

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA
MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



**FITOREMEDIACION CON ESPECIES NATIVAS EN SUELOS
CONTAMINADOS POR PLOMO**

Presentado por:

LUCIANA CHÁVEZ RODRÍGUEZ

TESIS PARA OBTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AMBIENTAL

Lima – Perú

2014

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA
MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**FITOREMEDIACION CON ESPECIES NATIVAS EN SUELOS
CONTAMINADOS POR PLOMO**

Tesis para optar el Título de
INGENIERO AMBIENTAL

LUCIANA CHÁVEZ RODRÍGUEZ

SUSTENTADA Y APROBADA ANTE EL SIGUIENTE JURADO:

Dra. ROSEMARY VELA
CARDICH
Presidente

Dra. ROSA MIGLIO
TOLEDO
Miembro

Dr. VICTOR MEZA
CONTRERAS
Miembro

Mg Sc. BRAULIO LA
TORRE MARTINEZ
Patrocinador

Mg Sc. GUILLERMO
AGUIRRE YATO
Co Patrocinador

Con todo mi cariño y amor para aquellas personas que estuvieron conmigo siempre apoyándome y motivándome, y a quienes no sólo les debo mi vida sino también todo lo que he logrado hasta ahora.

Mis queridos papis y mi hermanita.

Agradecimientos

Durante este año de trabajo son muchas las personas que han participado en la exitosa culminación de mi trabajo de tesis, y a las cuales quiero agradecer de todo corazón por su confianza y constante apoyo.

En primer lugar a Dios, por haberme dado la vida y por haber puesto en mi camino a personas tan maravillosas a las que les debo todo lo que soy. A mi mami Luzmila por ser mi fortaleza y mi apoyo constante durante todo el desarrollo de mi tesis, por sus consejos siempre certeros y por su meticulosidad que hizo de mi tesis lo que es. A mi papi Arturo, quien en los momentos que pudo, me brindó ese apoyo técnico que sólo un especialista en ese campo puede hacerlo. Y a mi hermanita Paula quien siempre que pudo estuvo ahí conmigo.

Un especial agradecimiento también a mis profesores asesores, Braulio la Torre y Guillermo Aguirre cuyo apoyo fue más allá de lo esperado de un asesor. Así mismo a los miembros de mi jurado de tesis cuyas correcciones me hicieron profundizar mucho más en mi tema, aprender y apasionarme con él. Así mismo a todos los profesores que en algún momento opinaron de mi trabajo y que dieron luces de cómo realizarlo y mejorarlo.

Agradezco también a la Oficina de Gestión de la Investigación de la Universidad Nacional Agraria La Molina por el financiamiento otorgado. Así mismo, al Laboratorio de Fertilidad de Suelos, en cuyas instalaciones pude llevar a cabo mi tesis. No puedo dejar de mencionar al Señor Mario Jiménez y el Señor Oscar Sigil de este laboratorio por su apoyo indispensable.

Mi tesis también incluyó trabajo de campo, y para poder llevarlo a cabo tengo que agradecer al Profesor Sady García por facilitarnos la camioneta para realizar el viaje a Huancayo, así como por el contacto con los ingenieros Jesús Vera y Fernando Álvarez que con su apoyo y conocimiento de la zona hicieron posible la culminación de la primera fase de la tesis.

Finalmente una especial mención a todos aquellos compañeros que trabajaron conmigo en sus respectivas tesis en el Laboratorio de Fertilidad de suelos, a los que ya sustentaron y a los que todavía les falta hacerlo. Nosotros compartimos muchos momentos en el laboratorio, y es muy satisfactorio una vez que este largo camino culmina y puedes ver reflejado todo tu esfuerzo.

Gracias a todos.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	
Abstract.....	
I. Introducción	1
II. Revisión de Literatura	3
2.1 Contaminación de Suelos	3
2.2 Plomo y sus efectos	4
2.3 Técnicas de Remediación de suelos	5
2.4 Fitorremediación de suelos.....	7
2.5 Factores que influyen en la fitorremediación de suelos	8
2.6.1 Nivel de contaminación en el suelo.....	9
2.6.2 Biodisponibilidad del metal pesado	9
2.6.3 Especies acumuladoras.....	11
2.6 Disposición de los sub-productos del proceso de fitorremediación	14
III. Materiales y Métodos	15
3.1 Descripción de puntos de muestreo.....	15
3.2 Muestreo de Suelo y Agua	22
3.3 Recolección de especies vegetales nativas	22
3.4 Preparación de muestras para estudios preliminares	23
3.5 Metodología de propagación de las especies vegetales: Germinación de las especies vegetales y propagación por esquejes	27
3.5.1 <i>Propagación de Nicotiana</i>	27
3.5.2 <i>Propagación de Calamagrostis</i>	28
3.5.3 <i>Propagación de Vetiver</i>	28
3.6 Preparación de macetas	28
3.7 Aplicación de tratamientos de plomo	29
3.8 Trasplante y cultivo de plantas en maceta.....	31
3.8.1 <i>Trasplante de Nicotiana</i>	31
3.8.2 <i>Trasplante de Calamagrostis</i>	32
3.8.3 <i>Trasplante de Vetiver</i> :.....	32
3.9 Riegos y prueba de lixiviación	33
3.10 Parámetros a evaluar en las especies cultivadas.....	34
3.11 Parámetros evaluados en el suelo.....	36
3.12 Diseño estadístico.....	36

IV.	Resultados y Discusión.....	38
4.1	Trabajo de Campo	38
4.1.1	Caracterización de suelo del área de estudio.....	38
4.1.2	Plomo total en las muestras vegetales tomadas en campo	41
4.1.3	Selección y Descripción de especies promisorias	46
4.2	Cultivo en invernadero	48
4.2.1	Altura de planta y efectos del plomo en <i>Nicotiana</i> , <i>calamagrotis</i> y vetiver	48
4.2.2	Concentración de Plomo en raíces y parte aérea de las plantas	57
4.2.3	Potencial fitorremediador de las plantas promisorias (Peso seco, Extracción de metal, factor de translocación)	59
4.2.4	Concentración de Plomo en el lixiviado.....	64
V.	Conclusiones.....	65
VI.	Recomendaciones	67
VII.	Referencias Bibliográficas.....	68
VIII.	Anexos	78
	Anexo 1. Mapa de puntos de muestreo	79
	Anexo 2. Caracterización de muestras de Agua.....	80
	Anexo 3. Caracterización de suelo de la Agraria	82
	Anexo 4. Análisis de primer corte de <i>Calamagrostis</i>	83
	Anexo 5. Mapa de Cantidad de especies vegetales seleccionadas por punto de muestreo	84
	Anexo 6. Base de datos de Altura de planta.....	85
	Anexo 7. Datos relacionados a potencial fitorremediador: Peso de materia seca, concentración de plomo, extracción de plomo, Factor de translocación	88
	Anexo 8. Modelo Estadístico General – Diseño Factorial	91

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Matriz para la selección de tecnologías de tratamiento para compuestos inorgánicos en suelos, sedimentos y lodos	6
Cuadro 2: Descripción de puntos de muestreo	16
Cuadro 3: Parámetros de Caracterización de suelo y agua.....	23
Cuadro 4: Cantidad de Acetato de Plomo trihidratado por tratamiento	30
Cuadro 5: Variables en estudio para las muestras vegetales	35
Cuadro 6: Caracterización de Suelo	40
Cuadro 7: Contenido de plomo en las especies vegetales	42
Cuadro 8: Descripción de especies acumuladoras de Plomo seleccionadas en campo	47
Cuadro 9: Registro fotográfico del crecimiento de <i>Nicotiana</i>	51
Cuadro 10: Registro fotográfico del crecimiento de <i>Calamagrostis</i>	54
Cuadro 11: Registro fotográfico del crecimiento de Vetiver	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Toma de muestra de suelo.....	22
Figura 2. Muestras vegetales en Laboratorio de Fertilidad UNALM.....	23
Figura 3. Flujograma de preparación de muestras vegetales para análisis	26
Figura 4. Cultivo de <i>Nicotiana</i>	27
Figura 5. <i>Calamagrostis</i> en bandeja	28
Figura 6. Macetas instaladas.....	29
Figura 7. Plántulas de <i>Nicotiana</i> trasplantadas.....	31
Figura 8. Trasplante de <i>Calamagrostis</i>	32
Figura 9. Trasplante de Vetiver	33
Figura 10. Sistema de Colección de Lixiado y líquido lixiviado	34
Figura 11. Diseño estadístico planteado	36

Figura 12. Crecimiento Promedio de <i>Nicotiana</i> por tratamiento: tratamiento 1 (700ppm Pb), tratamiento 2 (1000 ppm Pb), tratamiento 3 (1200 ppm Pb)	50
Figura 13. Crecimiento Promedio de <i>Calamagrostis</i> por tratamiento: tratamiento 1 (700ppm Pb), tratamiento 2 (1000 ppm Pb), tratamiento 3 (1200 ppm Pb).....	53
Figura 14. Crecimiento Promedio de Vetiver por tratamiento: tratamiento 1 (700ppm Pb), tratamiento 2 (1000 ppm Pb), tratamiento 3 (1200 ppm Pb)	55
Figura 15. Concentración de plomo en las plantas en estudio bajo los distintos tratamientos	58
Figura 16. Peso seco total por especie	60
Figura 17. Extracción total de Pb por especie	62
Figura 18. Factor de translocación de Plomo por especie	63
Figura 19. Resultados de prueba de lixiviación.....	64

Resumen

Pese a la elevada contaminación de plomo en el suelo, hay muchas especies vegetales que han desarrollado estrategias para prosperar bajo condiciones adversas, lo cual las convierte en especies potenciales para ser utilizadas en procesos de fitorremediación. En este estudio, se recolectaron 37 muestras vegetales de 12 sitios localizados en la ciudad de La Oroya y lago Junín (departamentos de Cerro de Pasco y Junín - Perú), lugares con pasivos mineros, seleccionando 2 especies pertenecientes a los géneros *Calamagrostis* y *Nicotiana* para su cultivo bajo 3 niveles de plomo 700 ppm, 1000 y 1200 ppm, debido a su elevada concentración de plomo encontrada en campo (3180 ppm radicular y 143 ppm aérea, y 1883 ppm en flores y 2136 ppm en Tallos respectivamente). Junto a estas fue cultivado Vetiver (*Vetiveria zizanoides*) a fin de comparar su potencial fitorremediador con el de las especies nativas mencionadas en invernadero bajo un diseño factorial con nivel de significancia de 0.01% durante 60 días en la Universidad Agraria - Lima. Del estudio se concluyó que la *Nicotiana* tiene un mejor potencial de fitorremediación por su desarrollo de biomasa aérea, la elevada concentración de biomasa (276.7 ppm en zona radicular, y 96.5ppm en zona aérea), extracción del metal (0.3 mg de Pb), capacidad de natural de translocar el metal hacia las partes aéreas e inmovilización del metal en la raíz (Factor de Translocación: 0.39) y a su mejor adaptación a otras condiciones climáticas. Se pudo corroborar también la hipótesis de que las plantas nativas son las más adecuadas para fitorremediar espacios naturales. Estos resultados podrían mejorarse con condiciones climáticas más favorables para las especies nativas así como un mayor tiempo de evaluación. Podría incluirse también algunos otros metales pesados en la evaluación a fin de determinar si estas plantas pueden usarse para fitorremediar suelos con contaminación polimetálica.

Palabras claves: Especies acumuladoras, *Calamagrostis*, *Nicotiana*, *Vetiveria zizanoides*, factor de translocación, biodisponibilidad de metal pesado, lixiviado, bioacumulación, biomagnificación, especiación.

Abstract

Despite the high pollution of lead in soils, there are many plant species that have developed strategies to grow under adverse conditions, making them potential species for phytoremediation purposes. In this study, they were collected 37 plant samples in 12 points located in La Oroya and la Junín Lake, departments of Cerro de Pasco and Junín – Peru, places with environmental liabilities, selecting 2 species of the genus of *Calamagrostis* and *Nicotiana* for their cultivation under 3 levels of lead pollution 700 ppm, 1000 ppm and 1200 ppm, due to the high concentration of lead found during field evaluation (3180 ppm roots and 143 ppm air biomass, y 1883 ppm in flowers and 2136 ppm in shoots respectively). With these ones, it was cultivated *Vetiveria zizanoides* in order to compare its potential for phytoremediation with the native species above mentioned in greenhouse under a factorial design with a level of significance of 0.01% during 60 days in the Agraria University – Lima. It was concluded from this study that *Nicotiana* has the best potential for phytoremediation due to its development of air biomass, high concentration of lead in the biomass (276.7 ppm in roots and 96.5 ppm in shoot and leaves), extraction of metal (0.3 mg of Pb), natural capacity of translocation of lead into the air biomass and immobilization of it in the root (Translocation factor FT: 0.39), and a better adaptation to different weather conditions. It was confirmed the hypothesis that native species are the most appropriated for phytoremediation of natural areas. The results obtained can be improved with weather conditions more favorable for native species and more time for evaluation. It could be included as well the evaluation of other heavy metals in order to determine if those native plants can be used in phytoremediation of those ones in polluted soils.

Keywords: Accumulator species, *Calamagrostis*, *Nicotiana*, *Vetiveria zizanoides*, Translocation factor (FT), bioavailability of heavy metals, leaching, bioaccumulation, biomagnification, speciation.

I. Introducción

La minería antigua en el Perú ha dejado muchos pasivos que la población continúa pagando en la actualidad. Según el MEM (Ministerio de Energía y Minas) el saldo de pasivos es de cerca de 7000 localizados principalmente en la Sierra peruana. Casos emblemáticos como los reportados en La Oroya y su elevada contaminación por plomo de alrededor de 3177 ppm en suelos (Reuer et al., 2012), son tan solo una muestra de lo que ha dejado a su paso una actividad que durante mucho tiempo trabajó sin el mayor cuidado ni respeto a las poblaciones locales y al medio ambiente. Así mismo, la tradición minera del país apunta a un incremento en el número de concesiones y posterior actividad minera. En los próximos años por ejemplo se proyecta inversiones que superan los US\$ 53,000 millones con proyectos mineros en Cuzco, Cajamarca, Moquegua, Tacna, Ica, Lima, Arequipa, Junín, Piura, Ancash, Huancavelica y Lambayeque (MEM). Estos proyectos luego de su actividad requerirán del tratamiento de las áreas afectadas con contaminantes (Reglamento para el cierre de minas - MEM) de una manera fácil, poco costosa y amigable con el ambiente.

Uno de los retos a los que nos enfrentamos como profesionales es el hecho de encontrar formas de recuperar los ecosistemas dañados a fin de que no sigan causando más problemas a la salud humana y a los ecosistemas, así como proponer soluciones de remediación de las nuevas zonas de uso minero. Muchos métodos para este fin se han desarrollado y se vienen investigando, sin embargo, la mayoría de las metodologías usadas tienen un elevado costo y demandan movilizaciones de terreno para ser tratado ex-situ, así como la aplicación de agentes químicos que pueden generar problemas adicionales de contaminación. Es por esto que se hace necesaria la búsqueda de formas alternativas de remediación de suelos que sean de fácil uso y costo.

Bajo este contexto, la fitorremediación o tratamiento con plantas, aparece como una potencial solución de remediación de suelos contaminados por metales pesados. Si bien es cierto, estas tecnologías biológicas tienen como principal desventaja el tiempo que puede tardar su puesta en marcha y la visualización de sus resultados, no implican una alteración del medio local; son métodos de

tratamiento in-situ, amigables con el ambiente y poco costosos (Eapen y D'Souza, 2005). Así mismo, muchas especies vegetales nativas de zonas contaminadas que han desarrollado a lo largo del tiempo cierta resistencia y tolerancia a estos contaminantes, pueden convertirse en candidatas para programas de fitorremediación, ahorrando el tiempo que normalmente toma la adaptación de especies foráneas al área a tratar.

El presente estudio tiene como objetivo principal determinar la capacidad fitorremediadora de especies de flora nativa encontradas en zonas de contaminación por plomo, esto debido a que su uso sería el más adecuado por haber desarrollado mecanismos de tolerancia al metal. Para este fin, se consideraron los siguientes objetivos específicos:

- Seleccionar en campo de las especies nativas que se desarrollan en zonas contaminadas con plomo, para luego ser cultivadas en condiciones de invernadero.
- Caracterizar el contaminado con el fin de remediarlo con las especies nativas seleccionadas.
- Evaluar su crecimiento bajo 3 distintos niveles de plomo: 700 ppm, 1000 ppm y 1200 ppm, y calcular variables indicadoras de su potencial fitorremediador.

Un aporte adicional de este estudio radica en la posibilidad utilizar estas especies nativas en programas de rehabilitación de pasivos mineros o para planes de cierre de minas de manera que el terreno afectado se pueda asemejar al paisaje original antes de ser afectado por la actividad minera.

II. Revisión de Literatura

2.1 Contaminación de Suelos

En términos generales puede definirse al suelo como un ente tridimensional vivo compuesto de materiales inorgánicos como minerales, agua y aire, que contempla una fracción orgánica, además de micro y macrofauna encargados de la degradación de la materia en el suelo. Normalmente en el suelo se encuentran en equilibrio muchas sustancias orgánicas e inorgánicas que podrían considerarse peligrosas para el hombre, y sólo cuando estas sustancias alcanzan niveles que ponen en riesgo la salud humana y el de los ecosistemas, se habla de contaminación del suelo.

Si bien muchas de las sustancias contaminantes pueden encontrarse en forma natural en el suelo, muchas de ellas tienen como fuentes principales las actividades humanas como la minería, la explotación petrolera, actividades agrícolas, industriales, inclusive las actividades en las ciudades a través del mal manejo de los residuos sólidos y aguas residuales, entre otros (Maqueda, 2003). Dentro de las principales sustancias contaminantes se incluyen a los metales pesados como el plomo, cromo, arsénico, zinc, cadmio, cobre, mercurio y níquel, siendo el plomo el objeto de estudio del presente trabajo.

En el Perú, la contaminación de los suelos debido a metales pesados es un aspecto importante debido a la tradición minera existente en el país desde tiempos ancestrales. Es sabido que hasta antes de 1990, fecha en que se promulga el código del medio ambiente en Perú, la legislación relativa a asuntos ambientales era escasa, acarreando como consecuencia problemas de contaminación de aire, agua y suelo, y afectando la salud de la población.

Un caso emblemático y persistente de contaminación de suelos en el Perú es la Oroya. En esta ciudad, desde 1922 se realizan actividades de fundición de metales, siguiendo 3 circuitos metalúrgicos: cobre, zinc y plomo. El plomo así como otras sustancias son emitidos dentro del proceso propio de una fundición, y al ser un elemento pesado, luego de contaminar el aire, se depositan en el suelo

donde se acumulan e ingresan a la cadena alimenticia donde podrían magnificar su poder contaminante de un nivel a otro (Cederstav y Barandiarán, 2002).

2.2 Plomo y sus efectos

El plomo es un contaminante mayor en el ambiente y que genera gran preocupación para la salud humana y los ecosistemas (Ortiz et al., 2009) debido a que por peso molecular tiende acumularse en suelos, sedimentos y cuerpos de agua en forma rápida (Sharma y Shanker, 2005), y a permanecer en el ambiente como un contaminante atmosférico.

En el caso de los humanos, este metal puede ingresar al cuerpo por medio de diversas vías tales como la inhalación de aire con partículas de plomo o el consumo de agua y alimentos contaminados. Según estudios, se ha determinado que los síntomas de una exposición a plomo varían desde ligeros dolores de cabeza, irritabilidad y dolor abdominal hasta síntomas relacionados con el sistema nervioso (Järup, 2003). Lo más preocupante es que los efectos de la exposición al plomo son visibles tanto a largo como a corto plazo, y no es necesaria la exposición a muy elevadas concentraciones para presentar síntomas. Así por ejemplo, se ha demostrado que una larga exposición a metales pesado en bajas concentraciones tiene una relación a la generación de tumoraciones cancerígenas (Zhao et al., 2014), siendo el cáncer al pulmón y al estómago los más reportados (Mushak, 2011b). Es muy mencionada la disminución de la capacidad intelectual en niños debido a la exposición prolongada a plomo (Järup, 2003), así como desordenes neuropsiquiátricos como deficiencia de atención y comportamiento antisocial (Bellinger, 2008). Así mismo, se ha asociado la reducción de la capacidad reproductiva a la exposición a plomo (Bellinger, 2008), así como otras enfermedades del tipo cardiovascular en adultos (Mushak, 2011a).

Para el caso de las plantas, el síntoma predominante en plantas no tolerantes al plomo es un severo retraso en su crecimiento, menor peso de las raíces y aparición de nuevos brotes en la planta (Verma y Dubey, 2003), debido a la alteración de actividad enzimática, así como de la nutrición mineral y el balance

hídrico, afectando en general el estado hormonal y celular. También, es marcada la disminución en los niveles de fotosíntesis, especialmente en la fase II de este proceso debido a la inhibición del transporte de electrones (Miles et al., 1972), con la consecuente reducción en la acumulación de carbohidratos producto principal de la fotosíntesis (Huang et al., 1974).

En muchos estudios se ha observado el proceso de bioacumulación y biomagnificación de plomo a través de la cadena alimenticia, encontrándose, por ejemplo, que existe una transferencia de Pb desde aguas contaminadas hacia el ganado ovino, acumulándose principalmente en el hígado de estos animales (Cai et al., 2009). El mismo hecho fue reportado en gallinas a través de su ingesta de insectos cuya base de alimentación eran plantas localizadas en lugares contaminados (Zhuang et al., 2009). Si bien muchos otros estudios demuestran que el plomo tiende a decrecer en concentración a su paso por la cadena trófica; sus efectos no debieran ser pasados por alto.

2.3 Técnicas de Remediación de suelos

Ante los preocupantes efectos de los metales pesados, en especial del plomo, en la salud humana y en los ecosistemas es que se hace necesaria la búsqueda de metodologías que permitan la reducción del contenido de metales pesados en los principales depositarios de éstos, como el suelo, cuerpos de agua y aire. Técnicas tradicionales de remediación de metales pesados implican tratamientos tanto ex situ como in situ del suelo contaminado. Dentro de los tratamientos ex situ del suelo se contempla el lavado de suelos con agentes quelantes¹ del tipo EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) u otros a fin de disolver el metal mediante la formación de complejos y lograr una eficiente extracción del contaminante (Pichtel y Pichtel, 1997) bajo condiciones controladas de pH (Steele y Pichtel, 1998). Otros métodos incluyen el uso de procesos electrocinéticos para promover el movimiento de los metales hacia electrodos cargados eléctricamente (Mulligan et al., 2001). Todos estos métodos sufren de serias limitaciones dado que implican remoción de suelo, alteración de sus propiedades, así como de su micro y macro flora asociada. Una de las

¹ Sustancia que forma complejos con iones de metales pesados.

principales limitaciones es el elevado costo que estas técnicas implican (Hazrat et al., 2013).

En lo que respecta a las técnicas de tratamiento in situ del suelo, si bien no se realiza remoción del suelo, estos también se basan en principios similares a los anteriores. Dentro de las técnicas más usadas se han identificado solidificación y/o estabilización del contaminante, vitrificación, remediación basada en principios de electrocinética, estabilización química, lavado del suelo, y las más recientemente estudiadas, bio y fitorremediación de suelos (Martin y Ruby, 2004).

En el siguiente cuadro (ver cuadro 1), se muestra una matriz que contempla algunos de los criterios más importantes para la selección de tecnologías de tratamiento de suelos:

Cuadro 1: Matriz para la selección de tecnologías de tratamiento para compuestos inorgánicos en suelos, sedimentos y lodos.

TECNOLOGIA	DESARROLLO	USO	COSTOS	FIABILIDAD	TIEMPO
Tratamientos fisicoquímicos					
Separación Electrocinética	Completo	Limitado	Malo	Regular	Regular
Inundación	Completo	Limitado	Regular	Regular	Regular
Lavado	Completo	Limitado	Regular	Regular	Bueno
Solidificación/ Estabilización	Completo	Amplio	Bueno	Bueno	Bueno
Extracción química	Completo	Amplio	Regular	Regular	Bueno
Reducción/ Oxidación química	Completo	Amplio	Regular	Bueno	Bueno
Separación magnética	Completo	Amplio	Regular	Regular	Bueno

«continuación»

Tratamientos Biológicos					
Fitorremediación	Completo	Regular	Bueno	Regular	Malo
Biorreactores (Lixiviados o lodos)	Completo	Amplio	Bueno	Regular	Regular
Tratamientos Térmicos					
Descontaminación por gas caliente	Piloto	Regular	Bueno	Malo	Bueno
Incineración	Completo	Amplio	Malo	Malo	Bueno
Desorción Térmica	Completo	Amplio	Regular	Malo	Bueno
Otros Tratamientos					
Excavación y Disposición	Bueno	Amplio	Bueno	Bueno	Bueno
Cubierta de los residuos	Bueno	Amplio		Bueno	Malo

Fuente: USEPA, 1997

Cabe resaltar que la selección de un método y otro también depende de las condiciones propias del suelo contaminado, y si bien por el momento los métodos biológicos como la fitorremediación de suelos no tienen mucha acogida, poco a poco toman más fuerza debido a que se presentan como una alternativa que no implica una alteración del medio local; son métodos in-situ amigables con el ambiente, no costosos (Alkorta et al., 2004) y puede ser adaptado con especies propias de la zona usando sus capacidades para acumular y/o estabilizar metales pesados.

2.4 Fitorremediación de suelos

La fitorremediación abarca todas aquellas técnicas de descontaminación de suelos basadas en el uso de plantas, las mismas que pueden tanto acumular el elemento tóxico en su estructura o reducir su peligrosidad mediante su

transformación química a sustancias estables. Según el tipo de proceso que realicen las plantas para remediar los suelos (Carpena y Bernal, 2007), se puede clasificar en:

- Fitoextracción: uso de plantas acumuladoras de elementos tóxicos o compuestos orgánicos para retirarlos del suelo mediante su absorción y concentración en las partes cosechables.
- Fitoestabilización: uso de plantas para reducir la biodisponibilidad de los contaminantes en el entorno, alterando su composición a formas más estables.
- Fitoimmobilización: uso de las raíces de las plantas para la fijación o inmovilización de los contaminantes en el suelo. Junto con la técnica anterior se les denomina de contención.
- Fitovolatilización: uso de plantas para eliminar los contaminantes del medio mediante su volatilización.
- Fitodegradación: uso de plantas y microorganismos asociados para degradar contaminantes orgánicos.
- Rizofiltración: uso de raíces para absorber y adsorber contaminantes del agua y de otros efluentes acuosos.

Este tipo de tecnologías relativamente recientes, presentan gran potencial en comparación con las tecnologías tradicionales ya que entre otras cosas, son mucho más amigable con el ambiente, menos costosas y pueden ser más fácilmente aceptadas por el público en general (Hazrat et al., 2013).

Así mismo, presentan mayor probabilidad de éxito (Kumar et al., 2013). Si bien esta tecnología tiene como algunas desventajas el tiempo en visualizar los resultados, es posible alterar algunos los factores externos que influyen en la fitorremediación para incrementar los resultados positivos.

2.5 Factores que influyen en la fitorremediación de suelos

El éxito de la fitorremediación depende de muchos factores entre los que destaca el nivel de contaminación del suelo, la accesibilidad de las raíces a los contaminantes (más conocida como biodisponibilidad del metal), y la habilidad

de las plantas a interceptar, absorber, acumular y degradar contaminantes (Vangronsveld et al., 2009) sin presentar alteraciones en su ciclo de vida (plantas acumuladoras):

2.6.1 Nivel de contaminación en el suelo

Uno de los factores que limita el éxito de la fitorremediación, y que se convierte en una de sus limitantes es el grado de contaminación en el suelo ya que el crecimiento de las plantas no es muy viable en suelos altamente contaminados (Hazrat et al., 2013). En algunas investigaciones hechas con perejil (*Petroselinum crispum*) se notó una baja y muy lenta germinación de las semillas bajo tratamientos con alto grado de contaminación (disminución del porcentaje de germinación de 62 por ciento a 33 por ciento en suelos con 50 y 150 ppm de Pb respectivamente con respecto al cultivo control) pese a haber sido descrita como especie fitorremediadora en otros estudios (Maqueda, 2003). En otros estudios también se ha reportado una disminución de hasta el 40 por ciento en la longitud de las raíces y hasta 31 por ciento en la longitud de los brotes en dos variedades de arroz Ratna y Jaya bajo tratamientos de 207.2 ppm de Pb (Verma y Dubey, 2003).

Cabe resaltar que este comportamiento es en algunos casos lineal para especies vegetales descritas como exclusoras de metal pesado (acumulan principalmente en su raíz) es decir la absorción del metal se mantiene hasta que se alcanza el valor umbral de contaminante, mientras que para especies acumuladoras que acumulan metal en la biomasa aérea, la absorción disminuye progresivamente a elevadas concentraciones (Alloway, 1995:193)

2.6.2 Biodisponibilidad del metal pesado

La biodisponibilidad del metal es tal vez el factor más importante que determina el grado de toxicidad de un contaminante, y que se convierte en un factor muy importante para determinar la eficiencia en un proceso de fitorremediación (Meers, 2004-2005). Los metales pesados en los suelos pueden encontrarse bajo distintas formas: iones libres o componentes solubles, iones intercambiables

adsorbidos en la fase sólida e inorgánica del suelo, partículas precipitadas o insolubles, complejos solubles o insolubles o incorporados en la estructura cristalina de las arcillas (Meers, 2004-2005). El metal disponible o biodisponible está compuesto por la fracción que puede ser tomada por la planta de la solución suelo, y su abundancia está fuertemente relacionada a factores físicos, químicos y biológicos (Chin, 2007).

- a. **Factores físicos:** Factores físicos como la textura de suelo influyen considerablemente en la biodisponibilidad del metal, relacionados a la capacidad de enlazar y mantener en su estructura al metal.

- b. **Factores biológicos:** La asociación de microorganismos asociados a la raíz influyen considerablemente en la biodisponibilidad del metal. Según estudios se ha concluido que la acumulación de metales pesados en plantas se incrementa considerablemente cuando se asocian a bacterias fotosintéticas o micorrizas (Tseng, 2008).

- c. **Factores químicos:** Dentro de los factores químicos se incluye el pH del suelo y la presencia de agentes quelantes en el suelo (Chin, 2007). El pH es considerado como el factor más importante relacionado con la solubilidad de los metales y su estabilidad. En términos generales, la solubilidad de los metales y su disponibilidad se incrementa a medida que el pH del suelo disminuye (Meers, 2004-2005). En lo que respecta a la presencia de agentes quelantes en el suelo, estos pueden encontrarse en forma natural en el suelo (ácidos orgánicos de bajo peso molecular y sustancias húmicas) o ser añadidos (como el EDTA) para incrementar la especiación² del metal y su disponibilidad en el suelo (Shahid et al., 2012).

En muchos estudios se ha tratado de incrementar la biodisponibilidad de los metales mediante la adición de EDTA, incrementando su solubilidad y su acumulación en las partes cosechables de las plantas (Cunningham y Ow, 1996). Otros experimentos por el contrario han buscado la reducción de la

² Formas químicas de un mismo elemento.

biodisponibilidad de los metales con la adición de sustancias derivadas del fósforo o hidróxidos de magnesio (Mench et al., 1994) en un proceso de fitoestabilización de metales (Hettiarachchi y Pierzynski, 2004), mediante la formación de complejos en condiciones ácidas (Miretzky y Fernandez-Cirelli, 2008).

En lo que respecta a enmiendas orgánicas, muchas están relacionadas a un decrecimiento en la disponibilidad del metal por cuanto favorece su reacción con otras fracciones sólidas del suelo inmovilizándose y entrando a una forma menos disponible para la planta (Sik et al., 2011). Por otro lado, ácidos orgánicos simples como el ácido cítrico favorecen la movilidad de los metales pesados exceptuando al plomo (Schwab et al., 2008).

2.6.3 Especies acumuladoras

El éxito de todo programa de fitorremediación va de la mano con una adecuada selección de especies acumuladores de metales (Salas, 2007). No todas las plantas son aptas para realizar esta labor; sin embargo en el mundo, ya se han identificado por lo menos 400 especies de plantas con el potencial para la remediación de suelos y aguas, destacándose entre ellas especies de los géneros como *Thlaspi*, *Brassica*, *Sedum alfredii* H., y *Arabidopsis* (Iqbal et al., 2008).

Estas plantas tienen la particularidad de tener un rápido crecimiento, elevado desarrollo de biomasa, así como gran tolerancia y capacidad de acumular metales en las partes cosechables de la planta, condiciones que definen a una planta como eficiente para la extracción de contaminantes (Meyer y Verbruggen, 2012).

Existen en la naturaleza plantas que poseen una notable adaptación a condiciones de elevada contaminación y son denominadas hiperacumuladoras (Verbruggen et al., 2013), y si bien aún no se tiene muy bien detallado los criterios para establecer a una especie como hiperacumuladora de metales (Van der Ent et al., 2013), se toma como base que la planta acumule al menos 1000

mg/Kg del metal en la materia seca de cualquier tejido aéreo y bajo condiciones naturales (Salas, 2007).

Las estrategias para hacerle frente a la elevada presencia de metales pesados en el suelo están definidas por la genética de la planta y se ven en cierto modo también influenciadas por el medio ambiente en el cual se desarrollan (Ovečka y Takáč, 2014). De este modo se han podido establecer algunas rutas generales seguidas para resistir a los metales pesados, acumulación y exclusión. La acumulación de plomo, que consiste en:

a) Movilización y absorción del metal: que implica una acidificación del medio por la raíz mediante la liberación de iones H^+ , de modo que se aumenta la disponibilidad del metal, y este puede ser tomado y acumulado por la planta mediante transporte pasivo y/o activo (Chin, 2007).

b) Quelación en raíces: El metal una vez dentro de la raíz sufre quelación³ en el citoplasma para ser almacenado en las vacuolas, para su posterior translocación a las zonas aéreas de la planta (Rascio y Navari-Izzo, 2011). Cabe resaltar que en algunos casos solamente hay inmovilización en las raíces, mas no translocación, lo cual se manifiesta en una elevada concentración del metal en la raíz en comparación con la biomasa aérea de la planta (Dahmani-Muller et al., 2000).

c) Translocación raíz – tallo: se realiza vía el xilema de la planta hasta alcanzar el tallo y finalmente las hojas. Esto se realiza con la ayuda de ácidos orgánicos que facilitan su transporte (Rascio y Navari-Izzo, 2011).

d) Secuestro y detoxificación del metal: Se ha demostrado que en las células de las hojas, se forma especies derivadas del plomo como $PbCO_3$ u plomo orgánico, y otros compuestos como sulfatos del plomo que quedan internalizados en las vacuolas de las hojas (Schreck et al., 2012). Por otro lado, otras especies tienden a detoxificar el metal en las hojas por medio de su sistema

³ Formación de complejo.

antioxidante celular (Rascio y Navari-Izzo, 2011). La segunda forma de tolerancia a metales consiste en la segregación de sustancias que reducen la biodisponibilidad del metal, reduciendo su entrada (Maqueda, 2003).

Mucha investigación se ha realizado con la finalidad de determinar y encontrar plantas que puedan actuar como hiperacumuladoras, y que por tanto puedan ser usadas para fitorremediación de suelos. Así por ejemplo, se ha determinado en muchos estudios que la especie *Vetiveria zizanioides* L, o vetiver es una especie con gran potencial de acumulación que no muestra severos síntomas de daño por el contaminante (Pang et al., 2003). Así mismo, esta especie posee una ventaja adicional de poseer aceites esenciales que espantan al ganado y otros animales, de modo que se previene el paso del compuesto tóxico a la cadena trófica (Andra et al., 2009).

Otros estudios se han llevado a cabo con cultivos conocidos como el caso del girasol, donde, entre otros hallazgos, se pudo corroborar su eficiencia para acumular metales pesados como plomo, zinc y cadmio, principalmente en las hojas, lo cual deja libre la posibilidad del uso posterior de esta especie (Nehnevajova et al., 2005). El maíz por su parte tiene elevado potencial acumulador de metales por su capacidad de formación de abundante biomasa aérea, acumulando plomo en raíces y cadmio y zinc en las demás estructuras de la planta (Ruiz, 2009). El tabaco también mostró gran potencial fitorremediador, acumulando principalmente el metal en su biomasa aérea (Rodríguez et al., 2006). Especies arbóreas como el sauce también tiene gran afinidad a metales pesados (Meers, 2004-2005). Si bien estas plantas consideradas hiperacumuladoras están siendo ampliamente utilizadas, es importante resaltar el nuevo enfoque de los programas de fitorremediación orientados al uso de especies nativas, las cuales ya se encuentran adaptadas a los ambientes contaminados a remediar, y el proceso de fitorremediación puede llevarse a cabo de manera más sencilla (Gerhardt et al., 2009).

2.6 Disposición de los sub-productos del proceso de fitorremediación

Posterior al proceso de fitorremediación se debe tomar especial atención al destino final de la biomasa que ha acumulado gran cantidad de metal y que puede ser una nueva fuente de contaminación para el ambiente. Algunas de las opciones propuestas son el uso de la biomasa producida para la generación de energías renovables (Meers, 2004-2005).

Así mismo, el compostaje y la combustión o gasificación de las plantas con fines energéticos puede ser tomada en cuenta con las precauciones del caso para evitar la emanación del contaminante a la atmósfera (Ghosh y Singh, 2005). Las plantas así mismo puede ser deshidratadas y dispuestas en rellenos sanitarios de residuos peligrosos, o simplemente incineradas para darle un manejo posterior a las cenizas (Panez, 2013), y de ser posible y rentable, recuperar parte del metal extraído para otros usos.



III. Materiales y Métodos

3.1 Descripción de puntos de muestreo



Para la recolección de suelo contaminado con plomo se realizó un transecto⁴ sobre las zonas con conocida contaminación por este metal en el Perú, La Oroya y los alrededores del lago Junín (límite entre los departamentos de Cerro de Pasco y Junín), seleccionando un total de 12 puntos de forma tal que se obtuviera la mayor representatividad posible del área seleccionada (ver mapa del Anexo 1), y también tomando en cuenta la accesibilidad al sitio de muestreo. Los puntos muestreados son descritos a continuación en el siguiente cuadro (ver cuadro 2):

⁴ Línea de muestreo.



Cuadro 2: Descripción de puntos de muestreo.

Código	Fecha	Ubicación	Coordenadas		Observaciones	Registro Fotográfico
			X	Y		
001	20/06/2013	Cercano al centro poblado de Huayre, departamento de Junín.	390793	8778568	Predominancia de vegetación alto andina, ichu (<i>Stipa ichu</i>) y grama (familia <i>Poaceae</i>).	
002	20/06/2013	Cercano al Puente Upamayo, departamento de Cerro de Pasco.	361902	8792460	Muestra recolectada a la orilla del lago Junín, colindante con el Bosque de Piedras. El suelo es del tipo calizo, con abundancia de cactáceas suculentas y grama alto andina (familia <i>Poaceae</i>).	



«continuación»

003	20/06/2013	Cercano al centro poblado de Ondores, departamento de Junín.	374251	8776118	Predominancia de grama corta (familia <i>Poaceae</i>).	
O - H 1 - 004	21/06/2013	Ubicado a 14 km de la Oroya, departamento de Junín.	406151	8720874	Muestra recolectada al lado de la carretera central, en el Bench Mark (BM) 10.5. Es un depósito aluvial, con predominancia de especies nativas como amor seco (<i>Desmodium</i>), ichu (<i>Stipa ichu</i>) y grama (familia <i>Poaceae</i>). Se encontró una gran diversidad de vegetación, así como contaminación por residuos sólidos domésticos.	



«continuación»

<p>O - H 2 - 005</p>	<p>21/06/2013</p>	<p>Ubicado a 9km de la Oroya, departamento de Junín.</p>	<p>403664</p>	<p>8723816</p>	<p>Depósito Coluvial. Escasa vegetación y en su mayoría arbustiva.</p>	
<p>O - H 3 - 006</p>	<p>21/06/2013</p>	<p>Frente a la refinería de la Oroya, departamento de Junín.</p>	<p>402223</p>	<p>8726140</p>	<p>Ubicada en la cercanía de la Oroya (aprox. 4 Km), exactamente en frente de la refinería de la Oroya. Escasa vegetación y en su mayoría arbustiva.</p>	



«continuación»

O - J 1 - 007	21/06/2013	Ubicado a aproximadamente 12km de la Oroya. Peaje Casaracra, departamento de Junín.	396621	8734176	Ubicado cerca al Peaje de Casaracra y cerca de una corriente de agua. Predominancia de especies nativas como ichu (<i>Stipa ichu</i>), grama corta (familia <i>Poaceae</i>), y de otras especies introducidas como kikuyo (<i>Pennisetum clandestinum</i>).	
O - J 2 - 008	21/06/2013	Ubicado a 8 km de la Oroya, instalaciones de la (Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión), departamento de Junín.			Presencia de caliza parcialmente metamorfoseada (marmolina), y vegetación del tipo grama (familia <i>Poaceae</i>) principalmente.	

«continuación»

O - J 3 - 009	21/06/2013	Ubicado a 4Km de la Oroya, Centro poblado de Paccha, departamento de Junín.	396548	8730222	Predominancia de Ichu (<i>Stipa ichu</i>).	
O - L 1 - 010	21/06/2013	Ubicado a 15Km de la Oroya, cercano al Centro poblado de Curipata, departamento de Junín.	392644	8715274	Predominancia de ichu (<i>Stipa ichu</i>).	

«continuación»

O - L 2 - 011	21/06/2013	Ubicado a 10Km de la Oroya, en el mismo Curipata, departamento de Junín.	395550	8719330	Predominancia de especies introducidas como kikuyo (<i>Pennisetum clandestinum</i>) y vegetación arbustiva.	
O - L 3 - 012	21/06/2013	Distrito de la Oroya, departamento de Junín.	398802	8723676	Predominancia de kikuyo (<i>Pennisetum clandestinum</i>) e ichu (<i>Stipa ichu</i>) (en los alrededores - cerros circundantes). En el mismo lugar, poca vegetación por ubicarse en medio de una zona altamente poblada.	

3.2 Muestreo de Suelo y Agua

De estos puntos descritos anteriormente se realizó un muestreo de suelo de la capa arable en un solo punto dado la homogeneidad del terreno (ver figura 1). Para ello, primeramente se limpió la vegetación superficial, y luego se tomó una muestra de suelo de aproximadamente 1 Kg de suelo que fue almacenado en bolsas de papel. Del punto O - H 1 - 004, se extrajo alrededor de 80 Kg de suelo para el cultivo de las plantas en macetas, esto debido a la facilidad en el acceso a dicho punto. Seguidamente, se procedió a la descripción de la vegetación predominante del sitio. También se realizó la toma de muestra de agua (Ver Anexo 2). Cabe resaltar que en algunos puntos no se podía acceder al cuerpo de agua, o no había uno cerca, por lo que no se recolectó agua en todos los puntos de muestreo.



Figura 1. Toma de muestra de suelo

3.3 Recolección de especies vegetales nativas

Para el caso de las especies vegetales, se recolectaron aquellas muestras vegetales predominantes y que presentaron características como una elevada producción de biomasa aérea, vigorosidad y madurez, las mismas que fueron almacenadas en bolsas de papel o de plástico para su traslado. En algunos casos fue posible la recolección de semillas, pero en la mayoría de los casos se recolectaron plantones completos para realizar propagación por esquejes. Del trabajo de campo se recogieron un total de 37 muestras vegetales, las cuales fueron transportadas al

Laboratorio de Fertilidad de la Universidad Nacional Agraria La Molina (ver figura 2) para su codificación y posterior análisis.



Figura 2. Muestras vegetales en Laboratorio de Fertilidad UNALM

3.4 Preparación de muestras para estudios preliminares

Las muestras recolectadas tanto de suelo como de agua fueron enviadas al Laboratorio de Análisis de Suelos para su caracterización y cuantificación de metales pesados (plomo) como parámetros de referencia. Los parámetros de caracterización de suelo se explican en el siguiente cuadro (ver cuadro 3):

Cuadro 3: Parámetros de Caracterización de suelo y agua.

VARIABLE EN ESTUDIO	METODOLOGÍA DE MEDICIÓN	REFERENCIA
pH	<p>Se utilizará el método del Potenciómetro para lo cual se ejecutará los siguientes pasos.</p> <p>Preparar una suspensión de suelo en relación 1:2.5 (masa / volumen).</p> <p>Ajustar el Potenciómetro según el manual del fabricante.</p> <p>Agitar vigorosamente la suspensión.</p> <p>Medir el pH en la suspensión en reposo.</p> <p>Leer el pH luego que se alcance la estabilización.</p> <p>Anotar los valores registrados con dos decimales.</p>	Vázquez, 2005

«continuación»

<p>Conductividad Eléctrica</p>	<p>Se utilizará el método del conductivímetro, medida en una pasta saturada de suelo. El resultado se reportará en dS m-1 a 25° C.</p>	<p>Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes. 2th Edition. Cincinatti, EPA, 1983. pp 120.1</p>
<p>Carbonatos</p>	<p>Se utilizará una curva de titulación de carbonatos con una solución de ácido clorhídrico HCL en proporción 1:1 con sulfato de hierro FeSO₄ al 5 por ciento.</p>	<p>Álvarez E, 2011</p>
<p>Materia Orgánica</p>	<p>El contenido de materia orgánica del suelo será obtenido por el método de Oxidación con dicromato de potasio.</p>	<p>Walkley y Black, 1934</p>
<p>Fósforo y Potasio Disponible</p>	<p>El fósforo será determinado por el método de Bray – Kurtz y Olsen por el Cristal Violeta, que comprende dos etapas, la primera una formación de un complejo fosfomolibdico, producto de la reacción del molibdato con iones fosfatos, seguido de la reducción del complejo por agentes reductores como ácido ascórbico, SnCl₂ que produce un color azul proporcional al contenido de fósforo.</p> <p>Para la determinación de Potasio Disponible se utilizará como extractante el acetato de amonio 1 N pH 7,0 y una posterior cuantificación del elemento por absorción atómica y fotometría de llama.</p>	<p>Metodología Olsen, 1954</p>
<p>Textura del Suelo</p>	<p>Se realizará mediante el método del Hidrómetro de Bouyoucus y asignando la clase textural en función del Triángulo textural de USDA (United State Departament of Agriculture).</p>	<p>AS – 09 NOM – 021 – RECNAT – 2000</p>

«continuación»

Capacidad de Intercambio Catiónico CIC	Se realizará una extracción con una solución de acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 1 N con pH 7 y una posterior cuantificación de manera individual por absorción atómica y fotometría de llama. Finalmente se sumaran los cationes existentes para obtener la capacidad de intercambio catiónico total	Modificado de Álvarez E, 2011
Cationes Cambiables (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+)	Se realizará una extracción con una solución de acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 1 N con pH 7 y una posterior cuantificación de manera individual por absorción atómica y fotometría de llama.	Álvarez E, 2011
Acidez Cambiable (Al^{3+} , H^+)	Se medirá utilizando el Potenciómetro luego de desplazar los protones y aluminio presentes en los sitios de intercambio de las moléculas del suelo mediante una solución tamponada de KCl 1M no tamponada.	Porta et al., 1994
Constantes Hídricas	Las constantes hídricas serán determinadas por gravimetría luego de someter la muestra de suelo húmedo a estufa por 24 horas a temperatura de 105° C.	AS – 02 NOM – 021 – RACNAT – 2000
Caracterización Botánica	La caracterización será hecha en base a los rasgos morfológicos más importantes del tallo y la hoja, siguiendo el esquema y patrones morfológicos descritos por Artschwager y Brandes (1958) junto a otras características de interés.	Rodríguez y Gonzales, 1984
Concentración de plomo	La concentración de plomo del suelo se realizará mediante el proceso de espectrofotometría de absorción atómica para lo cual se adecuará mediante una digestión con peróxido de hidrógeno al 30por ciento y ácido sulfúrico concentrado. Luego de la digestión se prepararán los estándares de plomo para obtener la curva de calibración y finalmente se procederá a su medición con el espectrofotómetro de absorción atómica.	Maqueda, 2003

En lo que respecta a las muestras vegetales, se les dio el tratamiento que se muestra en el esquema siguiente (ver figura 3):

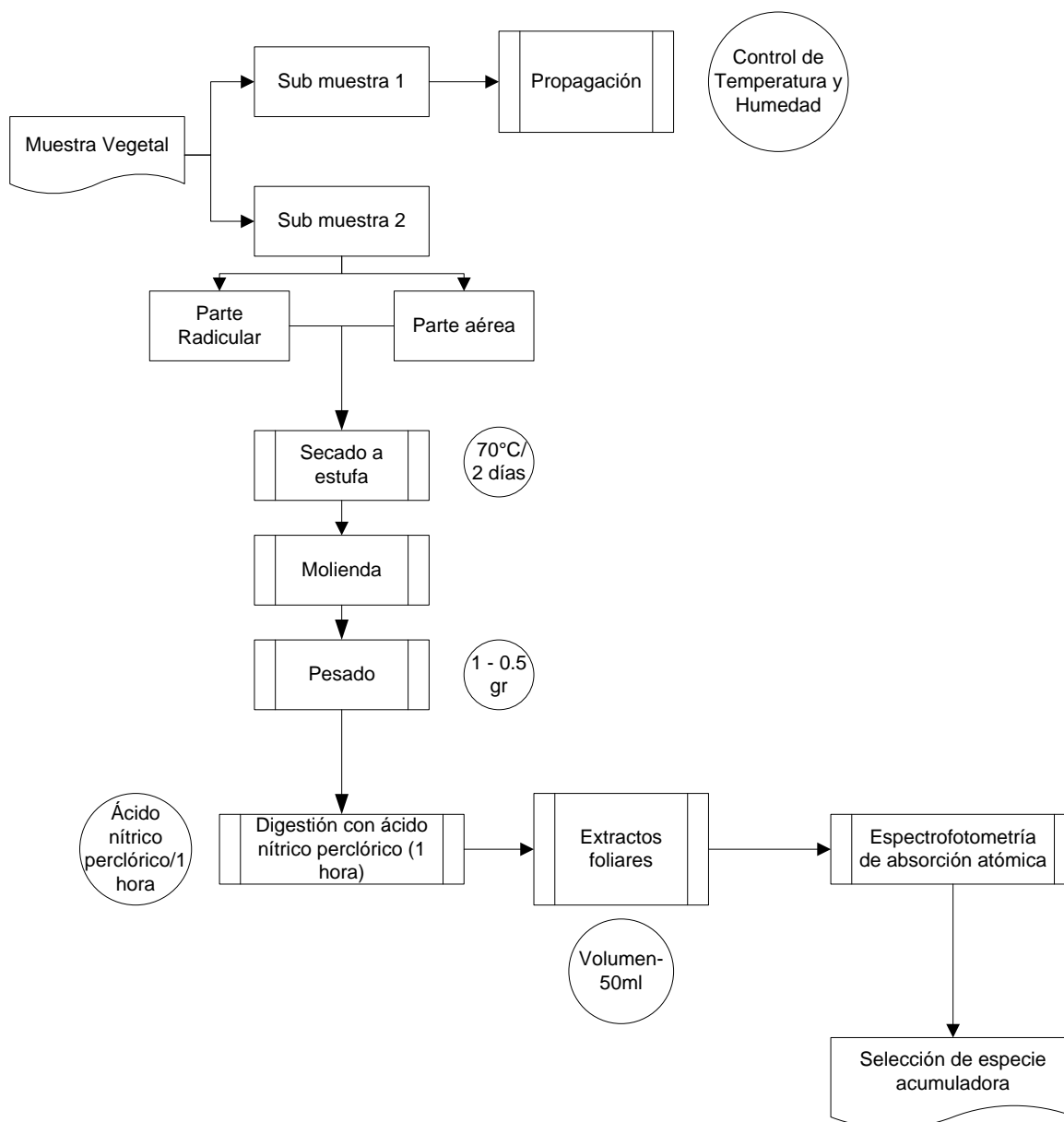


Figura 3. Flujograma de preparación de muestras vegetales para análisis

Cabe resaltar que se planteó en un primer momento realizar una caracterización botánica de las especies recogidas en campo, pero los requerimientos para dicho proceso incluían obtener las plantas en un estado fenológico en floración. Esto, para el periodo de trabajo fue difícil de obtener en campo por factores externos, por esta

razón, la caracterización botánica se realizó siguiendo algunos métodos como la comparación de los registros fotográficos con material disponible en herbarios en línea como el herbario neo tropical de especímenes o la red de información ambiental del suroeste, contrastado con información bibliográfica de la flora altoandina encontrado en fuentes impresas como tesis. Así mismo, se utilizaron nombres comunes de las plantas para poder encontrar su clasificación taxonómica.

3.5 Metodología de propagación de las especies vegetales: Germinación de las especies vegetales y propagación por esquejes

La metodología de propagación de las especies vegetales utilizadas se describe a continuación:

3.5.1 *Propagación de Nicotiana*

Para la *Nicotiana*, se realizó un cultivo en bandeja de las semillas, utilizando como sustrato arena mezclada con tierra orgánica en proporción 3 a 1 (ver figura 4a). Sin embargo, durante el desarrollo del experimento se notó que el suelo contaminado con el cual se trabajó contenía semillas de *nicotiana* que crecieron espontáneamente en otras macetas (ver figura 4b), por lo que también se realizó trasplante de las plántulas más vigorosas para completar los tratamientos en macetas.



Figura 4a. Cultivo de *Nicotiana* en bandeja



Figura 4b. Crecimiento espontáneo de *Nicotiana* en otras macetas



3.5.2 Propagación de *Calamagrostis*

Para el caso de *Calamagrostis*, se realizó un cultivo en bandeja de los esquejes utilizando la misma proporción anteriormente descrita de arena y tierra orgánica. Sin embargo y dadas las condiciones ambientales y de manejo, no se logró el prendimiento de los esquejes, por lo que se trajo nueva muestra de la especie, la cual fue directamente puesta en las macetas (ver figura 5).



Figura 5. *Calamagrostis* en bandeja

3.5.3 Propagación de Vetiver

Esta investigación también incluía un blanco de vetiver que es considerada una planta hiperacumuladora de metales pesados ampliamente utilizada para fines de fitorremediación de suelos. Para este caso se utilizó propagación por esquejes utilizando plántones de vetiver localizados en la misma universidad.

3.6 Preparación de macetas

Se utilizaron macetas de plástico de 1 kilo a las cuales se les adaptó un sistema para el recojo de líquido lixiviado que constó de una manguera delgada unida a la maceta por la base y en su otro extremo unido a una botella de medio litro (Urzelai, 2002), los mismos que estuvieron sujetos a presión, y en algunos casos se adicionó pegamento para tubo de agua para un mejor sellado. Dado que la maceta ya

contenía originalmente 3 agujeros en la parte inferior, estos fueron sellados con cinta adhesiva y el mismo pegamento de tubo de agua.

El sustrato usado en cada maceta fue suelo extraído del punto O - H 1 – 004 (ver cuadro 2) el mismo que previamente tamizado, no recibió ningún fertilizante o solución nutritiva. Se utilizó exactamente 1 kilo de sustrato por maceta. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento haciendo un total de 36 macetas, que fueron colocadas en el laboratorio de fertilidad de la Universidad Agraria la Molina para su evaluación. Sólo por motivos de seguridad y para evitar la pérdida de repeticiones, se añadió una maceta más por tratamiento (ver figura 6).



Figura 6. Macetas instaladas

3.7 Aplicación de tratamientos de plomo

Se aplicaron 3 tratamientos o niveles de concentración de plomo. En un principio se plantearon como tratamientos el nivel original de plomo en el sustrato, 500 y 1000 ppm de plomo; sin embargo, luego de la caracterización del sustrato utilizado, se encontró que los niveles originales de plomo eran de 700 ppm de plomo por lo que se replantearon los tratamientos a 700, 1000 y 1200 ppm de plomo. Éste último valor fue tomado de lo indicado en la legislación como límite permisible de plomo en suelos industriales. Para alcanzar las concentraciones requeridas se prepararon soluciones de Acetato de Plomo trihidratado ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) con agua

destilada. Los niveles de plomo así como la cantidad de sal utilizada se muestran en el siguiente cuadro (ver cuadro 4):

Cuadro 4: Cantidad de Acetato de Plomo trihidratado por tratamiento.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN DE PLOMO (ppm)/MACETA	PESO DE ACETATO DE PLOMO TRIHIDRATADO REQUERIDO (mg)/MACETA
T1	700	0
T2	1000	549.2
T3	1200	915.4

Estas soluciones fueron adicionadas a las macetas antes de realizar el trasplante con la intención de hacer este proceso en suelo húmedo. Para lograr una distribución del contaminante a lo largo de todo el perfil de suelo en la maceta, se determinó primero la capacidad de campo del suelo, y se preparó la solución con toda el agua requerida para alcanzar dicho nivel de humedad, que para el caso fue 400 ml de agua.

Se pensó en un inicio adicionar un tratamiento en el cual no se contara con contaminación, para poder comparar el crecimiento de las especies en condiciones de cero contaminación. Sin embargo, ante la dificultad de obtener un sustrato de similares características al sustrato utilizado en el experimento en términos de textura, contenido de materia orgánica, carbonatos, nutrientes, etc., se utilizó el suelo de la agraria, pero los resultados no fueron los esperados por tratarse de un suelo pobre para la planta (ver Anexo 3), por lo que se descartó este tratamiento.

3.8 Trasplante y cultivo de plantas en maceta

El trasplante a las macetas se realizó por etapas dado el diferente crecimiento de las especies, y para fines de evaluación, se igualaron los tiempos de crecimiento. El inicio de la propagación se realizó a fines del mes de noviembre del 2013 e inicios de diciembre del mismo año. El desarrollo de las especies vegetales en estudio fue durante los meses de diciembre 2013, enero, febrero y marzo del 2014, meses coincidentes con la estación de verano.

3.8.1 *Trasplante de Nicotiana*

Para el caso de la *nicotiana* y en el tratamiento T3 correspondiente a 1200 ppm de plomo, se trasplantaron las plántulas directamente de la bandeja de crecimiento (Ver figura 7a). Luego de 21 días, se trasplantó a los tratamientos restantes T1 y T2 (correspondientes a las concentraciones de 700 y 1000 ppm de plomo respectivamente) aquellas plántulas que crecieron en forma espontánea en las otras macetas del experimento (ver figura 7b). En promedio de 2 plantas por maceta para evitar la pérdida de la repetición a causa de muerte de la planta. Para el análisis se igualaron los tiempos.



Figura 7a. Plántulas trasplantadas de bandeja de crecimiento



Figura 7b. Plántula trasplantada en maceta

3.8.2 *Trasplante de Calamagrostis*

Para el caso de las plántulas de *calamagrostis* fueron propagadas por esquejes separados del plantón completo, y colocadas directamente en las macetas respectivas (ver figura 8a). Una vez sembrados, los esquejes permanecieron en las macetas alrededor de un mes para esperar su prendimiento. Cuando esto sucedió, se procedió a realizar un corte a 2 cm para empezar la evaluación y también homogeneizar las unidades experimentales. Para no omitir la cantidad de plomo que pudiese haber sido absorbido por los brotes de la planta durante el periodo de prendimiento, los cortes fueron analizados en laboratorio de análisis de suelo; pero dado que la concentración obtenida fue muy pequeña, esta se desestimó para los resultados finales (ver Anexo 4). Cabe mencionar que al igual que en el caso de las *nicotianas*, se colocó más de un esqueje por maceta para evitar pérdida de unidades por muerte de la planta.



Figura 8a. Trasplante de *Calamagrostis*



Figura 8b. Corte a 2 cm.

3.8.3 *Trasplante de Vetiver:*

Para el caso del vetiver, también se realizó un trasplante de esquejes (ver figura 9a), sin embargo el periodo de prendimiento de los esquejes fue más rápido, y al cabo de 13 días de permanecer en las macetas, se realizó un corte a 4 cm de la base para comenzar la evaluación (ver figura 9b). Cabe mencionar que al igual que en el caso

de las *nicotiana*, se colocó más de un esqueje por maceta para evitar pérdida de unidades por muerte de la planta.



Figura 9a. Trasplante de Vetiver



Figura 9b. Corte a 4 cm.

3.9 Riegos y prueba de lixiviación

La frecuencia y volumen de riego en este caso fue variado dado que el proceso de evaporación fue muy intenso por haberse realizado el experimento durante la estación de verano. Por esta razón los riegos se realizaron en general cada 2 días con un volumen medio de 200 ml por maceta. Cabe resaltar que esto era variado según los requerimientos de la planta, tomando como indicadores de riego el estado de humedad del suelo y el estado hídrico de la planta, determinados a simple vista.

Dadas las condiciones climáticas, y en algunos casos no fue posible realizar las pruebas de lixiviación con la frecuencia quincenal propuesta inicialmente a lo largo de los 2 meses de evaluación. Así mismo, no se corrió el riesgo de realizar riegos pesados para evitar la muerte por ahogamiento de las plantas. Por estas razones, sólo se realizó dos recolecciones de líquido lixiviado (ver figura 10), los mismos que fueron enviados al laboratorio de análisis de suelos de la Universidad Agraria para las lecturas de concentración de plomo por espectrofotometría de absorción atómica.



Figura 10. Sistema de Colección de Lixiado y líquido lixiviado

3.10 Parámetros a evaluar en las especies cultivadas

Las especies cultivadas fueron evaluadas utilizando variables como la altura de planta y características visuales de las mismas registradas fotográficamente durante su periodo de crecimiento.

Para la determinación del contenido de plomo en la biomasa de la planta, se las retiró de la maceta al cabo de 60 días aproximadamente. Si bien es cierto en el proyecto de tesis se estimó un tiempo de 12 semanas antes de la cosecha, durante el desarrollo del experimento se optó por retirarlas antes del tiempo previsto dado que todas las plantas debían permanecer el mismo tiempo en las macetas para poder comparar los resultados, y en este caso, el vetiver ya había alcanzado una altura considerable a los 60 días. Las plantas, una vez cosechadas fueron cuidadosamente lavadas, y se separó la parte aérea de la parte radicular. Luego de registrar peso fresco de ambos, fueron puestos a estufa por alrededor de 24 horas. Una vez secas, se registró el peso seco, y luego se siguió el mismo procedimiento que el planteado en los estudios preliminares para la preparación de extractos foliares, con la

diferencia que se llevó la muestra a un volumen de 25 ml con un peso aproximado de 0.5 gramos de muestra. En algunos casos se trabajó con un volumen de hasta 10 ml debido a la poca muestra vegetal conseguida luego de la molienda.

En base a los resultados obtenidos de contenido de plomo en la biomasa de la planta, se calcularon algunas otras variables con el fin de determinar el potencial fitorremediador de las especies en estudio. Dentro de las mencionadas se tiene (ver cuadro 5):

Cuadro 5: Variables en estudio para las muestras vegetales.

VARIABLE	DESCRIPCION
Concentración de plomo en el sistema radicular	Información estimada para obtener el potencial fitorremediador y fitoextractor de plomo de la planta
Concentración de plomo en la biomasa aérea de la planta (hojas y tallos)	
Extracción de Plomo (Poder de fitorremediación de plomo)	Será determinado en base al contenido total de plomo en la planta tanto en el sistema radicular como en la biomasa aérea (Solís 2009) en gramos
Factor de Translocación (FT)	Medida del transporte interno de un metal e indica la relación entre la concentración acumulada en la parte aérea y la raíz de una planta. Se determina a través de la siguiente fórmula (Rojas 2010) $FT = \frac{[Metal]en\ parte\ aérea}{[Metal]en\ raíces}$

La tolerancia a metales pesados (IT), variable que vincula la elongación de las raíces de las plantas en un medio con plomo y la elongación en un medio sin plomo, y que fue inicialmente propuesta, fue desestimada debido a que la forma y tamaño de la maceta donde se cultivan las plantas influye en el espacio físico de enraizamiento, y por tanto en la longitud final del sistema radicular (McConnaughay

et al., 1993), lo cual podría no ser representativo del real crecimiento de las raíces en condiciones naturales.

3.11 Parámetros evaluados en el suelo

Los parámetros evaluados en el suelo fueron pH del suelo y Conductividad eléctrica (CE). Para este fin se tomó una única muestra de la cada maceta siguiendo el método del cuarteo. La muestra fue tomada luego de aproximadamente 3 semanas posterior a la cosecha de las plantas para lograr una consistencia de suelo que permita la toma de muestra fácilmente. De ella, se tomó 20 gr que fueron disueltos en 20 ml de agua destilada. Luego de agitarlos se procedió a la lectura de pH y CE con los electrodos respectivos.

3.12 Diseño estadístico

Se planteó un diseño estadístico factorial tomando como factores a las especies de plantas (*vetiver*, *nicotiana*, *calamagrostis*), y a los niveles de contaminante en el suelo (700, 1000 y 1200 ppm). Las unidades experimentales, en este caso, fueron las plantas que crecían en cada maceta. Se aplicó un total de 4 repeticiones por tratamiento, haciendo un total de 36 macetas en evaluación, tal y como se muestra en la figura (ver figura 11).

		FACTOR 1		
		T1 – 700ppm	T-2 1000ppm	T-3 1200ppm
FACTOR 2	Vetiver	4	4	4
	<i>nicotiana</i>	4	4	4
	<i>calamagrostis</i>	4	4	4

Figura 11. Diseño estadístico planteado

Durante el desarrollo del experimento, y ante la eventualidad de perder alguna unidad experimental por muerte de la planta, se agregó una repetición a cada uno de los tratamientos mencionados, sin embargo, para la evaluación, se mantuvo el número de 4 repeticiones planteadas a inicio. Para poder realizar el descarte del dato adicional (5 en lugar de 4), se realizó un análisis de cajas para poder descartar los valores extremos, o aquellos que incrementaban la variabilidad de los datos (Ver Anexos 6, 7 y 8). Las variables medidas y analizadas fueron: altura de planta (para los días 37 y 58 del experimento), materia seca, concentración de plomo, extracción de plomo y factor de translocación.

Las variables de altura de planta (para ambos días), materia seca, concentración de plomo, extracción de plomo y factor de translocación no cumplieron con los supuestos de normalidad y/o homogeneidad de variancias, así que fue necesaria una transformación, siendo el método elegido el de Box Cox. Así mismo, y por conveniencia, se realizó un test de Tukey en lugar de Dunnett, todo esto con un nivel de significancia de 0.01. Las corridas estadísticas, así como la verificación de los supuestos del modelo, y la transformación de datos para el cumplimiento de dichos supuestos fueron realizados con la ayuda del software libre R.

IV. Resultados y Discusión

4.1 Trabajo de Campo

4.1.1 Caracterización de suelo del área de estudio

En el siguiente cuadro (ver cuadro 6) se muestran los resultados de caracterización de los puntos muestreados dentro de área de estudio. Los puntos de muestreo ubicados en los transectos que incluyen la ciudad de la Oroya: O – H1 – 004, O – H2 – 005, O - J 3 – 009, presentan las cantidades más considerables de plomo (701.9 ppm, 654.2 ppm y 527 ppm respectivamente) en suelo.

Este elevado nivel de contaminación puede deberse a dos causas fundamentalmente: La primera a la actividad de la fundición metalúrgica de la Oroya ubicada cerca al área de estudio debido a proceso de deposición atmosférica (Steinnes et al., 1989). Este hecho es por ejemplo en España donde se encontró una elevada contaminación por Plomo, Zinc y Cadmio en campos agrícolas y pasturas localizados en los alrededores de una antigua mina de Plomo y Zinc, siendo el drenaje ácido y el transporte del material particulado por el viento las principales causas de dispersión de la contaminación (Rodríguez et al., 2009).

La segunda posible causa es el flujo vehicular cerca al área de estudio. Esta misma situación ha sido reportado en otras ciudades como Damasco (Siria), donde se ha encontrado que la principal causa de contaminación de suelos urbanos por metales pesados son las emisiones vehiculares (Möller et al., 2005). Así mismo, el Taiwán, se ha reportado emisiones relativamente elevadas de metales pesados provenientes de los motores diésel (58 700 Kg por año de Ag, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Sr, Ti, V y Zn) debido al contenido de estos en los combustibles (Wang et al., 2003). En Ibadán Nigeria también ha sido reportado una concentración de plomo en suelo de 205 ppm en zonas aledañas a las autopistas Ibadán-Ilorin e Ibadán-Iwo relacionados con la tráfico vehicular (a mayor distancia de la autopista,

menor concentración de plomo en el suelo) debido al uso de gasolinas con plomo añadido en los automóviles (Olajire y Ayodele, 1997).

Cuadro 6: Caracterización de Suelo.



Código	pH	CE (μS/cm)	CaCO3 (%)	MO (%)	P (ppm)	K (ppm)	Textura	CIC	B (ppm)	Cu (ppm)	Fe (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)	Pb (ppm)	Cd (ppm)	Cr (ppm)
001	7.46	0.27	0	5.1	5.4	102	Franco	19.2	1.2	3	32.55	6.2	14.75	70.63	0.79	5.33
002	7.27	0.39	2.9	3.36	2.9	83	Franco-Arenoso	17.6	0.2	13.3	24.2	5.3	51	139.3	2.53	11.29
003	5.05	0.11	0	4.77	19.4	98	Franco	25.6	0.3	1.5	365	10.6	4.7	50.85	0.37	25.26
O - H 1 - 004	7.44	0.34	19.6	1.79	43.2	269	Franco Limoso	28.32	1	38	8.3	2.8	267	701.9	16.45	8.17
O - H 2 - 005	7.37	1.99	16.7	1.18	55.6	117	Franco	14.08	0.7	78	2.4	2.1	510	654.2	92.9	12.52
O - H 3 - 006	7.64	0.26	9.5	0.22	9.3	211	Franco	8	0.4	36	26.3	2.6	49	296.1	8.17	6.69
O - J 1 - 007	7.78	0.32	22.9	3.52	3.8	226	Franco	17.92	0.7	5.2	37.4	6.5	14	55.38	1.04	9.96
O - J 2 - 008	7.57	0.28	5.5	6.42	17.1	576	Franco	35.2	0.8	2.7	4.4	5.3	38.5	164.65	3.6	22.03
O - J 3 - 009	6.86	0.19	0.9	3.87	21.2	236	Franco	16	0.3	43	36	7	162	527	8.16	12.12
O - L 1 - 010	7.55	0.26	6.7	4.42	4.9	148	Franco Arenoso	13.28	0	9.9	22.4	8.4	47	170.25	3.33	5.97
O - L 2 - 011	8.03	0.34	67.3	0.94	6.4	129	Franco Arenoso	4.8	0.7	24.4	15	2.6	29.6	214.05	4.29	1.3
O - L 3 - 012	7.59	1.51	20.5	1.54	30.5	496	Franco	11.2	2.7	22.9	9.5	8	154	285.7	6.11	5.1

4.1.2 Plomo total en las muestras vegetales tomadas en campo



Posterior al análisis de todas las especies vegetales tomadas en campo, se encontró una mayor diversidad de especies en el punto O – H1 – 004, tal y como se observa en el mapa (ver mapa de especies – Anexo 5). Esto puede deberse a que las condiciones climáticas y edafológicas de la zona son adecuadas para el desarrollo de las especies vegetales, tomando en cuenta que si las plantas cubren sus necesidades de nutrientes se pueden desarrollar adecuadamente (Kim y Owens, 2011).

Así mismo, la diversidad de plantas en el área de estudio podría estar influenciada también por su ubicación con respecto a la Refinería de La Oroya debido a que a mayor distancia de la fuente de contaminación, la cobertura vegetal por lo general se incrementa. En Harjavalta ubicado al Sur oeste de Finlandia, se reportó una ausencia casi total de vegetación a 0.5 Km de una fundidora de Níquel y Cobre, y que la cobertura vegetal así como su riqueza se incrementaba a mayor distanciamiento de dicha fundidora (Salemaa et al., 2001). De las 37 especies evaluadas, 8 fueron encontradas con un potencial interesante de acumulación de plomo, de las cuales solo 2 fueron seleccionadas. Las especies, así como su contenido de plomo y la justificación de su elección se muestran en el siguiente cuadro (ver cuadro 7).



Cuadro 7: Contenido de plomo en las especies vegetales.

Código de área	Especies acumuladoras		Concentración de Plomo ppm		Justificación de elección	Registro Fotográfico
	Nombre común	Género/ Especie	Z. Aérea	Z. Radicular		
003	Tipo de pasto	<i>Agrostis/ Agrostis mertensii</i>	178	505	Acumulacion de plomo elevada y principalmente en la zona Radicular.	 <p>Referencia para identificación: http://fm1.fieldmuseum.org/vrrc/?page=view&id=63227</p>
O - H 1 - 004	Amor Seco	<i>Desmodium</i>	450	406	Esta planta acumula relativamente bien, pero lo hace principalmente en la zona aérea.	 <p>Referencia para identificación: Visita en campo</p>



«continuación»

	<i>Calamagrostis</i>	<i>Calamagrostis</i> / <i>Calamagrostis vicunaru</i>	143	3180	Planta con elevado potencial acumulador y principalmente en la zona radicular.	 <p>Referencia para identificación: http://fm2.fieldmuseum.org/vrrc/max/P/OAC-cala-vicu-per-1809156.jpg</p>
	Tipo de Pasto	<i>Muhlenbergia</i> / <i>Muhlenbergia fastigiata</i>	1205	1164	Elevado potencial acumulador. La acumulacion se da de manera pareja en la zona aérea y radicular.	 <p>Referencia para identificación: http://swbiodiversity.org/imglib/seinet/ASU/ASU0011/ASU0011806.jpg</p>

«continuación»

	Planta Rastrera	<i>Glandularia</i>	394	1045	Planta con elevado potencial acumulador y principalmente en la zona radicular.	 <p>Referencia para identificación: http://www.ojs.darwin.edu.ar/index.php/darwiniana/article/view/527/579#dos</p>
O - H 2 - 005	<i>Nicotiana</i>	<i>Nicotiana thyrsiflora</i>	Flores: 1882; Tallo: 2136		Esta planta acumula relativamente bien, pero lo hace principalmente en la zona aérea.	 <p>Referencia para identificación: http://fm2.fieldmuseum.org/vrrc/max/SOLA-nico-thyr-2165126.jpg</p>

«continuación»

	Posiblemente <i>Astragalus pickeringii</i>		Todo: 410.5		Potencial acumulador medio y no se pudo identificar en que zona de la planta acumula más metal.	 <p>Referencia para identificación: Tesis UNALM</p>
	<i>Calamagrostis</i>	<i>Calamagrostis</i>	71	915	Planta con elevado potencial acumulador y principalmente en la zona radicular.	 <p>Referencia para identificación: Visita de campo</p>



4.1.3 Selección y Descripción de especies promisorias

Las dos especies vegetales seleccionadas a partir de los resultados preliminares fueron *Nicotiana thyrsoflora* y *Calamagrostis vicunarum*, y su selección fue hecha en base a criterios de hipertolerancia al metal, factor clave requerido para procesos de fitorremediación (Chaney et al., 1997), esto manifestado en su capacidad de desarrollarse en sitios contaminados con el metal pesado, y más aún acumularlo en su biomasa (Aggarwal y Goyal, 2007).

Ambas especies en condiciones de campo acumularon más de 1000 ppm de Pb en su materia seca (*Nicotiana*: Flores: 1882 ppm de Pb en flores, y 2136 ppm en tallos; *Calamagrostis*: 3180 ppm en materia seca radicular) valor base utilizado para establecer a una determina especie como hiperacumuladora de metal (Salas, 2007) por lo que de acuerdo a este criterio se podría concluir que ambas especies presentan dicho comportamiento para plomo.

Si bien es poco conocido el desempeño en fitorremediación de ambas especies seleccionadas, hay trabajos de este tipo realizados con especies de las familias *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Poaceae*, siendo la última la familia del *Calamagrostis* (Audet y Charest, 2008), planta utilizada en el presente estudio. Así mismo, se han reportado estudios con especies como *Nicotiana glauca* del mismo género que la *Nicotiana* en estudio, demostrando cualidades para fitorremediar metales pesados (Barazani et al., 2004). En el siguiente cuadro (Ver cuadro 8) se describe las principales características de cada una.

Cuadro 8: Descripción de especies acumuladoras de Plomo seleccionadas en campo.

Género/ Especie	Familia	Origen	Características físicas	Potencial Acumulador de Plomo	Registro Fotográfico en campo
<i>Nicotiana/ Nicotiana thyrsiflora</i>	Solana- ceae	Sudamé- rica - Perú	<p>Hierva alta con flores verdosas. Plantas perennes, anuales o bianuales. Plantas de 1m de alto. Referencia: http://apps.rhs.org.uk/plantselector/plant?plantid=1331. http://fm2.fieldmuseum.org/vrrc/max/SOLA-nico-thyr-2165126.jpg.</p>	Acumula gran cantidad de metal y no es usada como forraje.	
<i>Calamagrostis/ Calamagrostis vicunarium</i>	Poacea	Pastos de puna.	<p>Gramínea perenne cespitosa entre 5 y 20 cm de altura. Crecimiento de hojas formando como ramilletes. Sus hojas son filiformes, involutas, flexuosas y miden entre 2 a 5 cm de largo. Presenta panículas espiciformes de 1 a 6 cm de largo. Sus espiquillas son unifloras de aprox. 5mm sostenidas por raquillas escasamente pubescentes y rígidas. Lemma de 3.5 a 4mm, denticulada en el ápice, con una arista dorsal geniculada, raquilla de 0.5 mm de largo, pelos cortos y escasos.</p>	Acumula en mayor proporción en la raíz.	

4.2 Cultivo en invernadero

Las plantas anteriormente descritas juntamente con vetiver, a manera de tratamiento blanco comparador, fueron cultivados en macetas en una segunda etapa del trabajo de investigación. El sustrato utilizado en las macetas se extrajo del punto O – H1 – 004, el cual presentó un elevado contenido de plomo (701.9 ppm), lo que llevó a replantear el experimento utilizando como tratamiento inicial el contenido original de metal pesado de este suelo, metodología explicada anteriormente. A continuación se presentan los resultados del desarrollo de dichas especies bajo de los tratamientos contaminantes:

4.2.1 Altura de planta y efectos del plomo en *Nicotiana*, *calamagrotis* y vetiver

- a) *Nicotiana*: Las plántulas de *nicotiana* fueron trasplantadas tal y como se indica en la sección de metodología (3.8.1). Durante su crecimiento no fue notoria la influencia de la contaminación por plomo en ninguno de los tratamientos, y el crecimiento en general fue parejo, y en algunos casos un tanto mayor en aquellas plantas que se encontraban bajo los tratamientos más severos con plomo (tratamiento T2 y T3), tal y como se muestra en la siguiente figura (ver figura 12).

El metal pesado tiene en su mayoría una influencia negativa en la función de las hormonas de crecimientos tales como las giberinas, auxinas y citoquininas (Gangwar et al., 2014), lo cual se opondría a lo obtenido en el presente experimento. Sin embargo, el efecto de estimulación del crecimiento bajo pequeñas dosis de un potencial tóxico conocido como Hormesis (Stebbing, 1982) podría ser la causa de este comportamiento. Así por ejemplo, la estimulación del crecimiento bajo diferentes dosis de metales pesados como el plomo ha sido reportada en otras especies. Así por ejemplo, *Vicia Faba* mejora su crecimiento en sustratos con concentraciones de Pb que varían entre 25 y 250

ppm, alcanzado alturas hasta de 30 cm, mientras que su altura comienza a disminuir a partir de este límite, mostrando una curva de crecimiento en forma de U invertida (Wang et al., 2010). Otro ejemplo reportado es de *Arabis paniculata*. Esta *Brassicaceae* presenta un incremento en el crecimiento de raíces y brotes en 17.1 por ciento y 43.2 por ciento a concentraciones de 48 μM de Pb (1 μM = 0.21 ppm), incremento que se va reduciendo a medida que se añade más plomo en el sustrato, mostrando signos de necrosis a concentraciones superiores a 178 μM de Pb (Tang et al., 2009).

Al no tener referencias de estudios previos sobre el potencial de fitorremediación y comportamiento bajo condiciones de contaminación de la especie en estudio, no se puede tener la certeza de la concentración de plomo a la cual hay inhibición de los procesos fundamentales de la planta (crecimiento, fotosíntesis, etc.), por lo que se podría presumir que la *Nicotiana* ha desarrollado la habilidad de tolerar y acumular plomo, y más aún estos niveles de plomo han inducido el desarrollo de la especie, por lo menos bajo los tratamientos indicados en el presente trabajo.

Así mismo, se ha determinado en algunos estudios la existencia de bacterias endofíticas⁵ asociadas a plantas hiperacumuladoras de metales pesados que juegan un rol importante en su supervivencia, así como en su crecimiento (Rajkumar et al., 2009). Para el caso de *Nicotiana Tabacum*, se encontraron *Sanguinobacter* sp., *Enterobacter* sp. y *Pseudomonas* sp., en plantas cultivadas en suelos enriquecidos con metales como Cadmio y Zinc cuya función es contribuir al incremento en la absorción de dichos metales, así como el desarrollo de biomasa radicular y aérea (Mastretta et al., 2009 citado por Ma et al., 2011). Si bien estas bacterias no han sido reportadas en asociación a sustratos con Pb, estas podrían bien existir y contribuir al desarrollo de la especie en estudio.

⁵ Bacterias que residen en el interior de las plantas

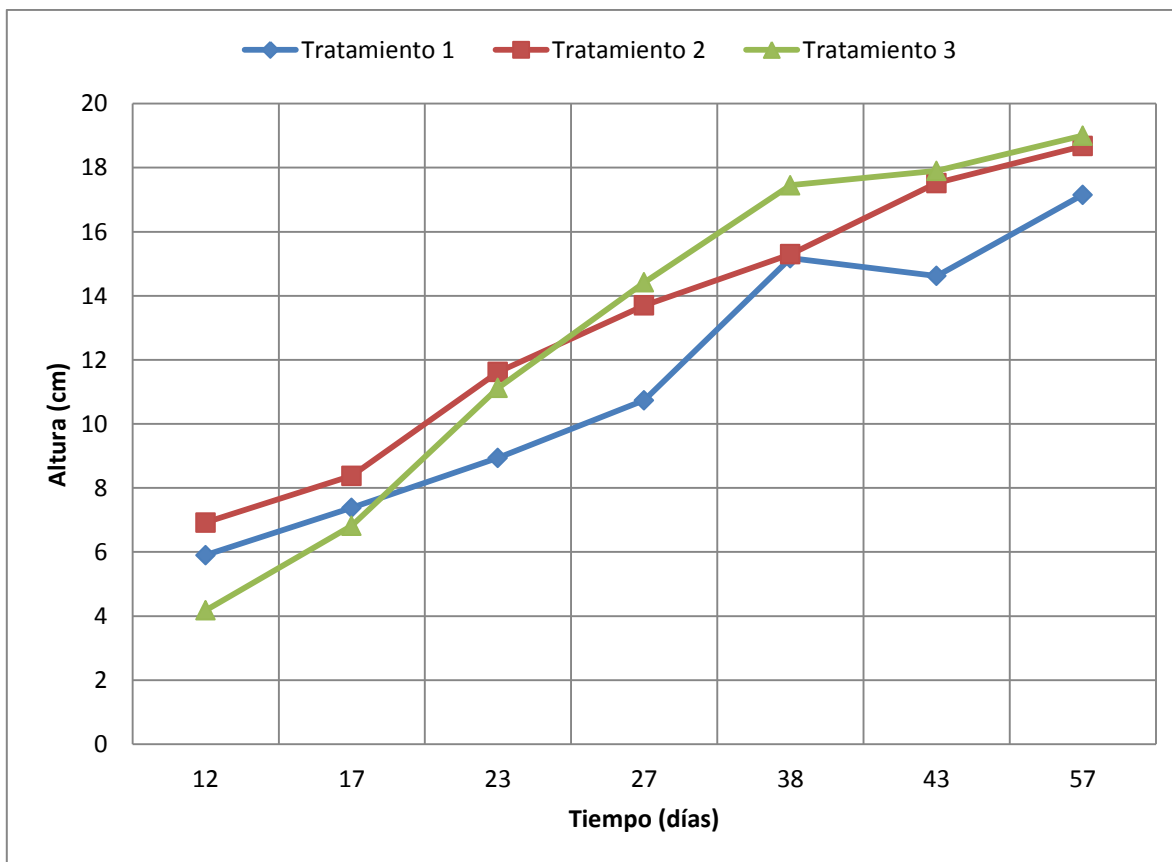











Figura 12. Crecimiento Promedio de *Nicotiana* por tratamiento: tratamiento 1 (700ppm Pb), tratamiento 2 (1000 ppm Pb), tratamiento 3 (1200 ppm Pb)

El gráfico muestra ciertas diferencias en cuanto a la altura alcanzada bajo los 3 tratamientos en los días 37 y 58, las cuales no fueron estadísticamente significativas. En el día 37, la mayor altura fue alcanzada por las plantas bajo el tratamiento más severo de contaminante T3 (17.5 cm), mientras que los tratamientos T1 y T2 alcanzaron en promedio alturas de 15.2 y 15.3cm respectivamente. En el caso del día final de medición de altura (día 58), la mayor altura alcanzada fue por parte de las plantas bajo el tratamiento T3 (19 cm), mientras que para los tratamientos T1 y T2, las alturas promedio fueron de 17.2 y 18.7cm respectivamente. Así mismo, el aspecto físico de la planta no varió mucho en los tratamientos realizados, lo cual puede ser observado en el registro fotográfico correspondiente (ver cuadro 9). Cabe resaltar que sí se presentó un problema de plagas que fue tratado con insecticida casero.

Cuadro 9: Registro fotográfico del crecimiento de *Nicotiana*.

Tratamientos	Tiempo (días)		
	10	27	Cosecha (aprox. 60 días)
T1			
T2			
T3			

- b) *Calamagrostis*: En el caso de esta especie, el crecimiento de las plantas bajo los distintos tratamientos siguió un patrón similar al de las *nicotianas*, es decir, en los tratamientos con mayor concentración de contaminante se presentó una mayor altura de la planta, tal y como se muestra en la figura (ver figura 13).

En una comparación hecha para los días 37 y 58, momentos en que según la figura 14 hay aparente diferencia, esta no resultó significativa, siendo el promedio más alto de altura para el día 37 el correspondiente al tratamiento T2 (12.7 cm). Para el día 58, si bien la mayor altura fue registrada en el tratamiento T2 (11.5 cm), se observó un decrecimiento de la muestra vegetal. Esto puede ser debido a que en las macetas se colocaron más de un esqueje de los cuales se iba midiendo el de mayor altura, pero en algunos casos, los esquejes se iban muriendo debido al ciclo natural de la planta.

Al igual que en el caso anterior de la *Nicotiana* (ver apartado anterior), las concentraciones de plomo utilizadas podrían estar estimulando el crecimiento de la especie (Hormesis). A diferencia del caso anterior, y al encontrarse un menor crecimiento de la planta bajo el tratamiento más severo con plomo (T3 = 1200 ppm de Plomo) en comparación con el tratamiento medio (T2 = 1000 ppm de Plomo), podría presumirse que en este punto se estaría alcanzando el umbral de toxicidad donde se observan efectos dañinos en la planta.

En cuanto a la presencia de bacterias endofíticas que podrían beneficiar a la planta en lo que respecta a su crecimiento y función fitorremediadora, se ha reportado cepas de *Methylobacterium oryzae* y *Burkholderia* sp. en tejidos de *Oryza sativa* (especie de la misma familia *Poaceae* que la especie en estudio) que estimulan el crecimiento de la planta y la acumulación de cadmio en sus tejidos (Madhaiayn et al., 2007 citado por Rajkumar et al., 2009). Al igual que en el caso de la *Nicotiana*, si bien estas bacterias no han sido reportadas en asociación a sustratos con Pb, estas podrían bien existir y contribuir al desarrollo de la especie en estudio.

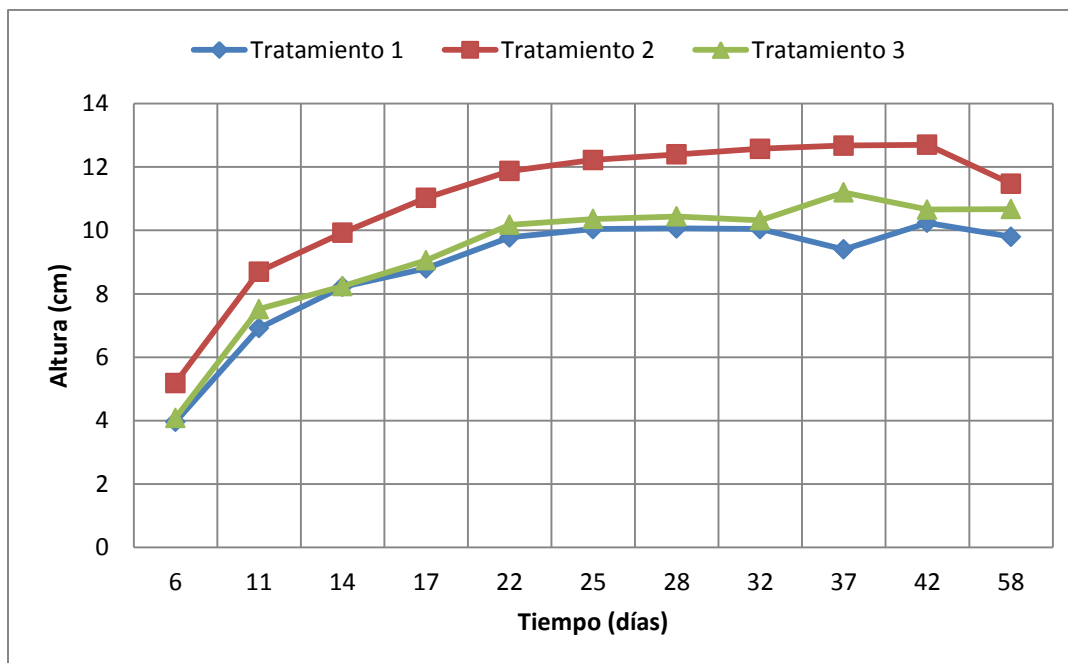














Figura 13. Crecimiento Promedio de *Calamagrostis* por tratamiento: tratamiento 1 (700 ppm Pb), tratamiento 2 (1000 ppm Pb), tratamiento 3 (1200 ppm Pb)

Así mismo, el aspecto físico de la planta no varió mucho en los tratamientos realizados, lo cual puede ser observado en el registro fotográfico correspondiente (ver cuadro 10).

Cuadro 10: Registro fotográfico del crecimiento de *Calamagrostis*.

	Tiempo (días)			
	6	17	52	Cosecha (aprox. 60 días)
T1				
T2				
T3				

c) Vetiver: Del igual manera no fue significativa la diferencia de altura promedio del vetiver bajo los 3 tratamientos con plomo (ver figura 14), pese a esto la mayor altura fue registrada en el día 58 bajo el tratamiento T1 que contenía menor nivel de contaminante (63.4 cm). Esto podría indicar que a elevadas concentraciones de plomo se puede observar un efecto negativo en el desarrollo de la planta, en términos de biomasa aérea. El efecto en el crecimiento de la planta puede ser justificado dada la influencia generalmente negativa del contaminante plomo en las hormonas de crecimiento (Gangwar et al., 2014), alteración de la fotosíntesis en lo que respecta al transporte de electrones (Miles et al., 1972), entre otros.

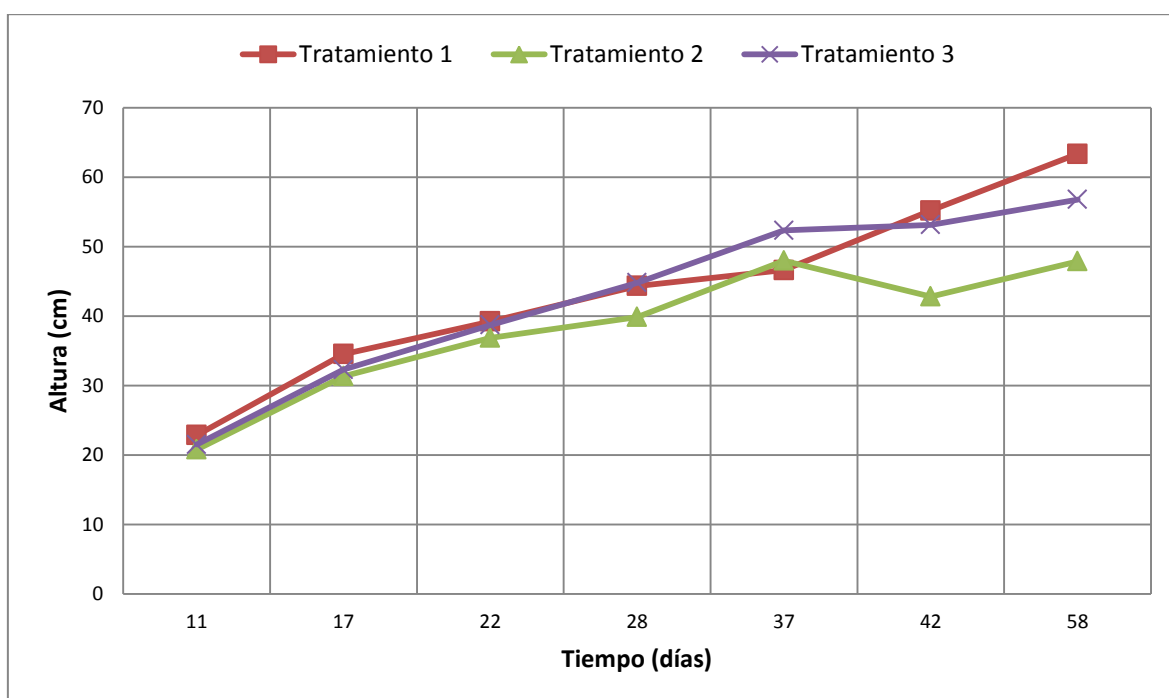











Figura 14. Crecimiento Promedio de Vetiver por tratamiento: tratamiento 1 (700 ppm Pb), tratamiento 2 (1000 ppm Pb), tratamiento 3 (1200 ppm Pb)

Así mismo, el aspecto físico de la planta no varió mucho en los tratamientos realizados, lo cual puede ser observado en el registro fotográfico correspondiente (ver cuadro 11).

Cuadro 11: Registro fotográfico del crecimiento de Vetiver.

Tratamientos	Tiempo (días)		
	6	25	Cosecha (aprox. 60 días)
T1			
T2			
T3			

En base a lo antes descrito, y tomando en cuenta la poca influencia del nivel de contaminante en el crecimiento de las plantas, podría deducirse que todas tienen un elevado potencial de fitorremediación (Ruiz, 2009). Sin embargo, y tomando como criterio de eficiencia en extracción de metal por parte de las plantas, un rápido crecimiento, elevado desarrollo de biomasa aérea y tolerancia al metal (Meyer y Verbruggen, 2012), podría a simple vista definirse al vetiver como la mejor planta para acumular plomo para las condiciones dadas, debido a que estadísticamente presentó un mayor crecimiento en comparación a las especies nativas durante las dos evaluaciones de altura realizadas (48.99 cm el día 37, y 56.03 cm el día 58).

Así mismo, para ambos momentos la *nicotiana* presentó mayor altura (15.98 cm para el día 37 y 18.28 cm para el día 58) en comparación con el *calamagrostis* (11.09 cm para el día 37 y 10.65 cm para el día 58), valores estadísticamente significativos, definiendo en este caso a la *nicotiana* con un mayor potencial de fitorremediación en comparación con el *calamagrostis*. Esto debe ser corroborado con la determinación de otros factores más adelante calculados.

4.2.2 Concentración de Plomo en raíces y parte aérea de las plantas

Las características del suelo influyen de manera directa la disponibilidad de plomo en el suelo, y su posterior absorción y acumulación por la planta. Si bien muchas plantas pueden sobrevivir a un ambiente contaminado mediante la exclusión del metal, en este caso, luego del análisis de campo, se descartó esta opción para las plantas en estudio debido al elevado contenido de plomo encontrado en ellas; por lo que se realizó la cuantificación del metal pesado en la biomasa aérea y radicular de la planta en macetas bajo distintos tratamientos. Los resultados de dicha acumulación se muestran en la siguiente figura (ver figura 15):

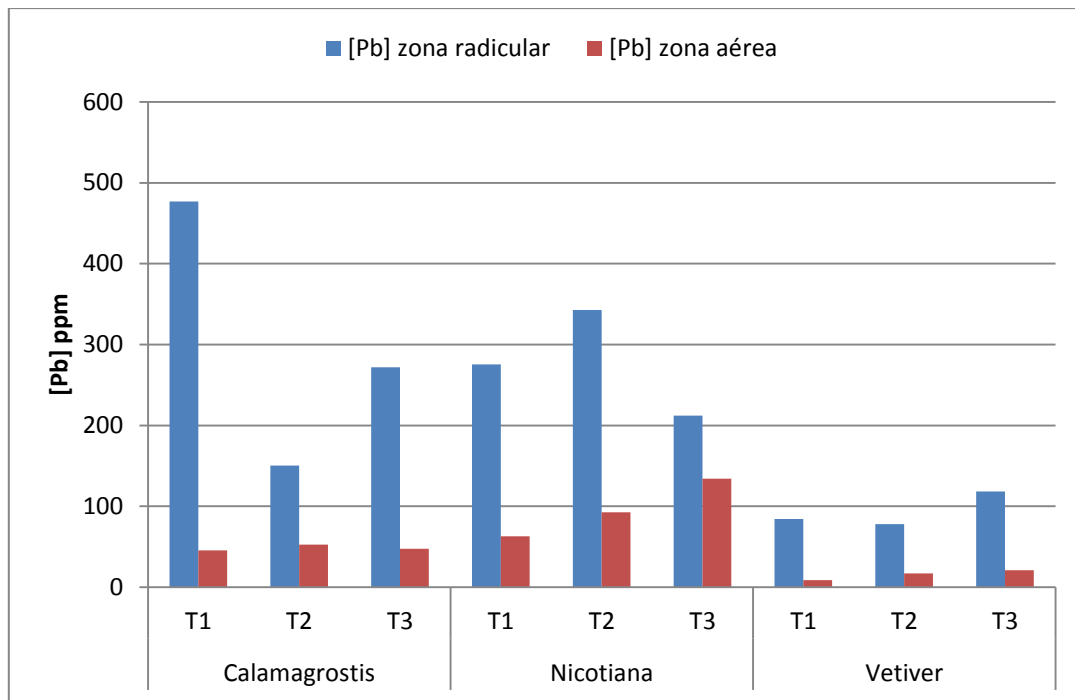


Figura 15. Concentración de plomo en las plantas en estudio bajo los distintos tratamientos

Del gráfico se puede afirmar que se logró una absorción del metal considerable, especialmente en las muestras de *calamagrostis* y *nicotiana*. Estadísticamente para un nivel de significancia de 0.01, se pudo observar que no es significativa la interacción entre los niveles de plomo en el suelo, y las especies vegetales en estudio en lo que respecta a la acumulación de plomo tanto en la zona aérea y la zona radicular. Lo que sí es significativamente mayor es la acumulación promedio de plomo en la zona radicular del *calamagrostis* (299.8 ppm) y de la *nicotiana* (276.7 ppm) con respecto al *vetiver* (93.5 ppm).

Así mismo, es mayor la concentración promedio de plomo encontrada en la zona aérea de las *nicotianas* (96.5 ppm) con respecto al *calamagrostis* (48.4 ppm) y al *vetiver* (15.6 ppm). Es sabido el elevado potencial del *vetiver* para fitorremediación de sitios contaminados con plomo (Andra et al., 2009) y su amplia difusión en estudios de este tipo. Sin embargo, bajo las condiciones dadas, esto no pudo ser verificado, encontrándose una mayor capacidad fitorremediadora para el caso de las especies nativas *calamagrostis* y *nicotiana*. Esto pudo deberse a una mayor actividad de los exudados radiculares de éstas

dos últimas especies que juegan un rol importante en la disolución y biodisponibilidad del plomo (Koo et al., 2010).

Así mismo, es muy probable también que en la rizósfera (zona del suelo influenciada por la raíces) de las plantas nativas (*calamagrostis* y *nicotiana*), ya adaptadas a las condiciones del suelo, se hayan activado de manera más eficiente microorganismos encargados de incrementar la especiación del plomo a formas fácilmente extraíbles por la planta (Lin et al., 2004). Este efecto no pudo ser observado para el caso del vetiver que alcanzó niveles muy bajos de plomo en su biomasa, tanto aérea como en la zona radicular, debido probablemente al hecho de que el plomo en general es absorbido por plantas en pocas cantidades (Punamiya et al., 2010), las cuales pueden ser incrementadas solo con algunos compuestos adicionales como el EDTA, ampliamente utilizado en estudios de fitorremediación con vetiver (Chen et al., 2004). Esto podría indicar que si bien el vetiver es una especie que puede tolerar elevadas cantidades de plomo en su biomasa, necesita de otros agentes que le ayuden a incrementar los niveles de absorción de este metal.

Por otro lado, en el gráfico se puede observar en general una acumulación de plomo inferior a la registrada en campo para las especies de *calamagrostis* y *nicotiana* independientemente del nivel de contaminación de plomo en el suelo (*nicotiana* 4018 ppm y *calamagrostis* 3180 ppm de Pb en campo). Eso podría ser explicado al corto tiempo de evaluación en invernadero (60 días) en comparación con el tiempo de crecimiento en su hábitat natural (Cataldo y Wildung, 1978). Así mismo, las condiciones de clima de costa y de manejo en invernadero son diferentes a los observados en campo (zona altoandina), aspectos que pudieron haber influido en el resultado final de acumulación de plomo.

4.2.3 Potencial fitorremediador de las plantas promisorias (Peso seco, Extracción de metal, factor de translocación)

La determinación del potencial fitorremediador de las plantas en estudio fue realizado mediante el cálculo de variables que actúan como indicadores de dicho potencial. Así por ejemplo, fue determinado el peso seco del material vegetal

como indicador del desarrollo de biomasa vegetal (Rojas, 2010), bajo el supuesto de que a mayor cantidad de biomasa, mayor la probabilidad de degradar o acumular el metal pesado, en este caso plomo (Campos, 2011). Los resultados de esta variable se muestran en la siguiente figura (ver figura 16):

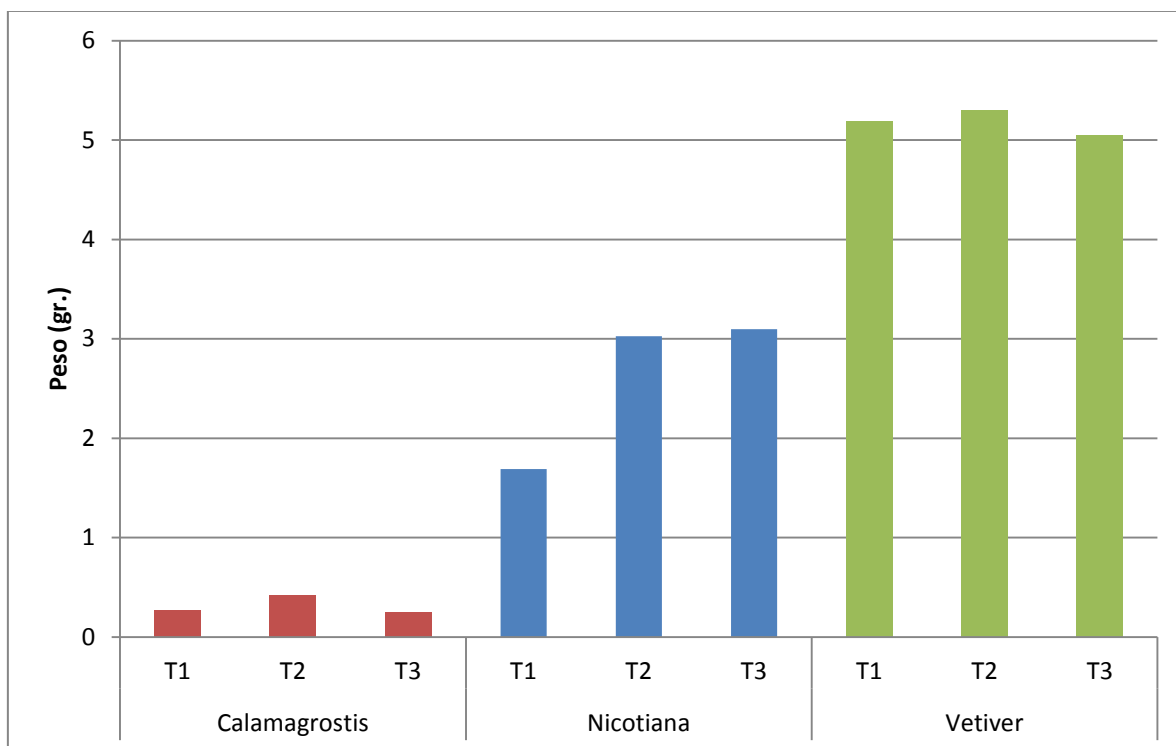


Figura 16. Peso seco total por especie

Del gráfico se puede observar un bajo desarrollo de la biomasa aérea por parte del *calamagrostis* (0.3 gr.) y la *nicotiana* (2.6 gr.) con respecto al *vetiver* (5.2 gr.), diferencia que es estadísticamente significativa. Hay que resaltar que el presente experimento se desarrolló en condiciones poco favorables para las plantas nativas, las cuales están mejor adaptadas a zonas altoandinas, con un clima frío y seco, mientras que la prueba fue desarrollada durante los meses de verano en la ciudad de Lima, con temperaturas que oscilaron entre los 25-30° C, elevada radiación solar y humedad. Cabe resaltar para el caso del *calamagrostis* que su periodo de vida y crecimiento es un poco largo, y dadas las características de la planta al momento de su cosecha, se puede indicar que la planta se encuentra en su periodo de elongación, que corresponde a un crecimiento lento y un menor rendimiento de biomasa (Rodríguez, 1984), por lo que hace suponer que con un poco más de tiempo, y con mejores condiciones climáticas, su

rendimiento en términos de peso seco pueda incrementarse. Así mismo cabe resaltar que por motivos de demora en los resultados de laboratorio, los esquejes originales de *calamagrostis* no pudieron ser propagados, por lo que nuevo material fue colectado. Este nuevo material pudo no ser la misma variedad de planta, haciendo variar los resultados de invernadero con los obtenidos en campo, tal y como fue reportado en distintos cultivares de arroz, siendo el cultivar *Hybrid Indica* el que acumula más plomo en sus granos comestibles (Liu et al., 2013). El mismo es el caso de la *nicotiana*, que son plantas arbustivas de gran biomasa aérea, pero con un ciclo de vida más prolongado. En el caso del vetiver, el crecimiento es normal y concuerda con lo reportado en otras investigaciones (Yang et al., 2003).

El peso seco, así como la concentración de plomo en la biomasa de las plantas en estudio está íntimamente ligado a una de las variables que indica el poder fitorremediador de las plantas, la extracción de plomo (ver figura 17). Para esta variable, se observa que en promedio la extracción de plomo del *calamagrostis* (0.03 mg) es significativamente menor que la extracción de la *nicotiana* (0.3 mg) y vetiver (0.27 mg), y la diferencia entre estas dos últimas no es significativamente diferente. En este caso, se puede observar un mayor potencial fitorremediador de la *nicotiana*, dado que concentra más plomo en su biomasa y extrae una cantidad interesante de metal pesado, pese a no haber alcanzado su máximo desarrollo. Por otro lado, y si bien no es significativa la diferencia, pero cabe mencionar que la cantidad de metal extraído se incrementa a medida que aumenta la concentración de metal pesado en el suelo, especialmente para el caso de la *nicotiana*, y esto concuerda con otros resultados reportados sobre extracción de metal pesado bajo distintos niveles de contaminación de metal en el suelo (Tanhan et al., 2007).

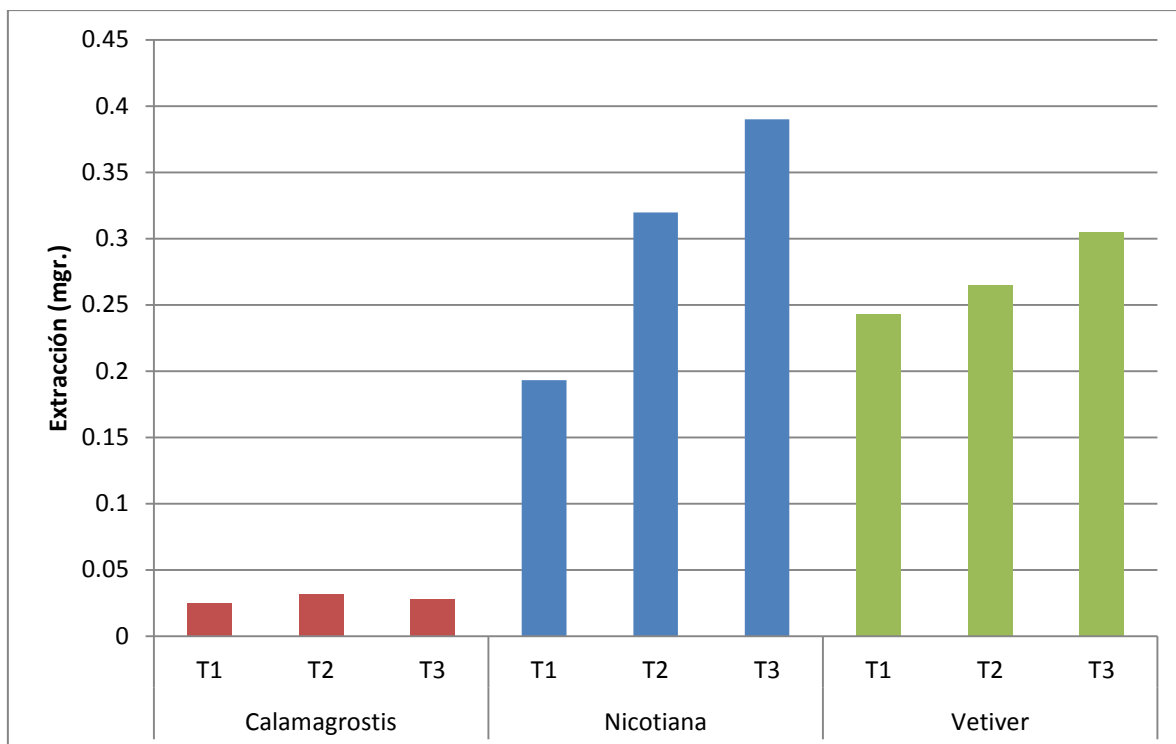


Figura 17. Extracción total de Pb por especie

Otra variable utilizada como medida de potencial fitorremediador de plantas es el factor de translocación, que indica la relación entre la concentración acumulada en la parte aérea y la raíz de una planta. Es preferible que este factor sea elevado para garantizar la detoxificación del metal en las hojas de plantas (Rascio y Navari-Izzo, 2011) o su en su defecto su inmovilización en las vacuolas de las células de las hojas (Schreck et al., 2012) para su posterior disposición final. Pese a esto, una buena alternativa es tener un valor bajo de factor de translocación, que implicaría una acumulación mayor de plomo en la zona radicular; esto podría tener la ventaja de reducir los efectos de bioacumulación y biomagnificación de plomo a través de la cadena alimenticia (Tiwari et al., 2011), en especial en aquellas especies como el *calamagrostis* que son utilizadas como forraje (Rodríguez, 1984). Del análisis estadístico, se obtuvo diferencia significativa en el factor de translocación alcanzado por las distintas especies (ver figura 18), siendo el vetiver (0.14) el que tuvo menor valor de este factor en comparación con los otras dos especies *calamagrostis* (0.31) y *nicotiana* (0.39), entre las cuales no se encontró diferencia significativa. Estos valores inferiores a la unidad indicarían que las especies en estudio son plantas que utilizan mecanismos de fitoestabilización del metal pesado (Yoon et

al., 2006), o inmovilización del metal pesado en la raíz (Ho et al., 2008), al menos para las condiciones dadas (pH (alcalino), contenido de materia orgánica (menor a 2 por ciento), entre otros (Ver caracterización del suelo inicial). A partir de las evaluaciones de campo la tolerancia al plomo por parte de estas especies es evidente. No obstante se podría proponer el uso de enmiendas como el EDTA (Chen et al., 2004) para incrementar la translocación del metal hacia las partes cosechables de la planta (Kumar et al., 2013). Sin embargo, y dependiendo del uso de las plantas, o de su disposición final, o la función en el ecosistema de las especies, puede ser favorable su permanencia como exclusoras (que acumulan el metal preferentemente en la zona radicular).

Así mismo, se observó una mayor translocación del plomo en las *nicotianas* bajo el tratamiento más severo de plomo en suelo (0.79), resultando esta diferencia significativamente mayor comparado con las otras combinaciones planta/nivel de contaminante. Este valor coincide con el comportamiento observado en campo, así como con el reportado en otros estudios con cultivares de arroz, demostrando que el cultivar *Japonica* es el más adecuado para crecer en suelos contaminados (Liu et al., 2013), y puede estar relacionado con las propias características de las plantas.

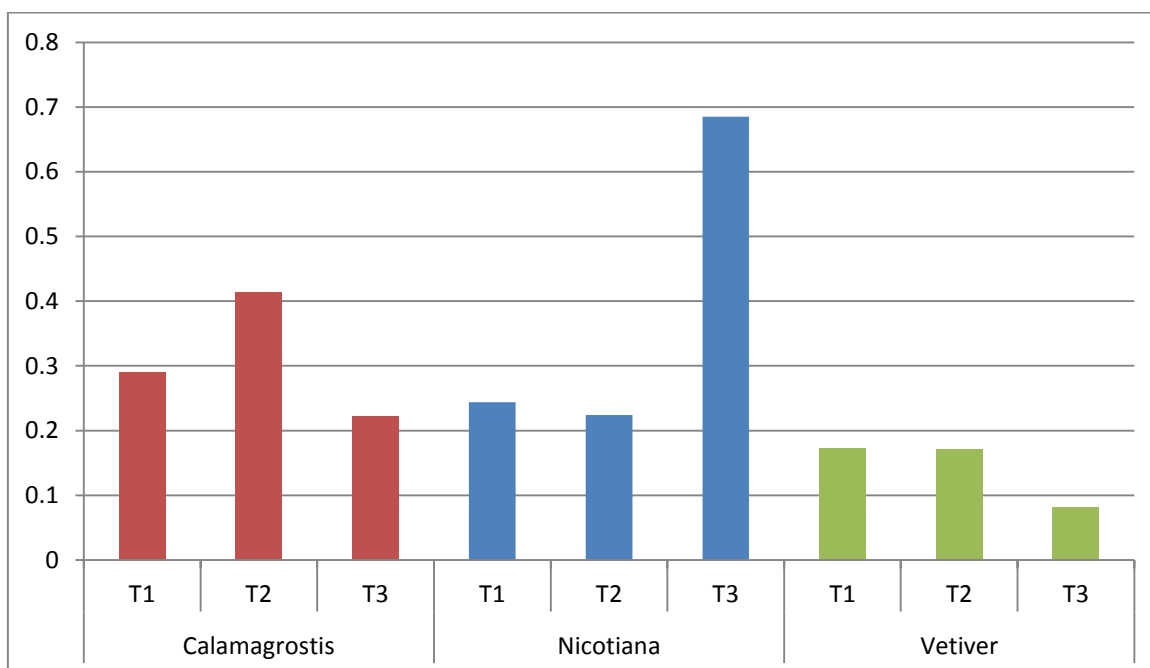


Figura 18. Factor de translocación de Plomo por especie

4.2.4 Concentración de Plomo en el lixiviado

La evaluación del líquido lixiviado fue en dos momentos, siendo el primero a aproximadamente 35 días de crecimiento de la planta, y a 50 días (ver figura 19). Cabe resaltar que estos días son referenciales puesto que hubo diferencia en el tiempo de trasplante y cosecha de las plantas, específicamente para el caso de la *nicotiana*, en los tratamientos T1 y T2. Pese a esto, se pudo observar una disminución casi general de la cantidad de plomo en el líquido lixiviado en el último muestreo comparado con el primero. Esto podría deberse al efecto de la planta, es decir, a que ésta absorbió parte del metal pesado con el paso del tiempo de tratamiento, o también, que las condiciones del suelo tales como pH, potencial de óxido reducción (Chuan et al., 1996), o contenido de materia orgánica del suelo puedan haber sufrido alteraciones con el tiempo que disminuyan las pérdidas de plomo por lixiviación (Cataldo y Wildung, 1978).

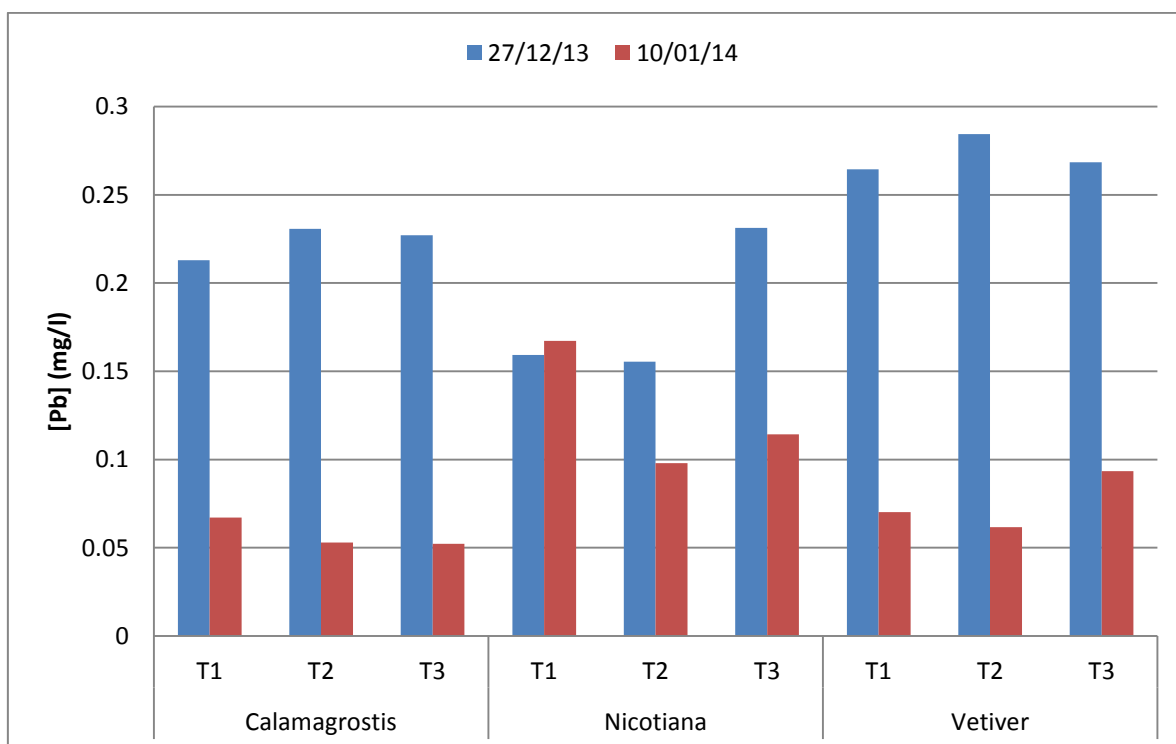


Figura 19. Resultados de prueba de lixiviación

V. Conclusiones

1. Para las condiciones del presente estudio, la *Nicotiana* tiene un mejor potencial de uso para fines de fitorremediación, corroborando la hipótesis de que las plantas nativas son las más adecuadas para fitorremediar sus propios espacios naturales.
2. Según el estudio, las especies nativas *Calamagrostis* y *Nicotiana* son acumuladoras de plomo; en su hábitat natural demuestran comportamiento de hiperacumulación de plomo.
3. Las especies vegetales nativas con potencial fitorremediador encontradas en campo pertenecen a los géneros *Calamagrostis*, *Nicotiana*, *Glandularia*, *Muhlenbergia*, *Desmodium*, de las que se seleccionaron las dos primeras.
4. El punto de muestreo de suelo O - H 1 – 004, ubicado a 14 km de la Oroya, departamento de Junín, y a una altitud promedio de 3700 msnm presentó los niveles más altos de contaminación del suelo en lo que respecta a plomo (701.9 ppm).
5. De las plantas en estudio, la *Nicotiana* fue la que más plomo acumuló en la biomasa aérea (96.5 ppm). Así mismo extrajo la mayor cantidad de plomo (0.3 mg) y obtuvo un factor de translocación de plomo de 0.39.
6. El *Calamagrostis* fue la que acumuló más metal pesado en la zona radicular (299.8 ppm) y presentó un factor de translocación de 0.31. Así mismo fue la que menos biomasa aérea desarrolló durante el experimento (0.3 gr).
7. El Vetiver para las condiciones de estudio acumuló menos cantidad de plomo comparado con las otras dos especies en estudio (93.5 ppm en zona radicular y 15.6 ppm en biomasa aérea); pese a esto extrajo igual cantidad de metal que la *Nicotiana* (0.29 mg) compensado por su elevado desarrollo de biomasa (5.2 gr en promedio).

8. No se observó influencia de los tratamientos con plomo en el crecimiento (altura) ni en las características visuales (apariencia, color, turgencia) de las especies en estudio.

VI. Recomendaciones

1. Es recomendable realizar la parte experimentan en condiciones climáticas similares a las encontradas en su hábitat natural.
2. Sería recomendable realizar la prueba con las especies nativas con un periodo más prolongado de tiempo, de manera que se pueda obtener el máximo desarrollo de las especies, y evaluar así el máximo potencial de ellas para acumular el metal.
3. Es recomendable realizar el experimento con la adición de agentes que incrementen la biodisponibilidad del metal como el EDTA o enmiendas orgánicas para determinar la máxima cantidad de metal tolerable por estas especies nativas.
4. Sería recomendable aplicar lo encontrado en este trabajo en una fase de campo, en parcelas experimentales.
5. Se recomienda estudiar a las especie nativas utilizadas para conocer su ciclo de vida, su función en el ecosistema y el momento en el cual tiene mayor acción fitorremediadora.
6. Sería recomendable realizar la prueba con otros metales pesados a fin de determinar si estas plantas pueden usarse para fitorremediar suelos con contaminación polimetálica.
7. Se recomienda profundizar el estudio sobre las bacterias endofíticas que podrían estar asociadas a las especies en estudio, así como el efecto de Hormesis y los umbrales de tolerancia a metales pesados por parte de estas especies.

VII. Referencias Bibliográficas

1. Aggarwal, H. y Goyal, D. 2007. Chapter 5 Phytoremediation of some heavy metals by agronomic crops. *Developments in Environmental Science*. 5: 79–98. DOI: 10.1016/S1474-8177(07)05005-X.
2. Alkorta, I.; Hernández-Allica, J.; Becerril, J.M.; Amezaga, I.; Albizu, I.; Garbisu, C. 2004. Recent Findings on the Phytoremediation of Soils Contaminated with Environmentally Toxic Heavy Metals and Metalloids Such as Zinc, Cadmium, Lead, and Arsenic. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 3: 71–91. DOI: 10.1023/B:RESB.0000040059.70899.3d.
3. Alloway. B. 1995. *Heavy Metals in Soils*. 2da Edición. Gran Bretaña. Blackie Academic & Professional. 368.
4. Andra, S.; Datta, R.; Sarkar, D.; Makris, K.; Mullens, C.; Sahi, S.; Bach, S. 2009. Induction of Lead-Binding Phytochelatins in Vetiver Grass [*Vetiveria zizanioides* (L.)]. *J. Environ. Qual.* 38:868–877. DOI: 10.2134/jep2008.0316.
5. Audet, P.; Charest, C. 2008. Allocation plasticity and plant–metal partitioning: Meta-analytical perspectives in phytoremediation. *Environmental Pollution*. 156: 290–296. DOI: 10.1016/j.envpol.2008.02.010.
6. Barazani, O.; Sathiyamoorthy, P.; Manandhar, U.; Vulkan, R.; Golan-Goldhirsh, A. 2004. Heavy metal accumulation by *Nicotiana glauca* Graham in a solid waste disposal site. *Chemosphere*. 54: 867–872. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2003.10.005.
7. Bellinger, D. 2008. Very low lead exposures and children's neurodevelopment. *Current Opinion in Pediatrics*. 20: 172–177. DOI: 10.1097/MOP.0b013e3282f4f97b.
8. Cai, Q.; Long, M.L.; Zhu, M.; Zhou, Q.Z.; Zhang, L.; Liu, J. 2009. Food chain transfer of cadmium and lead to cattle in a lead–zinc smelter in Guizhou, China. *Environmental Pollution*. 157: 3078–3082. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.048>.
9. Campos, V. 2011. Fitorremediación de contaminantes persistentes: una aproximación biotecnológica utilizando chopo (*Populus Spp.*) como sistema modelo. Ph.D. Thesis. Madrid, España. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes en la Universidad Politécnica de Madrid. 228.

10. Carpena, R. y Bernal, M. 2007. Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente*. 16 (2): 1–3.
11. Cederstav, A. y Barandiarán, A. 2002. *La Oroya no espera*. Ed. Chirinos, C.; Lu, M. Ed. 1. Lima, Peru. 131.
12. Chaney, R.; Malik, M.; Li, Y.M.; Brown, S.L.; Brewer, E.P.; Angle, J.S.; Baker, A.J. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*. 8: 279–284. DOI: 10.1016/S0958-1669(97)80004-3.
13. Chen, Y.; Shen, Z.; Li, X. 2004. The use of vetiver grass (*Vetiveria zizanioides*) in the phytoremediation of soils contaminated with heavy metals. *Applied Geochemistry*. 10: 1553–1565. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apgeochem.2004.02.003>.
14. Chin, L. 2007. Investigations into Lead (Pb) Accumulation in *Symphytum officinale* L.: A Phytoremediation Study. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in Plant Biotechnology. Christchurch, New Zealand. University of Canterbury. 329.
15. Cunningham, S.; Ow, D. 1996. Promises and Prospects of Phytoremediation. *Plant Physiol*. 110: 715-719. DOI:10.1104/pp.110.3.715.
16. Dahmani-Muller, H.; Van Oort, F.; Gélie, B.; Balabane, M. 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution*. 109: 231–238. [http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00262-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00262-6).
17. Eapen, S. y D'Souza, S. 2005. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances*, 23(2), 97-114.
18. Gangwar, S.; Pratap, V.; Kumar, D.; Kumar, D.; Mohan, S.; Narayan, J. 2014. Chapter 10 – Plant Responses to Metal Stress: The Emerging Role of Plant Growth Hormones in Toxicity Alleviation. *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*. 2: 215–248. DOI: 10.1016/B978-0-12-800875-1.00010-7.
19. Gerhardt, K.; Huang, X.D.; Glick, B.; Greenberg, B. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*. 176: 20-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.09.014>.
20. Ghosh, M. y Singh, S.P. 2005. A Review on Phytoremediation of Heavy Metals and Utilization of It's by Products. *As. J. Energy Env*. 6(04): 214-231.

21. Gray, C.; Dunham, S.; Dennis, P.; Zhao, F.; McGrath, S. 2006. Field evaluation of in situ remediation of a heavy metal contaminated soil using lime and red-mud. *Environmental Pollution*. 142: 530–539. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2005.10.017>.
22. Hazrat, A.; Ezzat, K.; Muhammad, A. 2013. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*. 91: 869–881. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>.
23. Hettiarachchi, G. M. y Pierzynski, G. M. 2004, Soil lead bioavailability and in situ remediation of lead-contaminated soils: A review. *Environ. Prog.* 23: 78–93. DOI: 10.1002/ep.10004.
24. Ho, W.; Ang, L.; Lee, D. 2008. Assessment of Pb uptake, translocation and immobilization in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) for phytoremediation of sand tailings. *Journal of Environmental Sciences*. 20: 1341–1347. [http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62231-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62231-7).
25. Huang, C.; Bazzaz, F.; Vanderhoef, L. 1974. The Inhibition of Soybean Metabolism by Cadmium and Lead. *Plant Physiology*. 54(1): 122–124. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.54.1.122>.
26. Iqbal, M.; He, Z.; Stoffella, P.; Yang, X. 2008. Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: Progresses and perspectives. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 9. 210–220. DOI: 0.1631/jzus.B0710633.
27. Järup, L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*. 68: 167 – 182. DOI: 10.1093/bmb/ldg032.
28. Kim, K.; Owens, G.; Naidu, R. 2010. Effect of Root-Induced Chemical Changes on Dynamics and Plant Uptake of Heavy Metals in Rhizosphere Soils. 20: 494–504. [http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160\(10\)60039-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160(10)60039-2).
29. Kim. K. y Owens. G. 2011. Potential for Enhanced Phytoremediation of Landfills Using Biosolids – A Review. *Environmental Biotechnology and Safety*. 6: 239–247. DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00373-1.
30. Koo, B.; Chen, W.; Chang, A.; Page, A.; Granato, T.; Dowdy, R. 2010. A root exudates based approach to assess the long-term phytoavailability of metals in biosolids-amended soils. *Environmental Pollution*. 158: 2582–2588. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2010.05.018>.
31. Kumar, N.; Baudhdh, K.; Kumar, S.; Dwivedi, N.; Singh, D.P.; Barman, S.C. 2013. Accumulation of metals in weed species grown on the soil contaminated

- with industrial waste and their phytoremediation potential. *Ecological Engineering*. 61: 491–495. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.10.004>.
32. Li, T.; Tao, Q.; Liang, C.; Shohag, M.J.I.; Yang, X.; Sparks, D. 2013. Complexation with dissolved organic matter and mobility control of heavy metals in the rhizosphere of hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Environmental Pollution*. 182: 248–255. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.07.025>.
 33. Lin, Q.; Chen, Y.X.; He, Y.F.; Tian, G.M. 2004. Root-induced changes of lead availability in the rhizosphere of *Oryza sativa L.* *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 104: 605–613. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2004.01.001>.
 34. Liu, J.; Ma, X.; Wang, M.; Sun, X. 2013. Genotypic differences among rice cultivars in lead accumulation and translocation and the relation with grain Pb levels. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 90:35-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.12.007>.
 35. Ma, Y.; Prasad, M.; Rajkumar, M.; Freitas, H. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances*. 29: 248–258. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.12.001.
 36. Madrid, F.; Liphadzi, M.; Kirkham, M. 2003. Heavy metal displacement in chelate-irrigated soil during phytoremediation. *Journal of Hydrology*. 272: 107–119. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1694\(02\)00258-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1694(02)00258-5).
 37. Maqueda, A. 2003. Fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados, tesis de maestría. Puebla, México. Universidad de las Américas Puebla. 130.
 38. Martin, T. y Ruby, M. 2004. Review of in situ remediation technologies for lead, zinc, and cadmium in soil. *Remediation Journal*. 14: 35-53. DOI: 10.1002/rem.20011.
 39. McConnaughay, K.; Berntson, G.; Bazzaz, F. 1993. Limitations to CO₂-induced growth enhancement in pot studies. *Oecologia*. 94: 550-557. DOI: 10.1007/BF00566971
 40. Meers, E. 2004-2005. Phytoextraction of heavy metals from contaminated dredged sediments. Ph.D. Thesis. Ghent, Bélgica. Ghent University. 345.
 41. Mench, M; Didier, V.; Löffler, M.; Gomez, A.; Masson, P. 1994. A Mimicked In-Situ Remediation Study of Metal-Contaminated Soils with Emphasis on Cadmium and Lead. *Journal of Environmental Quality*. 23:58–63. DOI: 10.2134/jeq1994.00472425002300010010x.

42. Meyer, C. y Verbruggen, N. 2012. The use of the model species *Arabidopsis halleri* towards phytoextraction of cadmium polluted soils. *New Biotechnology*. 30: 9-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2012.07.009>.
43. Miles, C.; Brandle, J.; Daniel, D.; Chu-Der, O.; Schnare, P.; Uhlik, J. 1972. Inhibition of Photosystem II in Isolated Chloroplasts by Lead. *Plant Physiology*. 49(5): 820-825. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.49.5.820>.
44. Miretzky, P. y Fernandez-Cirelli, A. 2008. Phosphates for Pb immobilization in soils: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 6: 121-133. DOI:10.1007/s10311-007-0133-y.
45. Möller, A.; Müller, H.; Abdullah, A.; Abdelagawad, G.; Utermann, J. 2005. Urban soil pollution in Damascus, Syria: concentrations and patterns of heavy metals in the soils of the Damascus Ghouta. *Geoderma*. 124: 63–71. DOI: 10.1016/j.geoderma.2004.04.003.
46. Mulligan, C.; Yong, R.; Gibbs, B. 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology*. 60: 193–207. [http://dx.doi.org/10.1016/S0013-7952\(00\)00101-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0013-7952(00)00101-0).
47. Mushak, P. 2011a. Chapter 13 – Cardiovascular Toxicity of Lead in Human Populations. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*. 10: 503:536. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-51554-4.00013-4>.
48. Mushak, P. 2011b. Chapter 17 – Carcinogenic and Genotoxic Effects of Lead in Human Populations. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*. 10: 635–670. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-51554-4.00017-1>.
49. Nehnevajova E., Herzig, R.; Federer, G.; Erismann, K.H.; Schwitzguébel, J.P. 2005. Screening Of Sunflower Cultivars For Metal Phytoextraction In A Contaminated Field Prior To Mutagenesis. *International Journal of Phytoremediation*. 7:337–349. DOI: 10.1080/16226510500327210.
50. Olajire, A. y Ayodele, E. 1997. Contamination of roadside soil and grass with heavy metals. *Environment International*. 23:91–101.
51. Ortiz, H.; Trejo, R.; Vadez, R.D.; Arreola, J.G.; Flores, A.; López, B. 2009. Fitoextracción de plomo y cadmio en los suelos contaminados usando quelite (*Amaranthus hybridus L*) y micorrizas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 15(2): 161-168.

52. Ovečka, M. y Takáč, T. 2014. Managing heavy metal toxicity stress in plants: Biological and biotechnological tools. *Biotechnology Advances*. 32: 73–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.011>.
53. Panez, M. 2013. Propuesta para la restauración de suelos contaminados por metales pesados afectados por la actividad minera mediante el uso de fitoremediación. Trabajo de Titulación. Lima. Universidad Nacional agraria la Molina. 293.
54. Pang, J.; Chang, G.S.Y; Zhang, J.; Liang, J.; Wong, M.H. 2003. Physiological aspects of vetiver grass for rehabilitation in abandoned metalliferous mine wastes. *Chemosphere*. 52: 1559-1570. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00496-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00496-X).
55. Pichtel, J. y Pichtel, T. 1997. Comparison of Solvents for Ex Situ Removal of Chromium and Lead from Contaminated Soil. *Environmental Engineering Science*. 14(2): 97-104. DOI:10.1089/ees.1997.14.97.
56. Punamiya, P.; Datta, R.; Sarkar, D.; Barber, S.; Patel, M.; Das, P. 2010. Symbiotic role of *Glomus mosseae* in phytoextraction of lead in vetiver grass [*Chrysopogon zizanioides* (L.)]. *Journal of Hazardous Materials*. 177: 465–474. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.056>.
57. Rajkumar, M.; Noriharu, A.; Freitas H. 2009. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*. 77: 153–160. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.06.047.
58. Rascio, N. y Navari-Izzo, F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*. 180: 169-181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016>.
59. Reuer, M.; Brower, N.; Koball, J.; Hinojosa, E.; De la Torre, M.; Hurtado, J.; Echevarria, S. 2012. Lead, Arsenic, and Cadmium Contamination and Its Impact on Children's Health in La Oroya, Peru. *ISRN Public Health*. 2012: 1-12. <http://dx.doi.org/10.5402/2012/231458>.
60. Rodríguez, J.; Rodríguez, H.; De Lira, G.; Martínez, J.; Lara, J. 2006. Capacidad de 6 especies vegetales para acumular plomo en suelos contaminados. *Revista fitotécnica Mexicana*. 29(23): 239-245.
61. Rodríguez, L.; Ruiz, E.; Alonso-Azcárate, J.; Rincón, J. 2009. Heavy metal distribution and chemical speciation in tailings and soils around a Pb–Zn mine in

- Spain. *Journal of Environmental Management*. 90: 1106–1116. DOI: 10.1016/j.jenvman.2008.04.007.
62. Rodríguez, N. 1984. Determinación del valor nutritivo de las principales especies de los pastizales naturales de la SAIS Pachacutec en 5 eventos fenológicos. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. Lima Peru. Universidad Nacional Agraria la Molina. 124.
 63. Rojas, C. 2010. Efecto de la interacción hongo- *Dodonaea viscosa* L. Jacq en la fitorremediación de plomo en un sistema in vitro. Tesis para optar el grado de maestro en Biotecnología. México DF, México. 101.
 64. Salas, F. 2007. Selección In Vitro De Plantas Tolerantes A Plomo Para Su Uso En Fitorremediación. Tesis de especialidad. México DF, México. Universidad Autónoma Metropolitana. 39.
 65. Salemaa, M.; Vanha-Majamaa, I.; Derome, J. 2001. Understorey vegetation along a heavy-metal pollution gradient in SW Finland. *Environmental Pollution*. 112: 339–350. DOI: 10.1016/S0269-7491(00)00150-0.
 66. Sauvé, S.; Hendershot, W.; Allen, H. 2000. Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 34(7): 1125–1131. DOI: 10.1021/es9907764.
 67. Schreck, E.; Foucault, Y.; Sarret, G.; Sobanska, S.; Cécillon, L.; Castrec-Rouelle, M.; Uzu, G.; Dumat, C. 2012. Metal and metalloid foliar uptake by various plant species exposed to atmospheric industrial fallout: Mechanisms involved for lead. *Science of the Total Environment*. 427-428: 253–262. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.051>.
 68. Schwab, A.P.; Zhu, D.S.; Banks, M.K. 2008. Influence of organic acids on the transport of heavy metals in soil. *Chemosphere*. 72: 986–994. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.047>.
 69. Shahid, M.; Pinelli, E.; Dumat, C. 2012. Review of Pb availability and toxicity to plants in relation with metal speciation; role of synthetic and natural organic ligands. *Journal of Hazardous Materials*. 219-220: 1–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.01.060>.
 70. Sharma, P. y Shanker, R. 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 17(1): 35-52. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202005000100004>.

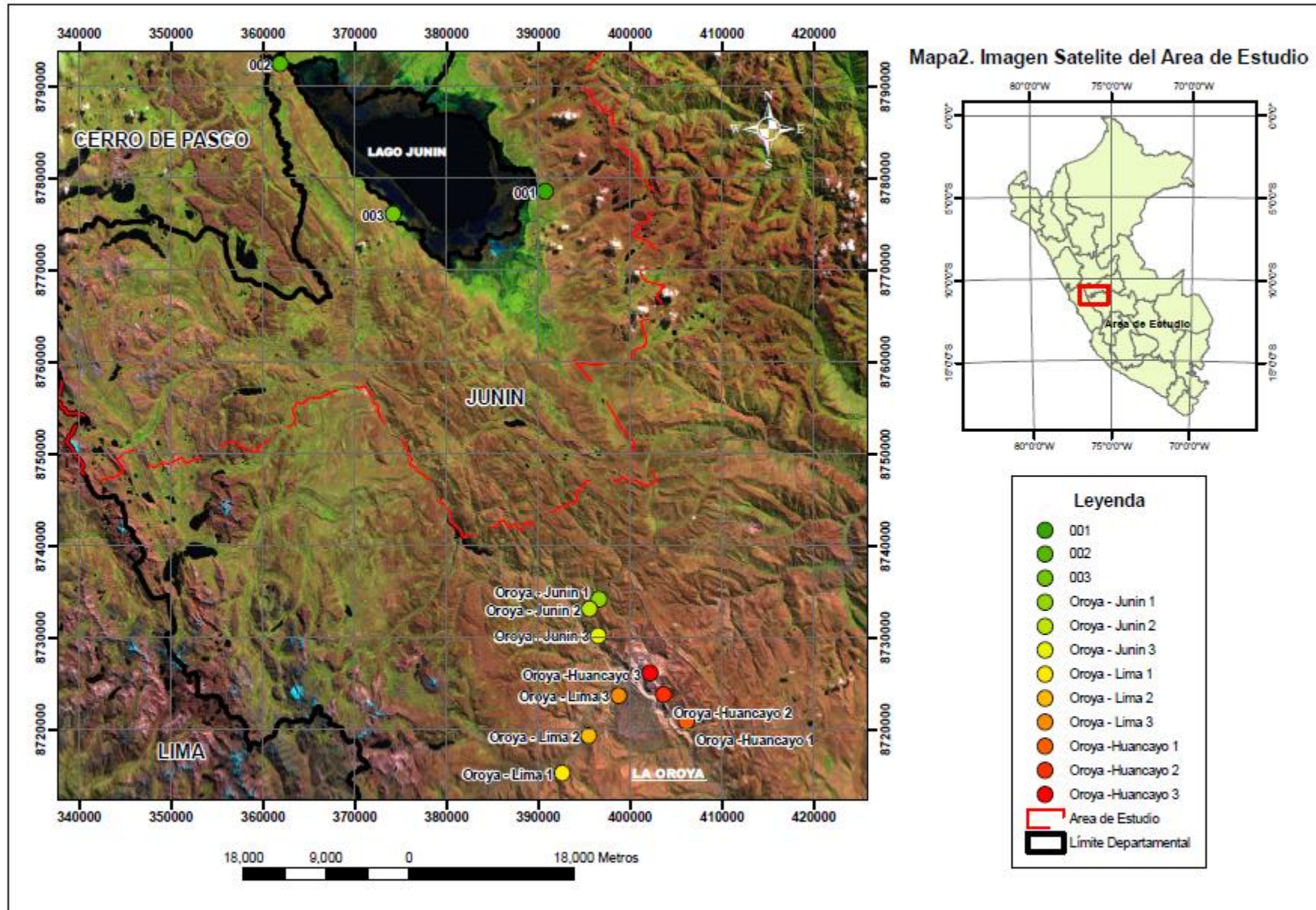
71. Sik Ok, Y.; Usman, A.; Lee, S.; Abd, S.; Choi, B.; Hashimoti, Y.; Yang, J. 2011. Effects of rapeseed residue on lead and cadmium availability and uptake by rice plants in heavy metal contaminated paddy soil. *Chemosphere*. 85: 677–682. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.073>.
72. Singh, R. y Chhibba, M. 2010. Chelate-assisted phytoextraction of cadmium and lead using mustard and fenugreek. *Communications in soil science and plant analysis*. 41:2131–2142.
73. Stebbing. A. 1982. Hormesis — The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of The Total Environment*. 22: 213–234. DOI: 10.1016/0048-9697(82)90066-3.
74. Steele, M. y Pichtel, J. 1998. Ex-Situ Remediation of a Metal-Contaminated Superfund Soil Using Selective Extractants. *J. Environ. Eng.*, 124(7): 639–645. [http://dx.doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1998\)124:7\(639\)](http://dx.doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1998)124:7(639)).
75. Steinnes, E.; Solberg, W.; Petersen, H.; Wren, C. 1989. Heavy metal pollution by long range atmospheric transport in natural soils of Southern Norway. *Water, Air, and Soil Pollution*. 45: 207-218. DOI:10.1007/BF00283452.
76. Tang, Y.; Qiu, R.L.; Zeng, X.; Ying, R.; Yu, F.; Zhou, X. 2009. Lead, zinc, cadmium hyperaccumulation and growth stimulation in *Arabis paniculata* Franch. *Environmental and Experimental Botany*. 66: 126–134. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2008.12.016.
77. Tanhan, P.; Kruatrachue, M.; Pokethitiyook, P.; Chaiyarat, R. 2007. Uptake and accumulation of cadmium, lead and zinc by Siam weed [*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson]. *Chemosphere*. 68: 323–329. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.12.064>.
78. Tiwari, K.; Singh, N.; Patel, M.; Tiwari, M.; Rai, U. 2011. Metal contamination of soil and translocation in vegetables growing under industrial wastewater irrigated agricultural field of Vadodara, Gujarat, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74: 1670–1677. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.029>.
79. Tseng, C. 2008. The Effects of Photosynthetic Bacteria and Mycorrhizae on Phytoremediation for Soils Contaminated by Heavy Metals (Cd, Cu, Pb and Zn). Ph.D. Thesis. Kaohsiung, Taiwan. National Sun Yat-sen University. 242.

80. Van der Ent, A.; Baker, A.; Reeves, R.; Pollard, J.; Schat, H. 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant and Soil*. 362: 319-334. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-012-1287-3>.
81. Vangronsveld, J.; Herzig, R.; Wevens, N.; Boulet, J.; Adriaensen, K.; Ruttens, A.; Thewvs, T.; Vassiley, A.; Meers, E.; Nehnevalova, E.; Van der Lelie, D.; Mench, M. 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research*. 16: 765-794. DOI: 10.1007/s11356-009-0213-6.
82. Verbruggen, N.; Juraniec, M.; Biliardini, C.; Meyer, C.L. 2013. Tolerance to cadmium in plants: the special case of hyperaccumulators. *BioMetals*. 26: 633-638. DOI: 10.1007/s10534-013-9659-6.
83. Verma, S. y Dubey, R. 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*. 164: 645-655. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00022-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00022-0).
84. Wang, Ch.; Tian, Y.; Wang, X.; Yu, H.; Lu, X.; Wang, C.; Wang, H. 2010. Hormesis effects and implicative application in assessment of lead-contaminated soils in roots of *Viciafaba* seedlings. *Chemosphere*. 80: 965–971. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.05.049.
85. Wang, Y.; Huang, K.; Li, C.; Mi, H.; Luo, J.; Tsai, P. 2003. Emissions of fuel metals content from a diesel vehicle engine. *Atmospheric Environment*. 37: 4637–4643. DOI: 10.1016/j.atmosenv.2003.07.007.
86. Wu, L.; Luo, Y.; Xing, X.; Christie, P. 2004. EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 102: 307–318. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.002>.
87. Wuana, R. y Okeimen, F. 2011. HeavyMetals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology*. 2011: 1-20. <http://dx.doi.org/10.5402/2011/402647>
88. Xian, X. y In Shokohifard, G. 1989. Effect of pH on chemical forms and plant availability of cadmium, zinc, and lead in polluted soils. *Water, Air, and Soil Pollution*. 45: 265-273. DOI: 10.1007/BF00283457.
89. Yang, B.; Shu, W.; Ye, Z.; Lan, C.; Wong, M. 2003. Growth and metal accumulation in vetiver and two *Sesbania* species on lead/zinc mine tailings.

- Environmental and Public Health Management. 52: 1593–1600.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00499-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00499-5).
90. Yoon, J.; Cao, X.; Zhou, Q.; Ma, L. 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of The Total Environment*. 368: 456–464. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.01.016>.
91. Zhao, Q.; Wang, Y.; Cao, Y.; Chen, A.; Ren, M.; Ge, Y.; Yu, Z.; Wan, S.; Hu, A.; Bo, Q.; Ruan, L.; Chen, H.; Qin, S.; Chen, W.; Hu, C.; Tao, F.; Xu, D.; Xu, J.; Wen, L.; Li, L. 2014. Potential health risks of heavy metals in cultivated topsoil and grain, including correlations with human primary liver, lung and gastric cancer, in Anhui province, Eastern China. 470-471: 340–347. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.086>.
92. Zhuang, P.; Zou, H.; Shu, W. 2009. Biotransfer of heavy metals along a soil-plant-insect-chicken food chain: Field study. *Journal of Environmental Sciences*. 21: 849–853. [http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62351-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62351-7).

VIII. Anexos

Anexo 1. Mapa de puntos de muestreo



Anexo 2. Caracterización de muestras de Agua

Código	001	002	003	004	005	007	008	009	010
	Cerca a Huayra	Puente Upamayo	Ondores	Oroya - Huancayo 1	Oroya - Huancayo 2	Peaje Casaracra	Casaracra UNDAC	Paccha	Oroya - Lima 1 (Curipata)
pH	6.8	8.37	6.98	7.89	7.76	8.09	8.16	7.38	6.47
CE (dS/m)	0.31	0.26	0.42	0.63	0.68	0.42	0.42	0.46	1.09
Calcio (meq/L)	3.18	1.82	3.19	5.05	5.55	3.40	3.53	3.75	9.05
Magnesio (meq/L)	0.52	0.73	1.58	1.55	1.50	1.02	1.03	1.12	2.08
Potasio (meq/L)	0.03	0.04	0.02	0.06	0.06	0.02	0.02	0.04	0.08
Sodio (meq/L)	0.1	0.3	0.07	0.43	0.37	0.10	0.16	0.35	0.28
Nitratos (meq/L)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Carbonatos (meq/L)	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Bicarbonatos (meq/L)	3.53	2.26	4.38	2.93	2.91	3.58	3.56	2.95	3.38
Sulfatos	0.02	0.03	0.02	2.88	2.79	3.58	1.2	1.36	5.63

(meq/L)									
Cloruros (meq/L)	0.30	0.50	0.40	1.10	1.70	0.10	0.10	1.00	2.30
Sodio %	3.87	10.38	1.44	6.06	4.95	3.27	3.38	6.65	2.44
RAS	0.11	0.27	0.05	0.24	0.20	0.10	0.11	0.22	0.12
Boro	0.02	0.02	0.02	0.14	0.06	0.18	0.02	0.11	0.07
Clase	C2-S1	C2-S1	C2-S1	C2-S1	C2-S1	C2-S1	C2-S1	C2-S1	C3-S1
Cobre (ppm)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
Zinc (ppm)	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00
Manganeso (ppm)	0.01	0.00	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.00	1.26
Hierro (ppm)	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02
Plomo (ppm)	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000
Cadmio (ppm)	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Cromo (ppm)	0.004	0.015	0.018	0.011	0.010	0.012	0.014	0.009	0.01

Anexo 3. Caracterización de suelo de la Agraria

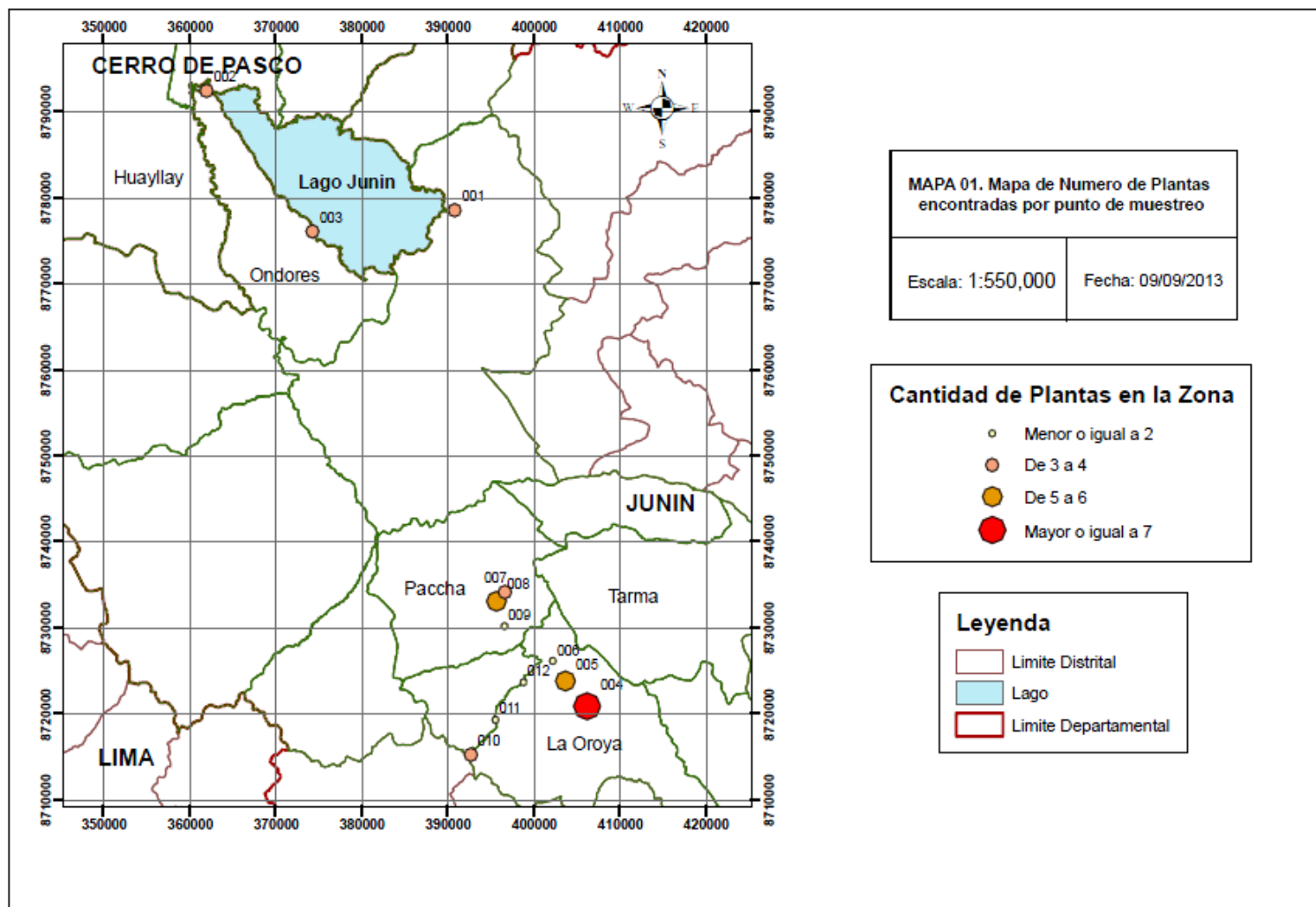
CARACTERÍSTICAS	RESULTADO
Clase Textural	Franco Arenoso
% de Materia Orgánica	1.5
% de CaCO ₃	9.00
pH	7.6
P (ppm)	10.8
K (ppm)	247
CE (dS/m)	1.05
CIC	8.00
Ca ²⁺	6.03
Mg ²⁺	1.31
K ⁺	0.51
Na ⁺	0.15
Al ³⁺ + H ⁺	0.00

Fuente: Aysanoa, E., 2010

Anexo 4. Análisis de primer corte de *Calamagrostis*

Tratamiento	Tipo	Código	Peso total (gr)	Peso muestra (gr)	Plomo (Pb)		
					Lectura (mg/l)	ppm	Extracción (mg)
T3C1	Nuevo	2	0.0914	0.0914	0.135	36.93	0.003
T3C2	Nuevo	4	0.17	0.17	0.138	20.29	0.003
T3C3	Nuevo	6	0.086	0.086	0.17	49.42	0.004
T3C4	Nuevo	8	0.0451	0.0451	0.064	35.48	0.002
T3C5	Nuevo	10	0.1021	0.1021	0.177	43.34	0.004
T2C1	Nuevo	12	0.1408	0.1408	0.047	8.35	0.001
T2C2	Nuevo	14	0.2409	0.2	0.202	25.25	0.005
T2C3	Nuevo	16	0.114	0.114	0.146	32.02	0.004
T2C4	Nuevo	18	0.0528	0.0528	0.141	66.76	0.004
T2C5	Nuevo	20	0.2285	0.2	0.119	14.88	0.003
T1C1	Nuevo	22	0.12	0.12	0.147	30.63	0.004
T1C2	Nuevo	24	0.127	0.127	0.102	20.08	0.003
T1C3	Nuevo	26	0.0522	0.0522	0.066	31.61	0.002
T1C4	Nuevo	28	0.1358	0.1358	0.102	18.78	0.003
T1C5	Nuevo	30	0.1145	0.1145	0.117	25.55	0.003

Anexo 5. Mapa de Cantidad de especies vegetales seleccionadas por punto de muestreo



Anexo 6. Base de datos de Altura de planta

BASE DE ALTURA DATOS <i>NICOTIANA</i>			
	Altura38	Altura57	Tratamiento
1	6.6	10.2	T1
2	15.6	16.2	T1
3	12.3	14.4	T1
4	18.3	22.0	T1
5	14.5	16.0	T1
6	16.5	34.4	T2
7	14.4	14.5	T2
8	15.9	19.6	T2
9	17.5	22.6	T2
10	14.4	18.0	T2
11	16.4	16.9	T3
12	18.5	19.1	T3
13	17.0	18.0	T3
14	19.6	20.0	T3
15	17.9	22.0	T3

* Valores extremos resaltados en amarillo

BASE DE DATOS DE ALTURA
VETIVER

tratamiento altura37 altura58

1	1	51.0	69.0
2	1	41.0	50.0
3	1	53.0	54.0
4	1	60.0	61.0
5	1	41.5	69.5
6	2	29.7	30.1
7	2	47.0	49.6
8	2	34.0	56.9
9	2	57.0	88.2
10	2	54.0	55.0
11	3	53.4	51.5
12	3	58.0	58.0
13	3	33.2	54.0
14	3	57.0	60.2
15	3	41.0	55.0

* Valores extremos resaltados en amarillo

BASE DE DATOS DE ALTURA DEL
CALAMAGROSTIS

	tratamiento	altura37	altura58
1	1	9.3	9.2
2	1	7.9	8.0
3	1	10.0	10.4
4	1	13.0	13.0
5	1	10.4	11.6
6	2	11.0	11.2
7	2	15.5	12.1
8	2	12.0	11.6
9	2	12.2	11.0
10	3	10.6	8.0
11	3	11.5	11.5
12	3	8.1	9.2
13	3	10.5	10.0
14	3	12.2	12.0

* Valores extremos resaltados en amarillo

Anexo 7. Datos relacionados a potencial fitorremediador: Peso de materia seca, concentración de plomo, extracción de plomo, Factor de translocación

Base de datos *Nicotiana*

Tratamiento	Peso total (gr)	Concentración de Pb (ppm)		Extracción	Factor de Translocación
		Radicular	Aérea		
T1	0.83	331.80	54.10	0.06	0.16
T1	1.03	166.53	94.46	0.12	0.57
T1	2.47	190.09	71.89	0.20	0.38
T1	3.34	264.75	59.79	0.25	0.23
T1	2.42	315.82	65.62	0.21	0.21
T2	3.08	503.94	97.71	0.36	0.19
T2	3.26	239.51	84.78	0.33	0.35
T2	2.86	290.24	74.43	0.28	0.26
T2	4.05	443.66	105.65	0.51	0.24
T2	2.91	397.19	82.65	0.31	0.21
T3	2.18	217.19	136.25	0.31	0.63
T3	2.73	249.30	161.42	0.46	0.65
T3	3.46	179.82	136.16	0.49	0.76
T3	2.68	144.22	102.20	0.28	0.71
T3	3.53	274.43	69.42	0.30	0.25

* Valores extremos resaltados en amarillo

Base de datos Vetiver

Tratamiento	Peso total (gr)	Concentración de Pb (ppm)		Extracción	Factor de Translocación
		Radicular	Aérea		
T1	13.05	78.55	10.63	0.65	0.14
T1	6.41	85.56	23.02	0.38	0.27
T1	6.03	91.06	3.49	0.30	0.04
T1	6.09	51.26	3.65	0.21	0.07
T1	2.23	81.82	17.29	0.08	0.21
T2	1.72	36.54	17.26	0.05	0.47
T2	3.57	83.58	11.73	0.18	0.14
T2	4.10	71.88	3.25	0.16	0.05
T2	7.11	72.50	14.54	0.33	0.20
T2	6.41	83.70	24.85	0.39	0.30
T3	10.18	246.06	31.74	1.50	0.13
T3	3.33	150.67	3.10	0.17	0.02
T3	3.79	70.23	32.82	0.20	0.47
T3	6.43	157.37	4.59	0.45	0.03
T3	6.64	95.52	14.18	0.40	0.15

* Valores extremos resaltados en amarillo

Base de datos *Calamagrostis*

Tratamiento	Peso total (gr)	Concentración de Pb (ppm)		Extracción	Factor de Translocación
		Radicular	Aérea		
T1	0.38	134.34	35.58	0.02	0.26
T1	0.17	92.60	18.06	0.01	0.19
T1	0.11	930.86	71.53	0.04	0.08
T1	0.36	118.09	56.82	0.03	0.48
T1	0.15	724.39	159.12	0.06	0.22
T2	0.29	197.47	70.38	0.04	0.36
T2	0.88	83.14	38.47	0.04	0.46
T2	0.34	92.78	61.92	0.02	0.67
T2	0.17	228.17	38.82	0.02	0.17
T3	0.26	265.49	69.73	0.04	0.26
T3	0.31	201.67	51.07	0.03	0.25
T3	0.18	412.05	35.94	0.03	0.09
T3	0.10	446.07	46.23	0.02	0.10
T3	0.25	209.04	56.28	0.03	0.27

* Valores extremos resaltados en amarillo

Anexo 8. Modelo Estadístico General – Diseño Factorial

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} = Altura de planta (día 37 y 58) (cm), Peso seco (gr), concentración de plomo radicular (ppm), concentración de plomo en la zona aérea (ppm), extracción (gr) y factor de translocación (ppm/ppm) observado con la i-ésima especie de planta fitorremediadora, y en el j-ésimo nivel de contaminación de plomo.

μ = Efecto de la Media general.

α_i = efecto de la i-ésima especie de planta fitorremediadora (Vetiver, *nicotiana*, *calamagrostis*).

β_j = efecto del j-ésimo nivel de contaminación de plomo (700, 1000, 1200ppm).

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción de la i-ésima especie de planta fitorremediadora, y del j-ésimo nivel de contaminación de plomo.

ε_{ijk} = Error experimental.

– VARIABLE 1a: ALTURA DE PLANTA – DÍA 37

– ANOVA:

Ho: $\alpha_i = 0, \forall i$

Ha = Al menos 1 α_i es diferente a 0, para todo $i=1(\text{vetiver}), 2(\text{nicotiana}), 3(\text{calamagrostis})$.

Ho: $\beta_j = 0, \forall j$

Ha = Al menos 1 β_j es diferente a 0, para todo $j=1(700\text{ppm}), 2(1000\text{ppm}), 3(1200\text{ppm})$.

Ho: $(\alpha\beta)_{ij} = 0, \forall i$

Ha = Al menos 1 $(\alpha\beta)_{ij}$ es diferente a 0, para todo $i, j=1, 2, 3$.

```
> MOD1<-aov(variable1a~factor1*factor2,data=altura)
```

```
> summary(MOD1)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
factor1	2	2.1694	1.0847	368.762	<2e-16 ***
factor2	2	0.0276	0.0138	4.683	0.0179
factor1:factor2	4	0.0282	0.0071	2.398	0.0749
Residuals	27	0.0794	0.0029		

Signif. codes: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

– En este caso, el P valor (0.0749) para el efecto de la interacción de los factores es mayor al

valor del nivel de significación utilizado (0.01), por lo tanto hay suficiente evidencia estadística para aceptar la hipótesis planteada, es decir, se observa que no hay interacción entre la especie de planta (factor 1) y el nivel de contaminación en el suelo (factor 2) en lo que respecta a la altura de la planta en cm, para el día 37. Así mismo se observa que hay suficiente evidencia estadística para indicar que hay diferencia entre las alturas alcanzadas por cada una de las especies estudiadas en el día 37.

– CV= 2.75%

– Prueba de comparación de medias – FACTOR 1:

Ho: $\mu_1 = \mu_2$ Ho: $\mu_2 = \mu_3$ Ho: $\mu_1 = \mu_3$

Ha: $\mu_1 \neq \mu_2$ Ha: $\mu_2 \neq \mu_3$ Ha: $\mu_1 \neq \mu_3$

```
> TukeyHSD(MOD1,conf.level=.99,which=c("factor1"))
```

Tukey multiple comparisons of means

99% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = variable1a ~ factor1 * factor2, data = altura)

\$factor1

	diff	lwr	upr	p adj
N-C	0.1722294	0.1018563	0.2426026	1e-07
V-C	0.5850433	0.5146702	0.6554165	0e+00
V-N	0.4128139	0.3424408	0.4831871	0e+00

De la prueba se puede observar que hay diferencia significativa en la concentración promedio de altura para el día 37 alcanzado por vetiver, comparado con las otras dos especies en estudio (*calamagrostis* e *nicotiana*). Por otro lado, hay diferencia significativa entre *calamagrostis* e *nicotiana* para esta variable, siendo la *nicotiana* la que alcanzó mayor altura para el día 37.

– Promedios1:

	C	N	V
11.09	15.98	48.99	

– Promedios2:

	T1	T2	T3
C	9.40	12.68	11.20
N	15.18	15.30	17.45
V	46.63	48.00	52.35

- VARIABLE 1b: ALTURA DE PLANTA – DÍA 58

- ANOVA:

Ho: $\alpha_i = 0, \forall i$

Ha = Al menos 1 α_i es diferente a 0, para todo $i=1$ (vetiver), 2(*nicotiana*), 3(*calamagrostis*).

Ho: $\beta_j = 0, \forall j$

Ha = Al menos 1 β_j es diferente a 0, para todo $j=1$ (700ppm), 2(1000ppm), 3(1200ppm).

Ho: $(\alpha\beta)_{ij} = 0, \forall i$

Ha = Al menos 1 $(\alpha\beta)_{ij}$ es diferente a 0, para todo $i, j=1, 2, 3$.

```
> MOD2<-aov(variable2a~factor1*factor2,data=altura)
```

```
> summary(MOD2)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
factor1	2	6.482	3.241	329.070	<2e-16 ***
factor2	2	0.005	0.003	0.272	0.7637
factor1:factor2	4	0.094	0.023	2.381	0.0765
Residuals	27	0.266	0.010		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

- En este caso, el P valor (0.0765) para el efecto de la interacción de los factores es mayor al valor del nivel de significación utilizado (0.01), por lo tanto hay suficiente evidencia estadística para aceptar la hipótesis planteada, es decir, se observa que no hay interacción entre la especie de planta (factor 1) y el nivel de contaminación en el suelo (factor 2) en lo que respecta a la altura de la planta en cm, para el día 58. Así mismo se observa que hay suficiente evidencia estadística para indicar que hay diferencia entre las alturas alcanzadas por cada una de las especies estudiadas en el día 58.

- CV= 4.09%

- Prueba de comparación de medias – FACTOR 1:

Ho: $\mu_1 = \mu_2$ Ho: $\mu_2 = \mu_3$ Ho: $\mu_1 = \mu_3$

Ha: $\mu_1 \neq \mu_2$ Ha: $\mu_2 \neq \mu_3$ Ha: $\mu_1 \neq \mu_3$

```
> TukeyHSD(MOD2,conf.level=.99,which=c("factor1"))
```

Tukey multiple comparisons of means

99% family-wise confidence level

```
Fit: aov(formula = variable2a ~ factor1 * factor2, data = altura)
```

```
$factor1
```

```
diff    lwr    upr p adj
```

```
N-C 0.3613932 0.2326185 0.4901679  0
```

```
V-C 1.0246978 0.8959231 1.1534725  0
```

```
V-N 0.6633046 0.5345299 0.7920793  0
```

De la prueba se puede observar que hay diferencia significativa en la concentración promedio de altura para el día 58 alcanzado por vetiver, comparado con las otras dos especies en estudio (*calamagrostis* e *nicotiana*). Por otro lado, hay diferencia significativa entre *calamagrostis* e *nicotiana* para esta variable, siendo la *nicotiana* la que alcanzó mayor altura para el día 58.

– Promedios1:

```
C    N    V
```

```
10.65 18.28 56.03
```

– Promedios2:

```
T1    T2    T3
```

```
C  9.80 11.48 10.68
```

```
N 17.15 18.68 19.00
```

```
V 63.38 47.90 56.80
```

– VARIABLE 2: PESO DE MATERIA SECA TOTAL

– ANOVA:

Ho: $\alpha_i = 0, \forall i$

Ha = Al menos 1 α_i es diferente a 0, para todo $i=1$ (vetiver), 2 (*nicotiana*), 3 (*calamagrostis*).

Ho: $\beta_j = 0, \forall j$

Ha = Al menos 1 β_j es diferente a 0, para todo $j=1$ (700ppm), 2 (1000ppm), 3 (1200ppm).

Ho: $(\alpha\beta)_{ij} = 0, \forall i$

Ha = Al menos 1 $(\alpha\beta)_{ij}$ es diferente a 0, para todo $i, j=1, 2, 3$.

```
> MOD1<-aov(variable1a~factor1*factor2,data=factorial)
```

```
> summary(MOD1)
```

```
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
```



```
factor1 2 55.76 27.878 147.029 3.05e-15 ***
```

```
factor2 2 0.91 0.453 2.387 0.111
```

```
factor1:factor2 4 0.95 0.238 1.254 0.312
```

```
Residuals 27 5.12 0.190
```

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

- En este caso, el P valor (0.312) para el efecto de la interacción de los factores es mayor al valor del nivel de significación utilizado (0.01), por lo tanto hay suficiente evidencia estadística para aceptar la hipótesis planteada, es decir, se observa que no hay interacción entre la especie de planta (factor 1) y el nivel de contaminación en el suelo (factor 2) en lo que respecta a la generación de biomasa aérea (peso seco de del material vegetal en gr.). Así mismo se observa que hay suficiente evidencia estadística para indicar que hay diferencia entre los pesos secos de cada una de las especies estudiadas.

- CV = 83.2%

- Promedios:

C	N	V
---	---	---

0.3116667	2.6050000	5.1783333
-----------	-----------	-----------

- VARIABLE 3: CONCENTRACIÓN DE PLOMO EN LA ZONA RADICULAR EN (Ppm)

- ANOVA:

Ho: $\alpha_i = 0, \forall i$

Ha = Al menos 1 α_i es diferente a 0, para todo $i=1$ (vetiver), 2(*nicotiana*), 3(*calamagrostis*).

Ho: $\beta_j = 0, \forall j$

Ha = Al menos 1 β_j es diferente a 0, para todo $j=1$ (700ppm), 2(1000ppm), 3(1200ppm).

Ho: $(\alpha\beta)_{ij} = 0, \forall i$

Ha = Al menos 1 $(\alpha\beta)_{ij}$ es diferente a 0, para todo $i, j=1, 2, 3$.

```
> MOD2<-aov(variable2a~factor1*factor2,data=factorial)
```

```
> summary(MOD2)
```

Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
----	--------	---------	---------	--------

factor1	2 0.007084	0.003542	29.154	1.8e-07 ***
---------	------------	----------	--------	-------------

factor2	2 0.000363	0.000181	1.492	0.2429
---------	------------	----------	-------	--------

factor1:factor2 4 0.001112 0.000278 2.287 0.0859

Residuals 27 0.003280 0.000121

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

- En este caso, el P valor (0.0859) para el efecto de la interacción de los factores es mayor al valor del nivel de significación utilizado (0.01), es decir, que hay suficiente evidencia estadística para aceptar la hipótesis planteada, es decir, se observa que no hay interacción entre la especie de planta (factor 1) y el nivel de contaminación en el suelo (factor 2) en lo que respecta a la concentración de plomo (ppm) encontrada en la raíz de la planta analizada. Pese a esto, se observa que hay suficiente evidencia estadística para indicar que hay diferencia en la concentración de plomo (ppm) encontrada en la raíz de la planta según la especie.
- 0.79%

- Prueba de comparación de medias – FACTOR 1:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 \quad H_0: \mu_2 = \mu_3 \quad H_0: \mu_1 = \mu_3$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \quad H_a: \mu_2 \neq \mu_3 \quad H_a: \mu_1 \neq \mu_3$$

```
> TukeyHSD(MOD2,conf.level=.99,which=c("factor1"))
```

Tukey multiple comparisons of means

99% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = variable2a ~ factor1 * factor2, data = factorial)

\$factor1

	diff	lwr	upr	p adj
--	------	-----	-----	-------

N-C	0.006595152	-0.007707325	0.02089763	0.3229047
-----	-------------	--------------	------------	-----------

V-C	-0.025907520	-0.040209997	-0.01160504	0.0000117
-----	--------------	--------------	-------------	-----------

V-N	-0.032502672	-0.046805149	-0.01820020	0.0000003
-----	--------------	--------------	-------------	-----------

De la prueba se puede observar que hay diferencia significativa en la concentración promedio de plomo radicular (ppm) encontrado en la planta de vetiver, comparado con las otras dos especies en estudio (*calamagrostis* e *nicotiana*), siendo la primera, una concentración promedio menor. Por otro lado, no hay diferencia significativa entre *calamagrostis* e *nicotiana* para esta variable.

```
> tapply(variable2,factor1,mean)

      C      N      V
299.79083 276.73583 93.53667
```

– VARIABLE 4: CONCENTRACIÓN DE PLOMO EN LA ZONA AÉREA EN (Ppm)

– ANOVA:

Ho: $\alpha_i = 0, \forall i$

Ha = Al menos 1 α_i es diferente a 0, para todo $i=1$ (vetiver), 2 (nicotiana), 3 (*calamagrostis*).

Ho: $\beta_j = 0, \forall j$

Ha = Al menos 1 β_j es diferente a 0, para todo $j=1$ (700ppm), 2 (1000ppm), 3 (1200ppm).

Ho: $(\alpha\beta)_{ij} = 0, \forall i$

Ha = Al menos 1 $(\alpha\beta)_{ij}$ es diferente a 0, para todo $i, j=1, 2, 3$.

```
> MOD3<-aov(variable3a~factor1*factor2,data=factorial)
```

```
> summary(MOD3)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
factor1	2	2619.3	1309.7	90.117	1.13e-12 ***
factor2	2	266.4	133.2	9.166	0.000916 ***
factor1:factor2	4	201.8	50.5	3.472	0.020601 *
Residuals	27	392.4	14.5		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

– En este caso, el P valor (0.020601) para el efecto de la interacción de los factores es mayor al valor de significación utilizado (0.01), por lo tanto, hay suficiente evidencia estadística para aceptar la hipótesis planeada, es decir, se observa que no hay interacción entre la especie de planta (factor 1) y el nivel de contaminación en el suelo (factor 2) en lo que respecta a la concentración de plomo (ppm) encontrada en la raíz de la planta analizada. Pese a esto, se observa que hay suficiente evidencia estadística para indicar que hay diferencia en la concentración de plomo (ppm) encontrada en la zona aérea, según la especie, y según el nivel de contaminación del suelo.

– 21.7%

– Prueba de comparación de medias – FACTOR1:

Ho: $\mu_1 = \mu_2$ Ho: $\mu_2 = \mu_3$ Ho: $\mu_1 = \mu_3$

Ha: $\mu_1 \neq \mu_2$ Ha: $\mu_2 \neq \mu_3$ Ha: $\mu_1 \neq \mu_3$

```
> TukeyHSD(MOD3,conf.level=.99,which=c("factor1"))

      Tukey multiple comparisons of means
      99% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = variable3a ~ factor1 * factor2, data = factorial)

$factor1
      diff      lwr      upr    p adj
N-C 10.70438  5.75784 15.65092 6.0e-07
V-C -10.18743 -15.13397 -5.24089 1.5e-06
V-N -20.89181 -25.83834 -15.94527 0.0e+00
```

De la prueba realizada se puede observar que hay diferencia significativa en la concentración promedio de plomo en la biomasa aérea (ppm) encontrado en la planta de vetiver, comparado con las otras dos especies en estudio (*calamagrostis* e *nicotiana*), siendo la primera, una concentración promedio menor. Así mismo, entre la *nicotiana* y el *calamagrostis*, esta primera presenta en promedio una concentración mayor de plomo en la biomasa aérea.

```
> tapply(variable3,factor1,mean)

      C          N          V
48.42500 96.51833 15.56417
```

– Prueba de comparación de medias – FACTOR2:

Ho: $\mu_1 = \mu_2$	Ho: $\mu_1 = \mu_3$
Ha: $\mu_1 \neq \mu_2$	Ha: $\mu_1 \neq \mu_2$

```
> TukeyHSD(MOD3,conf.level=.99,which=c("factor2"))

      Tukey multiple comparisons of means
      99% family-wise confidence level
```

```
Fit: aov(formula = variable3a ~ factor1 * factor2, data = factorial)
```

```
$factor2
```

```
diff lwr upr p adj
```

```
T2-T1 4.079818 -0.866720 9.026355 0.0366604
```

```
T3-T1 6.602690 1.656152 11.549228 0.0006600
```

```
T3-T2 2.522872 -2.423665 7.469410 0.2542687
```

De la prueba se puede observar que hay diferencia significativa en la concentración promedio de plomo en la biomasa aérea para el caso del tratamiento con mayor contenido de contaminante en el suelo (1200ppm), comparado con lo registrado bajo el tratamiento de menor contenido de contaminante en el suelo (700ppm).

```
> tapply(variable3,factor2,mean)
```

```
T1 T2 T3
```

```
39.03750 54.06333 67.40667
```

– VARIABLE 5: EXTRACCION DE PLOMO (mg)

– ANOVA:

Ho: $\alpha_i = 0, \forall i$

Ha = Al menos 1 α_i es diferente a 0, para todo $i=1$ (vetiver), 2(*nicotiana*), 3(*calamagrostis*).

Ho: $\beta_j = 0, \forall j$

Ha = Al menos 1 β_j es diferente a 0, para todo $j=1$ (700ppm), 2(1000ppm), 3(1200ppm).

Ho: $(\alpha\beta)_{ij} = 0, \forall i$

Ha = Al menos 1 $(\alpha\beta)_{ij}$ es diferente a 0, para todo $i, j=1, 2, 3$.

```
> MOD4<-aov(variable4a~factor1*factor2,data=factorial)
```

```
> summary(MOD4)
```

```
Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
```

```
factor1 2 27.870 13.935 113.781 7e-14 ***
```

```
factor2 2 0.742 0.371 3.030 0.065
```

```
factor1:factor2 4 0.285 0.071 0.582 0.678
```

Residuals 27 3.307 0.122

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

- En este caso, el P valor (0.678) para el efecto de la interacción de los factores es mayor al valor del nivel de significación utilizado (0.01), es decir, que hay suficiente evidencia estadística para aceptar la hipótesis planteada, es decir, se observa que no hay interacción entre la especie de planta (factor 1) y el nivel de contaminación en el suelo (factor 2) en lo que respecta a la cantidad de plomo extraída del suelo en gr. Pese a esto, se observa que hay suficiente evidencia estadística para indicar que hay diferencia en la cantidad promedio de plomo extraída por la planta según su especie.
- 18.65%

- Prueba de comparación de medias – FACTOR1:

Ho: $\mu_1 = \mu_2$	Ho: $\mu_1 = \mu_3$
Ha: $\mu_1 \neq \mu_2$	Ha: $\mu_1 \neq \mu_2$

```
> TukeyHSD(MOD4,conf.level=.99,which=c("factor1"))
```

Tukey multiple comparisons of means

99% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = variable4a ~ factor1 * factor2, data = factorial)

\$factor1

diff	lwr	upr	p adj
------	-----	-----	-------

N-C	1.9287874	1.4746931	2.3828817	0.000000
-----	-----------	-----------	-----------	----------

V-C	1.7972388	1.3431445	2.2513331	0.000000
-----	-----------	-----------	-----------	----------

V-N	-0.1315486	-0.5856429	0.3225457	0.632129
-----	------------	------------	-----------	----------

De la prueba se puede observar que hay diferencia significativa en la cantidad de plomo promedio extraída del suelo por el *vetiver* y el *calamagrostis* (*vetiver* extrae más), y la *nicotiana* y el *calamagrostis* (*nicotiana* extrae más). Por otro lado, no hay diferencia significativa entre la cantidad promedio de plomo extraída por *vetiver* y *nicotiana*.

```
> tapply(variable4,factor1,mean)
```

C	N	V
0.0275000	0.3016667	0.2708333

– VARIABLE 6: FACTOR DE TRANSLOCACIÓN

– ANOVA:

Ho: $\alpha_i = 0, \forall i$

Ha = Al menos 1 α_i es diferente a 0, para todo $i=1$ (vetiver), 2(*nicotiana*), 3(*calamagrostis*).

Ho: $\beta_j = 0, \forall j$

Ha = Al menos 1 β_j es diferente a 0, para todo $j=1$ (700ppm), 2(1000ppm), 3(1200ppm).

Ho: $(\alpha\beta)_{ij} = 0, \forall i$

Ha = Al menos 1 $(\alpha\beta)_{ij}$ es diferente a 0, para todo $i, j=1, 2, 3$.

```
> MOD5<-aov(variable5~factor1*factor2,data=factorial)
```

```
> summary(MOD5)
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
factor1	2	0.3703	0.18514	16.09	2.51e-05 ***
factor2	2	0.0552	0.02762	2.40	0.11
factor1:factor2	4	0.5916	0.14791	12.85	5.53e-06 ***
Residuals	27	0.3107	0.01151		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

- En este caso, el P valor (5.53e-06) para el efecto de la interacción de los factores es menor al valor del nivel de significación utilizado (0.01), es decir, que hay suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis planteada, es decir, se observa que hay interacción entre la especie de planta (factor 1) y el nivel de contaminación en el suelo (factor 2) en lo que respecta al factor de translocación del metal pesado. Del mismo modo, se observa que hay suficiente evidencia estadística para indicar que hay diferencia en el factor de translocación del metal pesado según la especie.

- 38.5%

– Prueba de comparación de medias – FACTOR1:

Ho: $\mu_1 = \mu_2$	Ho: $\mu_1 = \mu_3$
Ha: $\mu_1 \neq \mu_2$	Ha: $\mu_1 \neq \mu_2$

```
> TukeyHSD(MOD5,conf.level=.99,which=c("factor1"))
```

Tukey multiple comparisons of means

99% family-wise confidence level

```
Fit: aov(formula = variable5 ~ factor1 * factor2, data = factorial)
```

```
$factor1
```

```
diff lwr upr p adj
```

```
N-C 0.07833333 -0.06085252 0.21751919 0.1923711
```

```
V-C -0.16500000 -0.30418585 -0.02581415 0.0022777
```

```
V-N -0.24333333 -0.38251919 -0.10414748 0.0000200
```

De la prueba se puede observar que hay diferencia significativa en el factor de translocación en la planta de vetiver, y comparado con las otras dos especies en estudio (*calamagrostis* e *nicotiana*), siendo la primera, un factor menor. Por otro lado, no hay diferencia significativa entre *calamagrostis* e *nicotiana* para esta variable.

```
> tapply(variable5,factor1,mean)
```

```
 C N V
```

```
0.3075000 0.3858333 0.1425000
```

– Prueba de comparación de medias – INTERACCION:

Ho: $\mu_1 = \mu_2$	Ho: $\mu_1 = \mu_3$
Ha: $\mu_1 \neq \mu_2$	Ha: $\mu_1 \neq \mu_2$

```
> TukeyHSD(MOD5,conf.level=.99)#Efectos simples
```

Tukey multiple comparisons of means

99% family-wise confidence level

```
$`factor1:factor2`
```

```
diff lwr upr p adj
```

```
N:T1-C:T1 -4.250000e-02 -0.34938514 0.26438514 0.9996738
```

```
V:T1-C:T1 -1.150000e-01 -0.42188514 0.19188514 0.8383959
```

```
C:T2-C:T1 1.275000e-01 -0.17938514 0.43438514 0.7522917
```


N:T2-C:T1 -6.250000e-02 -0.36938514 0.24438514 0.9950168
 V:T2-C:T1 -1.150000e-01 -0.42188514 0.19188514 0.8383959
 C:T3-C:T1 -6.750000e-02 -0.37438514 0.23938514 0.9917161
N:T3-C:T1 4.000000e-01 0.09311486 0.70688514 0.0004329
 V:T3-C:T1 -2.050000e-01 -0.51188514 0.10188514 0.1936600
 V:T1-N:T1 -7.250000e-02 -0.37938514 0.23438514 0.9869065
 C:T2-N:T1 1.700000e-01 -0.13688514 0.47688514 0.4093691
 N:T2-N:T1 -2.000000e-02 -0.32688514 0.28688514 0.9999990
 V:T2-N:T1 -7.250000e-02 -0.37938514 0.23438514 0.9869065
 C:T3-N:T1 -2.500000e-02 -0.33188514 0.28188514 0.9999942
N:T3-N:T1 4.425000e-01 0.13561486 0.74938514 0.0001008
 V:T3-N:T1 -1.625000e-01 -0.46938514 0.14438514 0.4677663
 C:T2-V:T1 2.425000e-01 -0.06438514 0.54938514 0.0721887
 N:T2-V:T1 5.250000e-02 -0.25438514 0.35938514 0.9985000
 V:T2-V:T1 -5.551115e-17 -0.30688514 0.30688514 1.0000000
 C:T3-V:T1 4.750000e-02 -0.25938514 0.35438514 0.9992658
N:T3-V:T1 5.150000e-01 0.20811486 0.82188514 0.0000087
 V:T3-V:T1 -9.000000e-02 -0.39688514 0.21688514 0.9526421
 N:T2-C:T2 -1.900000e-01 -0.49688514 0.11688514 0.2733073
 V:T2-C:T2 -2.425000e-01 -0.54938514 0.06438514 0.0721887
 C:T3-C:T2 -1.950000e-01 -0.50188514 0.11188514 0.2445566
 N:T3-C:T2 2.725000e-01 -0.03438514 0.57938514 0.0297232
V:T3-C:T2 -3.325000e-01 -0.63938514 -0.02561486 0.0042952
 V:T2-N:T2 -5.250000e-02 -0.35938514 0.25438514 0.9985000
 C:T3-N:T2 -5.000000e-03 -0.31188514 0.30188514 1.0000000
N:T3-N:T2 4.625000e-01 0.15561486 0.76938514 0.0000510
 V:T3-N:T2 -1.425000e-01 -0.44938514 0.16438514 0.6328441
 C:T3-V:T2 4.750000e-02 -0.25938514 0.35438514 0.9992658

N:T3-V:T2 5.150000e-01 0.20811486 0.82188514 0.0000087

V:T3-V:T2 -9.000000e-02 -0.39688514 0.21688514 0.9526421

N:T3-C:T3 4.675000e-01 0.16061486 0.77438514 0.0000430

V:T3-C:T3 -1.375000e-01 -0.44438514 0.16938514 0.6738990

V:T3-N:T3 -6.050000e-01 -0.91188514 -0.29811486 0.0000005

De los resultados encontrados, se puede concluir que la combinación *nicotiana* cultivada con en un sustrato con elevado contenido de contaminante (1200ppm) presenta el mejor resultado para la variable factor de translocación, valor únicamente no diferente estadísticamente a la combinación *calamagrostis* y tratamiento intermedio de contaminante en el sustrato (1000ppm).

```
> tapply(variable5,list(factor1,factor2),mean)
```

	T1	T2	T3
--	----	----	----

C	0.2875	0.4150	0.2200
---	--------	--------	--------

N	0.2450	0.2250	0.6875
---	--------	--------	--------

V	0.1725	0.1725	0.0825
---	--------	--------	--------