>b</sup>	< dl

Valores promedio  $\pm$  desvió estándar. (n = 6). Valores en la misma columna seguidos por la misma letra (s) no son significativamente diferentes  $p \leq 0,05$  por ANOVA y test de Tukey. < dl: debajo del límite de detección (0,05 mg/Kg).



**Figura 2.** Comparación de los sitios experimentales antes y después del cultivo de *H. petiolaris*.

Las plantas de *H. petiolaris* que crecieron en los sitios 1 y 2, concentraron en el tejido de la raíz la mayor cantidad de Pb (Tabla 2). No hubo diferencias significativas entre las concentraciones acumuladas en los diferentes órganos vegetales y los sitios donde fueron cultivadas las plantas. Aquellas plantas que crecieron en el sitio contaminado 1 acumularon en el compartimiento radicular el 90% de todo el Pb que se extrajo del suelo. El otro 10% se distribuyó en las partes aéreas de las plantas. Mientras que aquellas plantas que crecieron en el sitio contaminado 2 acumularon alrededor del 86% de todo el Pb que se extrajo del suelo en la raíz, y traslocaron principalmente a las hojas y los tallos el resto del Pb. Solo una pequeña fracción (1,76%) se acumuló en las flores.

**Tabla 3. Factor de Bio-acumulación (FBA) de Pb en raíces, parte aérea y flores y factor de translocación (FT) en plantas de *H. petiolaris* cultivadas en los sitios experimentales. Porcentaje de remoción (R) de Pb del suelo luego del cultivo.**

	FAB			FT	R
	Raíces	Parte aérea	Flores		
Sitio 1	0,72±0,31 <sup>a</sup>	0,05±0,03 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>a</sup>	26,77±6,33 <sup>a</sup>	45,64±18,60 <sup>a</sup>
Sitio 2	0,47±0,13 <sup>a</sup>	0,06±0,05 <sup>a</sup>	0,01±0,00 <sup>a</sup>	23,31±19,30 <sup>a</sup>	28,49±3,89 <sup>ab</sup>
Control	0,42±0,16 <sup>a</sup>	0,09±0,03 <sup>a</sup>	-	0,21±0,18 <sup>b</sup>	44,57±26,29 <sup>a</sup>

Valores ± desvío estándar (n = 6); Valores en una columna seguidos de la misma letra(s) no son estadísticamente diferentes  $p \leq 0.05$  por ANOVA y Tukey test.

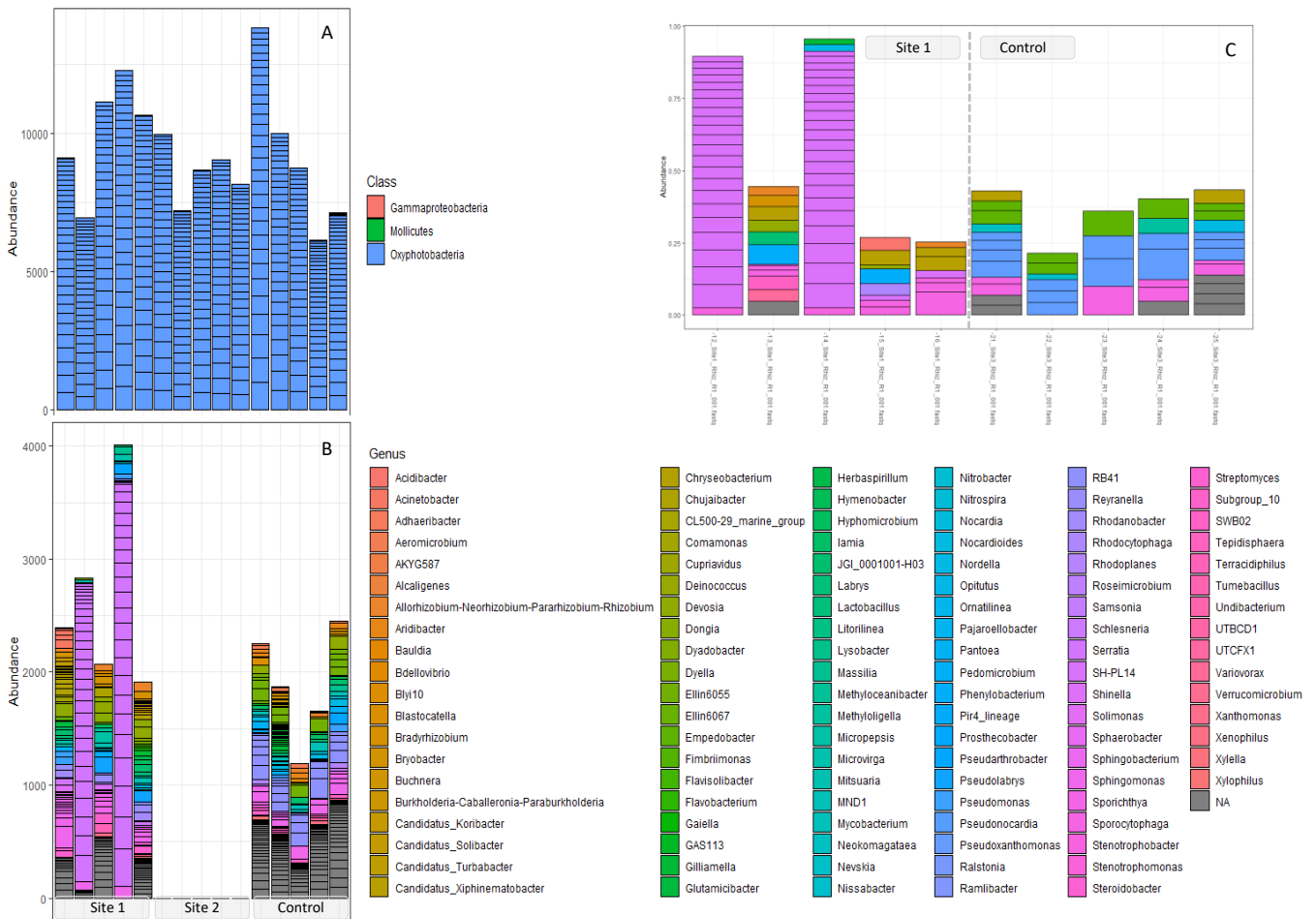
El FBA de Pb no fue significativamente diferente entre las plantas cultivadas en el sitio contaminado 1 y 2 y las plantas cultivadas en el sitio de control que tenía 15 veces menos contaminación por Pb (**Tabla 3**). Sin embargo, la translocación fue considerablemente mayor para las plantas cultivadas en los sitios contaminados. Al rededor del 25% del Pb acumulado en las raíces se traslocó a la parte aérea vegetal cuando estas plantas se cultivaron en los sitios contaminados 1 y 2.

La tasa de remoción se calculó comparando la concentración final de Pb disponible en el suelo, después de la cosecha y la concentración inicial de Pb disponible en los sitios experimentales antes del cultivo (**Tabla 1**). El uso de estas plantas disminuyó el contenido de Pb biodisponible en el suelo entre un 28-45% dependiendo principalmente de las propiedades fisicoquímicas del suelo (**Tabla 3**). Se obtuvo menor tasa de remoción en el sitio 2, donde se registró el contenido mínimo de MO (0.5%).

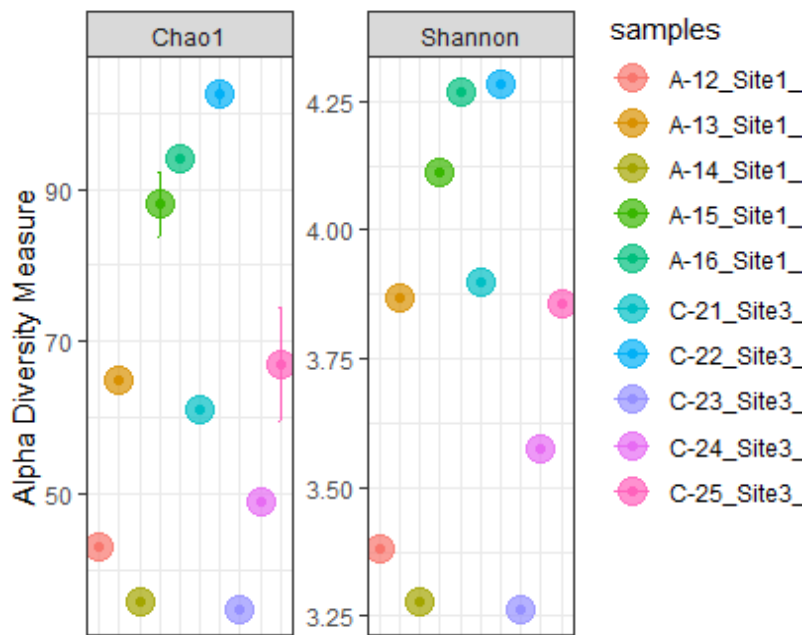
Las comunidades bacterianas de la rizoplasma y endófitas de semilla de *H. petiolaris* que crecieron en los dos sitios contaminados con Pb y un sitio control no contaminado fueron secuenciadas por Illumina Miseq™ para evaluar los cambios en la biodiversidad provocados por la contaminación (**Figura 3**).

La composición de la comunidad de bacterias endofíticas de semillas de *H. petiolaris* no se vio afectada por la contaminación (**Fig. 3A**). Un total de 50 unidades taxonómicas operacionales (OTUs), que representan el 98% de la abundancia total, se compartieron entre todas las muestras. Tres clases fueron identificadas, entre las cuales *Oxyphotobacteria* se encontró tanto en las plantas que crecieron en los sitios seleccionados dentro del campo de tiro, como en las plantas que crecieron en el área no contaminada fuera del campo de tiro. Las clases de *Gammaproteobacteria* y *Mollicutes* también aparecieron al azar en un porcentaje mucho menor abundancia (2%) y sin correlación con la contaminación o el sitio. Solo fue posible analizar la comunidad de bacterias de la rizoplasma de las plantas de *H. petiolaris* que crecieron en el sitio 1 y en el sitio control (**Fig. 3B**). Las propiedades fisicoquímicas del suelo del sitio 2 (textura arenosa, bajo contenido de MO) no permitieron la extracción de ADN puro, utilizando el kit de aislamiento MOBIO PowerSoil. En consecuencia, durante la secuenciación de Miseq™, obtuvimos lecturas directas e inversas que no fueron lo suficientemente largas como para fusionar y obtener la secuencia completa sin ruido. De las plantas que crecieron en el sitio 1 y el sitio control, un total de 274 OTUs fueron

obtenidas de las bibliotecas (**Fig. 3C**). El género *Streptomyces* estuvo presente en las muestras de ambos sitios. El género *Serratia* solo se aisló de las muestras provenientes del sitio 1. Mientras que los géneros *Nitrobacter* y *Herbaspirillum* solo estuvieron presentes en la rizoplasma de las plantas que crecieron en el sitio no contaminado. El parámetro de riqueza microbiana de Chao y el parámetro de diversidad microbiana de Shannon no fueron significativamente diferentes entre las muestras del sitio 1 y el sitio control (Figura 4).



**Figura 2.** Comparación de los sitios experimentales antes y después del cultivo de *H. petiolaris*.



**Figura 4.** Shannon index y diversidad de Chao, análisis de las lecturas Illumina reads obtenidas de las muestras de rizoplana de plantas de *H. petiolaris* cultivadas en el sitio contaminado 1 y en el sitio control. Cinco replicas por sitio estas representadas en círculos separados.

Los aceites esenciales se extrajeron de la biomasa vegetal seca obtenida de cada sitio experimental. La composición y el rendimiento se analizaron para evaluar los cambios provocados por la contaminación en el metabolismo secundario de *H. petiolaris* (**Tabla 4**).

Las plantas que crecieron en el sitio 2 no produjeron AE. Mientras que las plantas que crecieron en el sitio 1 produjeron AE con un rendimiento significativamente menor al obtenido en las plantas que crecieron en el sitio control. Sin embargo, la composición de los AEs no cambió con la presencia de Pb en el suelo.

Se midió la concentración de Pb en el agua floral y los desechos vegetales obtenidos de la hidrodestilación para evaluar el ciclo del Pb en la extracción de AE (Tabla 4). No se detectó Pb en el agua floral obtenida. Mientras que la concentración de Pb que se detectó en los desechos vegetales después de la extracción del aceite esencial fue proporcional a la que se encontró en el tejido vegetal después de la cosecha (**Tabla 2**).

**Tabla 4. Identificación de compuestos presentes en el aceite esencia de *H. petiolaris* cultivado en un sitio contaminados con Pb y en un sitio control. Rendimiento del aceite esencial obtenido y concentración de Pb en agua floral y residuo vegetal.**

Rt (min)	Compuestos	CAS	Área relativa	
			Control	Sitio 1
7,84	$\alpha$ -pinene	7785-70-8	66	67
8,25	Camphene	79-92-5	8	8
18,53	Acetic acid,1,7,7-trimethyl-bicyclo[2,1,1]hept-2-yl ester	92618-89-8	10	10
23,87	D-germacrene	23986-74-5	16	15
9,04	Thujene	3387-41-5	<1	<1
9,12	$\beta$ -pinene	127-91-3	<1	<1
10,77	Limoneno	5989-54-8	<1	<1
12,92	$\alpha$ -pinene epoxide	1686-14-2	<1	<1
21,45	$\beta$ -cubene	13744-15-5	<1	<1
22,24	Caryophyllene	87-44-5	<1	<1
22,63	$\alpha$ -bergamotene	17699-05-7	<1	<1
23,14	Humulene	6753-98-6	<1	<1
26,41	Caryophyllene oxide	1139-30-6	<1	<1
Total			100	100
Rendimiento			0,14	0,014
			<dl	<dl



## DISCUSIÓN

Se propuso la fitoestabilización de un área de tiro crónicamente contaminada con Pb utilizando *H. petiolaris*, una especie vegetal aromática nativa. Los principales aspectos tecnológicos que generan preocupación sobre estas estrategias de vegetación son: el largo tiempo necesario para la remediación de estos sitios, el establecimiento de gramíneas menos diversas y/o malezas y la posible entrada de los metales en la cadena alimentaria (Robinson *et al.*, 2008; Yates *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta estos factores y nuestros ensayos previos, seleccionamos la especie aromática *H. petiolaris* debido a su alta capacidad para acumular Pb y Cd en el tejido subterráneo, lo que reduce el riesgo de entrada de los metales en la cadena alimentaria. A su vez, esta especie se naturalizó en Argentina hace más de 50 años (Covas, 1984.) y no sería una introducción exótica en el área propuesta para fitoestabilizar. Por último, la posibilidad de obtener aceite esencial con las partes aéreas de esta especie vegetal al final del ciclo de floración (Saran *et al.*, 2019) podría servirnos para bio-gestionar y revalorizar el área obteniendo un producto comercializable a partir de suelos donde no se pueden cultivar otros cultivos convencionales. Pudimos comprobar que en una sola temporada de cultivo de esta especie se redujo entre el 23 y el 45% la concentración de Pb disponible en el suelo, estabilizándolo mayoritariamente en su tejido radicular vegetal (**Tabla 3**).

De acuerdo con Massa *et al.* (2010), las concentraciones de Pb tóxicas para las plantas en el suelo varían de 30 a 300 mg Kg<sup>-1</sup>. El área seleccionada para nuestro estudio tenía entre 317 y 562 ppm de Pb (**Tabla 1**), lo cual se encuentra por encima de los límites recomendados por la ley argentina N° 24585 y la US EPA (1996). Sin embargo, el mayor impacto en términos de toxicidad generado por los metales sobre los ecosistemas y la salud humana, particularmente para el plomo, es causado por el contenido de sus formas biodisponibles y no por su contenido total (Ghazaryan *et al.*, 2017). En nuestro estudio, la fracción disponible de Pb fue entre 13-28 veces menor que la concentración total medida (**Tabla 1**). La fracción disponible de Pb fue significativamente más alta en el sitio 2 tanto en las capas superiores como en profundidad. Este sitio tenía el menor contenido de MO registrado (**Tabla 1**). Este fenómeno fue explicado anteriormente por Young (2013), quien estudió cómo la MO se une a los oligoelementos en el suelo y los retiene. A su vez, el contenido de metal fue significativamente mayor en la capa superior (0–15 cm) que en la capa inferior (15–30 cm) en ambos sitios, lo que indica un lento transporte vertical de los contaminantes. Esto es consistente con hallazgos recientes en campos de tiro localizados en terrenos de turberas, donde se encontró que las concentraciones de Pb, Cu y Sb disminuyen rápidamente verticalmente en el suelo de turba (Mariussen *et al.*, 2017).

Después de 6 meses de crecimiento en los sitios contaminados, *H. petiolaris* mostró diferentes rendimientos de crecimiento vegetal dependiendo del sitio donde se cultivó (**Tabla 2**). Las diferencias significativas en las características del suelo de estos dos sitios tuvieron un impacto directo en el crecimiento de las plantas, pero no en la acumulación de metales. Resultados similares fueron reportados por Ghazaryan *et al.*, (2019), quien investigó el potencial de fitorremediación de cobre de especies vegetales silvestres que crecen en distintas áreas contaminadas mineras. Las plantas de *H. petiolaris* pudieron acumular en el tejido subterráneo



entre el 86 y el 90% de la concentración total absorbida de Pb del suelo. Solo una pequeña fracción fue trastocada a las partes aéreas de las plantas (**Tabla 2**). En este sentido, fue informado por Kiran *et al.*, (2017), que una mayor concentración de Pb tiende a acumularse dentro de las raíces de las plantas en el complejo de la pared celular, mientras que solo una fracción limitada se transporta a las partes aéreas de las plantas. Los valores bajos de FT obtenidos (**Tabla 3**) indican que solo pequeñas cantidades de Pb se transfieren a las partes aéreas de estas plantas y que la probabilidad de entrada del metal en la cadena alimentaria es baja. El uso de este tipo de plantas conduce a la disminución del contenido de plomo biodisponible en el suelo, lo que a su vez reduce la contaminación del agua subterráneas y superficial (Ghazaryan *et al.*, 2019).

Los metales en el suelo también pueden afectar negativamente el número, la abundancia y la actividad de los microorganismos, inhibiendo los procesos de descomposición de la materia orgánica y mineralización de Nitrógeno (Xinxin *et al.*, 2019). Se investigaron las comunidades de bacterias que colonizan la rizósfera y las bacterias endófitas de semillas de *H. petiolaris* cultivado en los sitios contaminados y en un sitio control. El predominio del género *Serratia* en la rizósfera de las plantas cultivadas en el sitio contaminado 1 (**Figura 3c**) puede ser un taxón indicador de la contaminación por metales. Este género fue aislado y caracterizado anteriormente por Nwagwu *et al.*, (2017), de agua residual contaminada con metales pesados. También se encontró en agua contaminada de áreas industriales y mineras (Kumar *et al.*, 2019). Por último, se comparó el rendimiento y la composición de AE para analizar la influencia del Pb en el metabolismo secundario de *H. petiolaris*. En este sentido, Rotkittikhun *et al.*, (2010) reportaron que el Pb puede mejorar el contenido de aceite de la especie vegetal vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) cultivada en zonas mineras contaminadas con plomo. En nuestro estudio, las plantas cultivadas en el sitio donde fue encontrada la mayor cantidad de Pb disponible (sitio 2), las plantas no produjeron aceites esenciales y aquellas cultivadas en el sitio 1 produjeron una cantidad significativamente menor que las cultivadas en el sitio control no contaminado (**Tabla 4**). Sin embargo, el patrón de los componentes de la AE obtenidos de las plantas que crecieron en el sitio 1 no fue diferente al obtenido de las plantas que crecieron en el sitio no contaminado (**Tabla 4**). Estos hallazgos coinciden con los reportados por Khajanchi *et al.*, (2013), quienes anteriormente afirmaron a través de su investigación que no hay cambios significativos en los componentes de los AEs al cultivar plantas aromáticas en sitios contaminados.

Al extraerse los AEs por hidrodestilación la posibilidad de que el aceite contenga metales es prácticamente nula (Patel y Patra, 2014). Sin embargo, no existe evidencia de la presencia de los metales en los subproductos y residuos generados durante la hidrodestilación. En nuestro estudio no se detectó concentración de Pb en el agua floral obtenida durante la hidrodestilación, mientras que la concentración de Pb encontrada en los desechos vegetales (**Tabla 4**) fue proporcional a la concentración medida en el tejido vegetal (**Tabla 2**).





## **CONCLUSIONES**

Nuestros resultados indican que *H. petiolaris* es una nueva especie acumuladora de Pb que puede crecer en suelos arenosos contaminados con hasta 400 mg Kg<sup>-1</sup> de Pb. Además, esta especie adapta su comunidad bacteriana rizosférica para hacer frente a la presencia de este elemento. Dado que es una especie vegetal aromática, los aceites esenciales y los subproductos de valor agregado obtenidos de su biomasa pueden comercializarse sin el riesgo de contaminación por Pb, con los beneficios de recuperar tierras contaminadas para la producción. Estas características, convierten a *H. petiolaris* en una candidata con un excelente potencial biotecnológico para fitoestabilizar suelos contaminados con Plomo, especialmente cuando estos no son adecuados para producir otros cultivos comerciales como aquellos producidos por las actividades mineras.



## Referencias Bibliográficas

- Ahmad, M., Lee, S. S., Moon, D. H., Yang, J. E., Ok, Y. S. (2011). A review of environmental contamination and remediation strategies for heavy metals at shooting range soils, in: A. Malik, E. Grohmann (Eds.), *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development Springer*, 437–452.
- Ahmad, M., Lee, S. S., Yang, J. E., Ro, H. M., Lee, Y. H., Ok, Y. S. (2012). Effects of soil dilution and amendments (mussel shell, cow bone, and biochar) on Pb availability and phytotoxicity in military shooting range soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79, 225–231.
- Andresen, E., Peiter, E., Küpper, H. (2018). Trace metal metabolism in plants. *J Exp Bot*, 69 (5), 909-954. doi:10.1093/jxb/erx465.
- Beckers, B., Op de Beeck, M., Thijs, S., Truyens, S., Weyens, N., Boerjan, W., Vangronsveld, J. (2016). Performance of 16 s RNA primer pairs in the study of rhizosphere and endosphere bacterial microbiomes in metabarcoding studies. *Frontiers in Microbiology*, 7, 650.
- Cao, X., Wahbi, A., Ma, L., Li, B., Yang, Y. (2009). Immobilization of Zn, Cu, and Pb in contaminated soils using phosphate rock and phosphoric acid. *J Hazard Mater*, 164, 555–564.
- Chang, Y. T., Hseu, Z. Y., Zehetner, F. (2014). Evaluation of phytoavailability of heavy metals to Chinese cabbage (*Brassica chinensis* L.) in rural soils. *The Scientific World Journal*, 2014, 309396. doi:10.1155/2014/309396
- Chrastný, V., Komárek, M., Jrovcová, E., Štíhová, J. (2008). A critical evaluation of the 0.05 M EDTA extraction of Pb from forest soils. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 88(6), 385-396.
- Covas, G. (1984). Algunas plantas que en el último cuarto de siglo se han transformado de adventicias en naturalizadas y notablemente expandidas en la provincia de La Pampa. *Apuntes para la flora de La Pampa*, 83, 330-332.
- Croes, S., Weyens, N., Colpaert, J., Vangronsveld, J. (2015). Characterization of the cultivable bacterial populations associated with field grown *Brassica napus* L.: an evaluation of sampling and isolation protocols. *Environ Microbiol*, 17(7), 2379–2392. doi:10.1111/1462-2920.12701.
- European Food Safety Authority. (2012). Lead dietary exposure in the European population. *EFSA journal*, 10(7), 2831. doi:10.2903/j.efsa.2012.2831.
- Ghazaryan, K., Movsesyan, H., Ghazaryan, N., Watts, B. A. (2019). Copper phytoremediation potential of wild plant species growing in the mine polluted areas of Armenia. *Environmental Pollution*, 249, 491-501.
- Ghazaryan, K. A., Movsesyan, H. S., Khachatryan, H. E., Minkina, T. M., Sushkova, S. N. (2017). Copper absorption status of agricultural plant species and their phytoremediation potential. In: *Proceedings of the YSU*, 2, 106-112.
- Gomes, H. I. (2012). Phytoremediation for bioenergy: challenges and opportunities. *Environ Technol*, 1(1), 59-66.
- Kettler, R., Schenk, K. (2006). VASA-Abgeltungen bei Schiessanlagen. Mitteilung des BAFU als Vollzugsbehörde. Umwelt-Vollzug Nr. 0634. *Bundesamt für Umwelt, Bern*.
- Khajanchi, L., Yadava, R. K., Kaurb, R., Bundelaa, D. S., Khana, M. I., Chaudharya, M., Meenaa, R. L., Dara, S. R., Singha, G. 2013. Productivity, essential oil yield, and heavy metal accumulation in lemon



- grass (*Cymbopogon flexuosus*) under varied wastewater-groundwater irrigation regimes. *Ind Crop Prod*, 45, 270-278.
- Kiran, B. R., Prasad, M. N. V., Sateesh, S. (2017). *Ricinus communis* L. (castor bean) as a potential candidate for revegetating industrial waste contaminated sites in peri-urban greater Hyderabad: remarks on seed oil. *Environ Sci Pollut*, 24, 19955–19964.
- Kumar, P., Gupta, S. B., Anurag Soni, R. (2019). Bioremediation of Cadmium by Mixed Indigenous Isolates *Serratia liquefaciens* BSWC3 and *Klebsiella Pneumoniae* RpSWC3 Isolated from Industrial and Mining Affected Water Samples. *Pollution*, 5(2), 351-360. doi:10.22059/poll.2018.268603.533.
- Law N°24585. (1995). Argentina. Mining activity-environmental impact. *Boletín Oficial*, 28278, 1-2.
- Li, Y., Zhu, Y., Zhao, S., Liu, X. (2015). The weathering and transformation process of lead in China's shooting ranges. *Environ Sci: Processes Impacts*, 17, 1620–1633
- Li, X., Wang, X., Chen, Y., Yang, X., Cui, Z. (2019). Optimization of combined phytoremediation for heavy metal contaminated mine tailings by a field-scale orthogonal experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 168, 1–8.
- Ma, L. Q., Hardison, D. W., Harris, W. G., Cao, X., Zhou, Q. (2007). Effects of soil property and soil amendment on weathering of abraded metallic Pb in shooting ranges. *Water Air Soil Pollut*, 178, 297–307.
- Mariussen, E., Vaa Johnsen, I., Stromseng, A. E. (2017). Distribution and mobility of lead (Pb), copper (Cu), zinc (Zn), and antimony (Sb) from ammunition residues on shooting ranges for small arms located on mires. *Environ Sci Pollut Res*, 24, 10182–10196.
- Massa, N., Andreucci, F., Poli, M., Aceto, M., Barbato, R., Berta, G. (2010). Screening for heavy metal accumulators amongst autochthonous plants in a polluted site in Italy. *Ecotox Environ Safe*, 73, 1988-1997.
- Meers, E., Samson, R., Tack, F. M. G., Ruttens, A., Vandegheuchte, M., Vangronsveld, J., Verloo, M. G. 2007. Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany*, 60(3), 385-396. doi:10.1016/j.envexpbot.2006.12.010.
- Mench, M., Schwitzguebel, J. P., Schroeder, P., Bert, V., Gawronski, S., Gupta, S. (2009). Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environ Sci Pollut Res*, 16, 876–900.
- Mercier, G., Duchesne, J., Blackburn, D. 2001. Prediction of Metal Removal Efficiency from Contaminated Soils by Physical Methods. *Journal of Environmental Engineering*, 127(4). doi:10.1061/(ASCE)0733-9372(2001)127:4(348).
- Nwagwu, E. C., Yilwa, V. M., Egbe, N. E., Onwumere, B. G. (2017). Isolation and characterization of heavy metal tolerant bacteria from Panteka stream, Kaduna, Nigeria and their potential for bioremediation. *African Journal of Biotechnology*, 16(1), 32-40.
- Padmavathamma, P. K., Li, L. Y. (2007). Phytoremediation technology: hyperaccumulation metals in plants. *Water Air Soil Pollut*, 184, 105–126.
- Pandey, V. C., Rai, A., Korstad, J. (2019). Aromatic Crops in Phytoremediation: From Contaminated to Waste Dumpsites. *Phytomanagement of Polluted Sites*, 9, 255-275.
- Patel, A., Patra, D. D. (2014). Influence of heavy metal rich tannery sludge on soil enzymes vis-à-vis growth of *Tagetes minuta*, an essential oil bearing crop. *Chemosphere*, 112, 323-332.
- Peer, W. A., Baxter, I. R., Richards, E. L., Freeman, J. L., Murphy, A. S. (2006). Phytoremediation and hyperaccumulator plants. *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification: from Microbes to Man*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 14, 299-340. doi:10.1007/b98249.



- Poverene, M., Carrera, A., Ureta, S., Cantamutto, M. (2004). Wild Helianthus species and wild-sunflower hybridization in Argentina. *Helia*, 27(40), 133–142. doi:10.2298/HEL0440133P.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web788 based tools. *Nucleic Acids Research*, 41, D590-D596.
- Rafati, M., Khorasani, N., Moattar, F., Shirvany, A., Moraghebi, F., Hosseinzadeh, S. (2011). Phytoremediation potential of *Populus alba* and *Morus alba* for cadmium, chromium and nickel absorption from polluted soil. *Int J Environ Res*, 5, 961–970.
- Rieseberg, L. H., Raymond, O., Rosenthal, D. M., Lai, Z., Livingstone, K., Nakazato, T., Durphy, J. L., Schwarzbach, A. E., Donovan, L. A., Lexer, C. (2003). Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science*. 301(5637), 1211–1216. doi:10.1126/science.1086949.
- Robinson, B. H., Bischofberger, S., Stoll, A., Schroer, D., Furrer, G., Roulier, S., Gruenwald, A., Attinger, W., Schulin, R. (2008). Plant uptake of trace elements on a Swiss military shooting range: uptake pathways and land management implications. *Environ Pollut*, 153, 668-676.
- Roman-Ponce, B., Ramos-Garza, J., Vasquez-Murrieta, M. S., Rivera-Orduna, F. N., Chen, W. F., Yan, J., Estrada-de Los Santos, P., Wang, E. T. (2016). Cultivable endophytic bacteria from heavy metal(loid)-tolerant plants. *Arch Microbiol*, 198(10), 941–956. doi:10.1007/s00203-016-1252-2.
- Rotkittikhun, P., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Baker, A. J. (2010). Tolerance and accumulation of lead in *Vetiveria zizanioides* and its effect on oil production. *J Environ Biol*, 31(3), 329.
- Saran, A., Fernandez, L., Cora, F., Savio, M., Thijs, S., Vangronsveld, J., Merini, L. J. (2020<sup>a</sup>). Phytostabilization of Pb and Cd polluted soils using *Helianthus petiolaris* as pioneer aromatic plant species. *Int J Phytoremediat*, 11, 1–9
- Saran, A., Fernandez, L., Minig, M., Bellozas Reinhard, M., Merini, L. J. (2019). Repellent activity of essential oils from native plants and their blend for *Tribolium castaneum* control in store grains. *SEMIARIDA*, 29(1), 4351.
- Sorvari, J., Antikainen, R., Pyy, O. (2006). Environmental contamination at Finnish shooting ranges—the scope of the problem and management options. *Sci Total Environ*, 366, 21–31.
- Spuller, C., Weigand, H., Marb, C. (2007). Trace metal stabilization in a shooting range soil: mobility and phytotoxicity. *J Hazard Mater*, 141, 378–387.
- U.S. EPA. (1996). “Method 3050B: Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils,” Revision 2. Washington, DC.
- USEPA. (1996). Soil screening guidance: user’s guidance. Office of solid waste and emergency response, USEPA, Washington DC.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, J., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., Van der Lelie, D., Mench, M. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ Sci Pollut Res*, 16, 765–794.
- Vithanage, M., Dabrowska, B. B., Mukherjee, B., Sandhi, A., Bhattacharya, P. (2012). Arsenic uptake by plants and possible phytoremediation applications: a brief overview. *Environ Chem Lett*, 10, 217–224.
- Yang, S. X., Liao, B., Li, J. T., Guo, T., Shu, W. S. (2010). Acidification, heavy metal mobility and nutrient accumulation in the soil-plant system of a revegetated acid mine wasteland. *Chemosphere*, 80, 852–859.
- Yates, C. N., Balch, G. C., Wootton, B. C. (2014). Framing the Need For Applications Of Ecological Engineering In Arctic Environments. *Developments in Environmental Modelling*, 26, 539-52.



Young, S. D. (2013). Chemistry of heavy metals and metalloids in soils. In: Alloway, B.J. (Ed.), *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and Their Bioavailability*. Springer Netherlands, 22, 51-95. [doi:10.1007/978-94-007-4470-7](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7).



## Instituciones participantes



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



[www.fontagro.org](http://www.fontagro.org)

Correo electrónico: [fontagro@fontagro.org](mailto:fontagro@fontagro.org)