



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

*Evaluación de la toxicidad y de la bioacumulación del Cu en un cultivo acumulador (*Lactuca sativa* L.) y otro no-acumulador (*Solanum lycopersicum* L.) en suelos agrícolas mediterráneos representativos, como base para la propuesta de estrategias de gestión*

Tesis Doctoral
(Doctorado en Biodiversidad)

Presentada por:
Daniel Sacristán Moraga

Dirigida por:
Luís Recatalá Boix

Valencia, 2015



Dr. Luis Recatalá Boix, Profesor Titular de Edafología del Departamento de Biología Vegetal de la Universitat de València

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada “Evaluación de la toxicidad y de la bioacumulación del Cu en un cultivo acumulador (*Lactuca sativa* L.) y otro no-acumulador (*Solanum lycopersicum* L.) en suelos agrícolas mediterráneos representativos, como base para la propuesta de estrategias de gestión”, presentada por D. Daniel Sacristán Moraga para optar al grado de Doctor por la Universitat de València en el Programa de Doctorado en Biodiversidad, ha sido realizada bajo mi dirección en el Centro de Investigaciones sobre Desertificación –CIDE (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universitat de València, Generalitat Valenciana).

Considerando su nivel científico y académico, autorizo a su presentación para optar al Grado de Doctor por la Universitat de València en el Programa de Doctorado en Biodiversidad.

Y para que conste, firmo el presente certificado en Moncada, a 24 de Abril de 2015.

Fdo. Dr. Luis Recatalá Boix.
Profesor Titular
de la Universitat de València.

La Presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la ayuda para personal investigador en formación, dentro del programa VALi+d para investigadores en formación, concedida por la Conselleria d'Educació, Cultura i Esport de la Generalitat Valenciana (ACIF/2010/041); y a una beca para estancias de becarios y contratados predoctorales en centros de investigación fuera de la Comunitat Valenciana concedida también por la Conselleria d'Educació, Cultura i Esport de la Generalitat Valenciana (BEFPI/2013/063).

La receta de pato con arroz la cuenta la población del asentamiento “Hijos de Sepé”, del Movimiento Sin Tierra, en Brasil. Y es que estas gentes desde su insumisión se sienten libres y no paran de inventar, desinventar o reinventar.

Para cultivar el arroz que les alimenta y que venden, han desechado los venenos que ofrecen los agronegocios y han recuperado una fórmula mágica. Para preparar las tierras de cultivo sueltan patos, que, en un par de meses, dejan la tierra limpia de hierbas y abonada con sus excrementos para luego sembrar el arroz.

El sistema ha llamado la atención de los técnicos del departamento de agricultura, que ha calculado que de esa sorprendente manera “se produce el doble de materia prima que en los sistemas intensivos”.

- Ni sumar saben- me dice Joao-. El doble de arroz, sí, más los patos, que también nos los comemos.

(Mucha gente pequeña, Gustavo Duch)

AGRADECIMIENTOS

Resulta complicado resumir en unos cuantos renglones el esfuerzo y empeño que mucha gente ha puesto, de manera altruista, para que este trabajo saliese adelante. Muchos son los que aquí debería citar, aunque estoy seguro de que más de uno se me olvidará.

En primer lugar, y con especial cariño, me gustaría agradecer el esfuerzo realizado por mi Director de Tesis, el Dr. Luis Recatalá Boix, por su paciencia y dedicación para que este trabajo de investigación fuese el que es. A pesar de las dificultades que se ha ido encontrando por el camino, nunca ha desistido ni ha reulado, dedicandome siempre palabras alentadoras para continuar realizando este trabajo de investigación.

Al personal del laboratorio del CIDE por su apoyo técnico y colaboración, y especialmente a Fernando Quintanilla, Lourdes Tellols, Julia Martín y Begoña Baladrón por su ayuda tanto en los aspectos técnicos del laboratorio y en las determinaciones analíticas por EAA, como en muchos otros aspectos del trabajo de investigación.

Al Dr. Juan Sánchez Díaz y la Dra. Ester Carbó, por facilitarme su ayuda y apoyo siempre que lo he necesitado, y por los consejos que han compartido conmigo.

Al Dr. Fernando Visconti por su ayuda en el entendimiento y aplicación de algunos conceptos estadísticos complicados.

A Patricia Dominguez, Julián Campos, Ana Maymo, Juan Jose Albert, Estrella Fernández y Purificación Montparler por toda la energía que me han transmitido durante todo este tiempo y por los grandes momentos que hemos pasado juntos.

Quisiera hacer extensivo el agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado y animado durante la realización de este trabajo, donde incluyo a todos los compañeros/as del CIDE; los que están desde los comienzos, los que fueron llegando a lo largo de este tiempo y los que ya no están. A todos vosotros os agradezco el interés mostrado y vuestra ayuda en las ocasiones en las que la he necesitado, cada uno aportando un granito de arena, y los momentos compartidos. En especial a Oscar, Jordi, Antonio, Cristina, Fernando, Puri, Lola, Eli, Eugenia, Vicenta, Heidi, Andrés, Javier, Carlos, Pedro, Juan Antonio, Irene, Santi, Ana, Meike, Delfina y Patricio.

También deseo expresar mi agradecimiento de una forma especial a mis amigos y amigas de toda la vida y a aquellos no de toda la vida (David, Pedro, Jorge, Jordi, Ernesto, Marta, Andrea, Mario, Juan, Javi, Mar y Miriam) por su cariño y apoyo, sobre todo cuando iba cuidar de mis “plantitas”.

Sin duda, uno de los mayores agradecimientos son para toda mi familia, sin cuyo apoyo constante hubiese sido muy difícil la finalización de esta Tesis: a Javier, Carmen y Luis.

Y por último, como no podía ser de otra manera, a Begoña, por estar ahí desde el minuto uno y animarme tanto en los malos como en los buenos momentos. Nadie mejor que ella sabe lo que elaborar esta Tesis ha significado y, en ocasiones, ha disfrutado.

A todos vosotros que habéis hecho que todo este tiempo sea uno de los más increíbles que jamás haya vivido, mil gracias.

ÍNDICE

1. RESUMEN EXPLICATIVO DE LA TESIS	1
1.1 Introducción	1
1.2 Objetivos	3
1.3 Material y Métodos	5
1.3.1 Muestreo y caracterización de los suelos	5
1.3.2 Diseño Experimental.....	6
1.3.3 Análisis de los datos de biomasa y establecimiento de las concentraciones efectivas	7
1.3.4 Determinación de los contenidos en Cu en las diferentes muestras y cálculo de los factores de concentración	8
1.3.5 Análisis estadísticos	9
1.3.6 Análisis con el P-XRF: Obtención de las curvas espectrales y tratamiento de los datos.....	9
1.4 Resultados generales y Discusión	10
1.4.1 Caracterización de los suelos	10
1.4.2 Experimento de Cu con Lechuga (acumulador) en suelos agrícolas mediterráneos españoles	11
1.4.3 Experimento de Cu con Tomate (cultivo no acumulador) en suelos agrícolas mediterráneos españoles.....	12
1.4.4 Experimento de Cu con Lechuga (acumulador) en suelos agrícolas mediterráneos Australianos	14
1.4.5 Aplicación del P-XRF para la determinación del contenido en Cu de suelos y plantas	16
1.4.6 Comparación de resultados	18
1.5 Conclusiones	21
2. INTRODUCCIÓN	27
2.1 Suelo: Evolución e importancia en el medio ambiente	27
2.2 Metales pesados y Contaminación del suelo	29
2.2.1 Origen de los metales pesados y de la contaminación de los suelos.....	31
2.2.2 Suelos agrícolas y contaminación por Cobre.....	34
2.3 Protección de los suelos agrícolas: Estándares de calidad del suelo	41
2.3.1 Necesidad de protección del suelo	41
2.3.2 Protección del suelo: Evolución y desarrollo de Estándares de Calidad del suelo	44
2.4 Técnicas para la determinación de metales pesados: Fluorescencia de rayos X (XRF)	49
2.4.1 Fluorescencia de Rayos-X: origen, evolución y fundamentos.....	51
2.4.2 Aplicación de la Fluorescencia de Rayos-X portátil (FP-XRF) a suelos y plantas	55
2.5 Estrategias de manejo de suelos contaminados	57
2.5.1 Fitorremediación de los suelos naturales y agrícolas contaminados por metales pesados	60
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	63
3.1 Justificación	63

3.2 Objetivos	66
4. MATERIAL Y MÉTODOS	69
4.1 Selección, muestreo y preparación de las muestras de suelos.....	69
4.1.1 Selección, muestreo y transporte	69
4.1.2 Preparación y conservación de las muestras del suelo.....	73
4.2 Análisis de las propiedades y características del suelo.	74
4.3 Diseño de los experimentos en condiciones controladas.....	77
4.3.1 Diseño experimental	77
4.3.2 Preparación y conservación de los cultivos.	80
4.4 Análisis de los datos de biomasa y establecimiento de los concentraciones efectivas	81
4.5 Determinación de los contenidos en Cu en las diferentes muestras y cálculo de los factores de concentración.....	82
4.5.1 Análisis del contenido total de metales pesados en suelos.	82
4.5.2 Análisis del contenido extraíble de metales pesados en suelos.....	86
4.5.3 Análisis del contenido de metales pesados en cultivos hortícolas.	90
4.6 Determinación de metales pesados por espectrofotometría de absorción atómica.....	91
4.7. Descripción de métodos estadísticos.....	93
4.7.1 Estudio de la distribución de las poblaciones.	94
4.7.2 Pruebas de significación y contraste.	94
4.7.3 Correlaciones	95
4.7.4 Regresiones simples.	96
4.7.5 Bioacumulación de Cu y Factores de Acumulación	97
4.8 Análisis con el P-XRF: Obtención de las curvas espectrales y tratamiento de los datos	97
5. RESULTS AND DISCUSSION	99
5.1 European Mediterranean agricultural soils cultivated with lettuce (<i>Lactuca sativa</i> L.)	99
5.1.1 Soil description and properties.....	99
5.1.2 Biomass production, dose–response curves and toxicity threshold values for Cu added to soils	99
5.1.3 Metal content analysis.....	104
5.2 European Mediterranean agricultural soils cultivated with tomato (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	109
5.2.1 Characteristics of soils	109
5.2.2 Biomass production data analysis and toxicity threshold values	110
5.2.3 Cu content in soils, plants and fruits and Concentration Factors	114
5.3 Further investigation in other agricultural soils of the Mediterranean Region: Australia. 119	
5.3.1 Soil characteristics	119
5.3.2 Biomass data and toxicity threshold values	119
5.3.3 Cu accumulation in plant tissues and influence of soil properties in metal transference	124
5.4 Application of P-XRF for the analysis of Cu contents in soils and plants	128
5.4.1 Soil properties	128
5.4.2 Spectra processing and analysis	128

5.5 Comparison of the results obtained for the different Mediterranean Regions and crops...	136
5.5.1 European vs Australian agricultural soils cropped with lettuce.....	136
5.5.2 Lettuce and tomato cropped in different European Mediterranean	137
6. CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES.....	139
7. REFERENCIAS BIBLIGRÁFICAS.....	143

TABLAS		Pág.
Resumen Explicativo		
<i>Tabla 1.1 Propiedades de los suelos agrícolas mediterráneos españoles.</i>		10
<i>Tabla 1.2 Propiedades de los suelos agrícolas mediterráneos australianos.</i>		11
Introducción		
<i>Tabla 2.1 Micronutrientes con función biológica y principales funciones en plantas, animales y humanos.</i>		30
<i>Tabla 2.2 Concentración de metales pesados (mg kg⁻¹) en diferentes materiales originarios de suelos.</i>		31
<i>Tabla 2.3 Contenido en metales pesados (mg/kg) en fertilizantes, lodos de depuradora, enmiendas orgánicas y cenizas.</i>		38
<i>Tabla 2.4 Estándares de calidad (mg/kg en peso seco) para Alemania, Noruega y Reino Unido.</i>		48
Material y Métodos		
<i>Tabla 4.1 Criterios de selección de las parcelas representativas de la región Mediterránea Europea.</i>		71
<i>Tabla 4.2 Criterios de selección de las parcelas representativas de la región Mediterránea Australiana.</i>		72
<i>Tabla 4.3 Parámetros instrumentales considerados para la determinación de Cu por EAA-Llama.</i>		92
<i>Tabla 4.4 Tests de contraste utilizados para la prueba ANOVA de un factor.</i>		95
Results and Discussion		
<i>Table 5.1 Selected properties of the soils used in the assays.</i>		99
<i>Table 5.2 Two-way analysis of variance (ANOVA) for soil and copper doses.</i>		101
<i>Table 5.3 One-way analysis of variance (ANOVA) for each soil.</i>		101
<i>Table 5.4 One-way analysis of variance (ANOVA) for each dose.</i>		101
<i>Table 5.5 Toxicity threshold values (EC₁₀ and EC₅₀, mg / kg) for Cu added to soil derived from the lettuce biomass tests in the three soils studied.</i>		102
<i>Table 5.6 Correlation coefficients of EC₅₀ and EC₁₀ with different relevant soil properties.</i>		103
<i>Table 5.7 Correlation coefficients between the soil properties analysed.</i>		104
<i>Table 5.8 Mean copper content in the edible parts of lettuces (mg / kg in dry weight basis), and total and extractable contents of copper in soils (mg / kg in dry weight basis).</i>		108
<i>Table 5.9 Correlation coefficients between the content of Cu in plant for each of the assayed doses and the soil properties considered.</i>		109
<i>Table 5.10 Critical limit for the soils studied.</i>		109
<i>Table 5.11 Properties of the soils assayed.</i>		110
<i>Table 5.12 Two-way analysis of variance (ANOVA) for soil and copper doses.</i>		112
<i>Table 5.13 One-way analysis of variance (ANOVA) for each soil.</i>		112
<i>Table 5.14 One-way analysis of variance (ANOVA) for each dose.</i>		112
<i>Table 5.15 Toxicity threshold values (EC₁₀ and EC₅₀, mg/kg) for Cu added to soil derived from the tomato biomass tests in the four soils assayed.</i>		113
<i>Table 5.16 Correlation coefficients between soil properties and EC₁₀ and EC₅₀.</i>		114
<i>Table 5.17 Mean copper content in soil (mg/kg in dry weight basis), in plant (mg/kg in dry weight basis), and in the edible part of tomato (ripe fruit) (mg/kg in dry weight basis).</i>		115
<i>Table 5.18 Correlation coefficients between the content of Cu in plant for each of the assayed doses and the soil properties considered.</i>		116
<i>Table 5.19 Properties of the soils assayed.</i>		119
<i>Table 5.20 Two-way analysis of variance (ANOVA) for soil and copper doses.</i>		122
<i>Table 5.21 One-way analysis of variance (ANOVA) for each soil.</i>		122
<i>Table 5.22 One-way analysis of variance (ANOVA) for each dose.</i>		122
<i>Table 5.23 Toxicity threshold values (EC₁₀ and EC₅₀, mg/kg) for Cu added to soil derived from the lettuce biomass tests in the three soils assayed.</i>		123
<i>Table 5.24 Correlation coefficients between soil properties and EC₁₀ and EC₅₀.</i>		124
<i>Table 5.25 Mean copper content in soils, roots and the edible part of lettuce (all the results are expressed in mg/kg in dry weight basis).</i>		126

TABLAS**Pág.**

Results and Discussion

<i>Table 5.26 Correlation coefficients between the content of Cu in plant for each of the assayed doses and the soil properties considered.</i>	<i>127</i>
<i>Table 5.27 Cu content (mg/kg in dry weight basis) for each of the soil samples analysed and the maximum height (H_{max}) and Full Width at Half Height (FWHH) determined after processing each spectrum.</i>	<i>130</i>
<i>Table 5.28 Cu content (mg/kg in dry weight basis) for each of the roots and stems/leaves samples analysed and the maximum height (H_{max}) and Full Width at Half Height (FWHH) determined after processing each spectrum.</i>	<i>131</i>
<i>Table 5.29 Linear regressions for Cu content and maximum height (H_{max}) for soils, roots and stems/leaves.</i>	<i>134</i>

FIGURAS		Pág.
Introducción		
<i>Figura 2.1 Funciones del suelo.</i>		27
<i>Figura 2.2 Procesos y componentes del suelo que controlan la movilidad de los metales pesados.</i>		34
<i>Figura 2.3 Esquema del ciclo biogeoquímico de los metales pesados en el sistema agrario.</i>		35
<i>Figura 2.4 Consumo de fertilizantes (nitrogenados, fosfatados y potásicos) en España durante el periodo 2000-2010.</i>		39
<i>Figura 2.5 Consumo de productos fitosanitarios en España durante el periodo 1990-2010.</i>		40
<i>Figura 2.6 Mecanismo de fluorescencia de rayos X de un átomo.</i>		52
<i>Figura 2.7 Modelo conceptual de los principales tipos de fitorremediación.</i>		60
Material y Métodos		
<i>Figura 4.1 Localización de las cuatro zonas agrícolas representativas de la región Mediterránea Valenciana.</i>		70
<i>Figura 4.2 Mapa de suelos de la estación experimental de Ginninderra y localización de los puntos de muestreo.</i>		71
<i>Figura 4.3 Esquema de la distribución de las 16 submuestras que componen la muestra compuesta.</i>		72
Results and Discussion		
<i>Figure 5.1 Mean biomass produced for each soil and dose.</i>		100
<i>Figure 5.2 Mean biomass produced for each soil and dose.</i>		111
<i>Figure 5.3 Mean biomass produced for each soil and dose.</i>		120
<i>Figure 5.4 Complete XRF spectra and 8.05 (KeV) emission line subset for (a) soils, (b) roots and (c) stems/leaves.</i>		129
<i>Figure 5.5 Linear regression analysis for (a) soils, (b) roots and (c) stems/leaves.</i>		133

Resumen Explicativo de la Tesis

1. RESUMEN EXPLICATIVO DE LA TESIS

1.1 Introducción

La contaminación de los suelos, especialmente los agrícolas, por metales pesados es un proceso de degradación muy extendido, que afecta a numerosas áreas del planeta (Holmgren et al. 1993, Wong et al. 2002, Nicholson et al. 2003, Romic & Romic 2003, Mapanda et al. 2005, Luo et al. 2009, Wei & Yang 2010). En un mundo basado en un modelo productivo de grandes extensiones, intensivo y en numerosas ocasiones destructivo, es muy probable que los procesos de contaminación directa (depósito de residuos urbanos, desechos de minería, etc.) e indirecta (prácticas agrícolas inadecuadas) de los suelos, especialmente los agrícolas, seguirán produciéndose, afectando y perjudicando a los ecosistemas en el futuro.

Por tanto, la protección del suelo y de sus funciones es un aspecto muy relevante, que presenta un especial interés. En Europa, la importancia de proteger el recurso suelo quedó recogida en la Comunicación “Hacia una Estrategia Temática para la Protección del Suelo” de 2002 de la Comisión de las Comunidades Europeas (CCE 2002). Los esfuerzos europeos para conseguir una adecuada conservación de este recurso continuaron en 2006, con la comunicación “Estrategia Temática para la Protección del Suelo” (CCE 2006), la cual derivará en la elaboración de una Directiva Europea del suelo, aunque continua discutiéndose en la actualidad. Por otro lado, en España, este interés quedó plasmado en el Plan Nacional de Suelos Contaminados, el cual se puede dividir en dos fases: una de 1995 a 2005, y otra del 2005 a 2015; en el Real Decreto 9/2005 (BOE 2005), y la ley 22/2011 de residuos y suelos contaminados (BOE 2011). Esta última fue modificada por la ley 5/2013 (BOE 2013).

A pesar de este interés por la protección y conservación del suelo, la legislación española, basada en la definición de estándares de calidad, presenta algunos inconvenientes que dificultan su aplicación en relación a la contaminación por metales pesados. El Real Decreto 9/2005 no establece estándares de calidad concretos/específicos para la identificación y caracterización de suelos contaminados por metales pesados basándose en el análisis de la dinámica de éstos en el suelo, y dicho aspecto no ha sido modificado posteriormente por las sucesivas leyes (BOE 2011, 2013). No obstante, el Real Decreto sí establece procedimientos para la derivación de dichos estándares, así como criterios para su aplicación. Así pues, dicho Real Decreto establece cómo definir los denominados Niveles Genéricos de Referencia (NGR), y también que un suelo debe considerarse como potencialmente contaminado cuando la concentración determinada para el metal se encuentra entre el NGR y cien veces ese valor, o contaminado cuando se determina en él una concentración igual o superior a cien veces el valor de referencia para este metal pesado. Los NGR en suelos

agrícolas corresponden a la concentración total del metal pesado en suelos no afectados por procesos de contaminación puntual (p. ej. industrias) pero si pueden estarlo por procesos de contaminación difusa (p. ej. deposición atmosférica y fertilización) (McLaughlin et al. 1999, Adriano 2001, Singh 2001, ISO/DIS 19258 2005). Estos niveles se refieren al límite superior del rango de concentraciones que cubren la variabilidad natural de determinados metales pesados a nivel regional. En relación con esto, Sánchez et al. (2004) y Micó et al. (2007) establecieron los niveles genéricos de referencia para una serie de metales pesados para la Comunidad Valenciana, una región representativa de Región Mediterránea Europea.

Por otro lado, teniendo en cuenta la influencia de las características de los suelos en la movilidad y disponibilidad de los metales pesados en estos (Adriano 2001, Kabata-Pendias & Pendias 2001, Rooney et al. 2006); y la influencia del tipo de planta/cultivo presente en los suelos agrícolas en relación a la toxicidad y la acumulación (Ross 1994c), resulta evidente la necesidad de tener en cuenta estos dos aspectos en la definición de estándares de calidad del suelo adecuados y en la proposición de medidas de protección, conservación y recuperación adecuadas. Sin embargo, de manera genérica, la influencia de estos dos aspectos no suele ser contemplada en ninguno de estos campos, ni a nivel estatal ni a nivel europeo, lo cual provoca que, generalmente, los niveles de concentración máxima permitida sean excesivamente permisivos, no reflejando así la complejidad de los sistemas agrarios y poniendo en riesgo la salud de los ecosistemas y la humana.

Como consecuencia, surge la necesidad de realizar estudios más detallados y adecuados, que contemplen la influencia de los diferentes factores mencionados anteriormente y que permitan establecer valores o estándares más realistas y aplicables en cada una de las zonas geográficas descritas a nivel estatal, europeo e incluso mundial.

La presente Tesis Doctoral se encuadra en este contexto, y pretende contribuir a los esfuerzos realizados hasta ahora en la protección de los suelos a través de la revisión del estándar de calidad establecido por la legislación vigente (Recatalá et al. 2010) y del análisis y estudio de la influencia de las propiedades del suelo en la dinámica del Cu en suelos agrícolas Mediterráneos (Recatalá et al. 2012). Además, la presente Tesis también analiza el comportamiento de dos de los cultivos más consumidos en el Mediterráneo y en el mundo frente a la presencia de Cu en el suelo: la lechuga (cultivo acumulador) y el tomate (cultivo no acumulador), analizando la toxicidad a nivel productivo, y la acumulación, translocación y distribución del Cu en ellos. Este último aspecto permite explorar la capacidad de fitorremediación de éstos. Para ello, los ensayos incluidos en esta Tesis pretenden analizar la idoneidad de estos cultivos y su “cercanía” a las “condiciones ideales”, es decir, aquéllas en las que los cultivos no presentan efectos tóxicos muy intensos sobre la producción y cuya acumulación se produce mayoritariamente en las partes no consumibles de éstos, generando así productos adecuados para el consumo humano al no superar el límite de calidad sanitario. Se pretenden establecer además rangos de concentración en suelo que permitan poner en valor los suelos agrícolas afectados por Cu, teniendo en cuenta que el efecto tóxico sobre la productividad sea bajo-

moderado y que, por supuesto, se cumplan los límites de calidad sanitarios para estos dos cultivos.

Es importante destacar en este sentido que muchos de los estudios realizados hasta el momento se centran en ensayos con suelos con niveles de concentración de metales pesados bajos-medios (ej. Angelova et al. 2009). Por tanto, y para poder determinar los límites de la influencia de las propiedades edáficas y de los diferentes comportamientos de las plantas frente a suelos altamente contaminados, es necesario llevar a cabo ensayos con suelos que presenten elevadas concentraciones de metales pesados, como se ha realizado en esta Tesis. Estas condiciones pueden darse en suelos agrícolas cercanos a zonas mineras e industriales (Belmonte Serrato 2010), o en suelos agrícolas donde se ha producido una intensiva y prolongada utilización de fertilizantes y productos fitosanitarios (Nicholson et al. 2003, Komárek et al. 2010).

Por último, la presente Tesis también analiza el potencial de la fluorescencia de rayos-X portátil (P-XRF o FP-XRF) en la detección y caracterización de zonas contaminadas, en relación a suelos y matrices vegetales. El estudio y perfeccionamiento de esta técnica resulta clave para el análisis y evaluación de la contaminación ambiental en el campo, ya que la determinación de la composición elemental de diferentes tipos de muestras ambientales permitirá realizar un estudio rápido e integral de las zonas declaradas como contaminadas. Esto es especialmente significativo para la evaluación de los suelos/áreas agrícolas, ya que la utilización de esta técnica permitiría realizar *in situ* un análisis completo de las áreas contaminadas, permitiendo evaluar, por un lado, el estado y la calidad de los suelos, y por otro, el cumplimiento de los límites de calidad sanitario en referencia a los cultivos presentes en las diferentes áreas.

1.2 Objetivos

Así pues, los objetivos principales de la presente Tesis son:

- A. Incrementar el conocimiento existente en relación a la declaración de suelos contaminados por Cu y su posterior manejo y recuperación, utilizando diferentes suelos agrícolas de la región Mediterránea y dos cultivos hortícolas de amplio interés y representativos de dos de los principales tipos de cultivos en cuanto a su capacidad para acumular metales pesados. Se pretende analizar la validez de la legislación actual y explorar el potencial fitorremediador de la lechuga y el tomate, realizando ensayos ecotoxicológicos donde se evalúe tanto la influencia de las propiedades edáficas en la dinámica del Cu como la influencia del tipo de cultivo en el grado e intensidad del efecto nocivo/tóxico del metal, esto último evaluado en relación a la producción de biomasa y a la acumulación del metal en los diferentes tejidos vegetales. Además, se pretenden definir valores que sirvan como base para el establecimiento de estándares de calidad del suelo adecuados y el análisis de riesgos en la región Mediterránea.

- B. Analizar el potencial de la fluorescencia de rayos-X portátil (FP-XRF) en la caracterización y evaluación integral de zonas agrícolas contaminadas con cobre, evaluando su capacidad para determinar el contenido en Cu de los diferentes compartimentos de estos ecosistemas, incluyendo tanto muestras inorgánicas (suelos) como orgánicas (muestras vegetales).

Para alcanzar dichos objetivos generales se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1) Validar, y en su caso, desarrollar el criterio establecido por el RD 9/2005 para la declaración de suelos contaminados por Cu, para suelos agrícolas Mediterráneos representativos (europeos y australianos) cultivados con un cultivo acumulador (lechuga) y otro no acumulador (tomate), a través del análisis del efecto del Cu sobre la producción de biomasa y de su acumulación en las diferentes partes de los cultivos.
- 2) Determinar los valores de toxicidad del Cu en suelos agrícolas representativos, referidos tales valores a las concentraciones efectivas que producen un 50% (EC₅₀) y un 10% (EC₁₀) de inhibición en los cultivos, como información relativa al efecto tóxico de este metal sobre la biomasa, que pueda resultar útil para el análisis de riesgos y para el establecimiento de estándares adecuados de calidad del suelo.
- 3) Determinar la concentración máxima en suelo de Cu que no supera el contenido máximo admisible en cultivos hortícolas representativos (lechugas y tomate) según lo establecido por la legislación (límite sanitario crítico), como información relativa a la bioacumulación de este metal en las diferentes partes de los cultivos, que pueda resultar útil para el análisis de riesgos y para el establecimiento de estándares de calidad del suelo adecuados.
- 4) Identificar y evaluar las características del suelo que influyen en la producción de biomasa y en la transferencia del Cu en el sistema suelo-planta, y determinar su grado de influencia.
- 5) Caracterizar la dinámica del Cu en suelos representativos de zonas agrícolas hortícolas de la Región Mediterránea Europea y Australiana.
- 6) Explorar el potencial fitorremediador de los cultivos de lechuga y tomate en diferentes suelos agrícolas, a través del análisis de bioacumulación de Cu en sus diferentes partes/tejidos y del cálculo de diferentes factores de bioacumulación y translocación.

- 7) Análisis del potencial de FP-XRF para la determinación del contenido en Cu en plantas y suelos agrícolas para la caracterización, vigilancia y seguimiento de zonas agrícolas contaminadas por Cu.

1.3 Material y Métodos

1.3.1 Muestreo y caracterización de los suelos

En concreto, un conjunto de cuatro suelos agrícolas (Rojales, Sollana, Nules y Peñíscola) de la región Mediterránea Valenciana, región representativa de la región Mediterránea Europea, y otro conjunto de tres suelos agrícolas (Soil 1, Soil 2, Soil 3) representativos de la región Mediterránea Australiana, todos ellos con diferentes propiedades edáficas, fueron seleccionados para su utilización en los diferentes ensayos ecotoxicológicos que se plantearon en la presente Tesis. Para cada una de las parcelas agrícolas seleccionadas, y con la intención de llevar a cabo un muestreo adecuado y representativo, se obtuvieron muestras compuestas de cada uno de los suelos seleccionados, recogiendo 16 submuestras en diferentes puntos regulares de cada una de las parcelas. Éstas se tomaron en los primeros 25 cm del horizonte superficial de cada suelo, ya que ésta es la profundidad más adecuada para el estudio de los metales pesados en suelos cultivados con cultivos hortícolas, puesto que los metales pesados de origen antropogénico se acumulan principalmente en el horizonte superficial y la mayoría de las raíces de las plantas se desarrollan en ese horizonte (Ross 1994b). Todas las muestras fueron secadas al aire a temperatura ambiente (20 °C), tamizadas a 2 mm y almacenadas en contenedores de polietileno hasta su utilización (< 1 semana).

Las propiedades edáficas relevantes para regular el comportamiento de los metales en el suelo (pH, contenido en materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, carbonato total y fracciones granulométricas) fueron determinadas por triplicado y siguiendo los métodos oficiales de cada uno de los países donde se situaban las parcelas. Es decir, para las muestras tomadas en territorio de la Comunidad Valenciana, las propiedades fueron determinadas siguiendo los métodos oficiales del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA 1994). De acuerdo con éstos, el pH se midió en una suspensión suelo-agua 1:2.5 y la conductividad eléctrica (EC) se determinó en el extracto de saturación. El contenido en materia orgánica (SOM) se determinó mediante el método de Walkey-Black y el carbonato total a través del calcímetro de Bernard. Las fracciones granulométricas se determinaron mediante el método de la pipeta de Robinson. La Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) se determinó por saturación con acetato sódico (pH=8.2), desplazamiento del sodio adsorbido con acetato amónico 1 M (pH=7.0) y determinación del sodio intercambiable mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica de Llama (FAAS).

Por otro lado, las características y propiedades de los suelos de la región Mediterránea Australiana fueron determinadas siguiendo los métodos oficiales de química del suelo para

Australasia (Rayment & Lyons 2010). El pH se midió en una suspensión suelo-agua 1:2.5 y la EC se determinó en el extracto de saturación. El SOM se determinó mediante un LECO CNS 2000 y las fracciones granulométricas se determinaron utilizando la base de datos espectroscópica del infrarrojo visible y cercano. La CIC se determinó por saturación con acetato sódico (pH=8.2), desplazamiento del sodio adsorbido con acetato amónico 1 M (pH=7.0) y determinación del sodio intercambiable mediante Espectrofotometría de Emisión Atómica de Plasma por Microondas (MP-AES, en inglés).

1.3.2 Diseño Experimental

Para el desarrollo de la presente Tesis se llevaron a cabo 3 conjuntos de experimentos, compuesto cada uno por dos ensayos ecotoxicológicos (se detallan posteriormente): uno con lechuga en suelos agrícolas mediterráneos españoles, otro también con lechuga en suelos agrícolas mediterráneos australianos, en el que además se investigó el potencial de la técnica P-XRF, y un último con tomate en suelos agrícolas mediterráneos españoles. En todos ellos el diseño experimental fue idéntico, y es el que se detalla a continuación.

Una vez muestreados los suelos, y para cada uno de los ensayos que se llevaron a cabo, éstos fueron contaminados con 6 dosis diferentes (el control y 5 dosis), las cuales correspondían, respectivamente, a 1 (65.9 mg_{Cu}/kg), 10 (659.0 mg_{Cu}/kg), 30 (1977.0 mg_{Cu}/kg), 50 (3295.0 mg_{Cu}/kg) y 100 (6590.0 mg_{Cu}/kg) veces el NGR (Nivel Genérico de Referencia) establecido para suelos hortícolas de la Comunidad Valenciana (65.9 mg/kg) por Sánchez et al. (2004). Estas diferentes dosis se definieron de la manera descrita con la intención de abarcar el rango de concentraciones que establecen un suelo como potencialmente contaminado (dosis 2 a 5) y contaminado (dosis 6) de acuerdo con la legislación española vigente (BOE 2005). Éstas se alcanzaron añadiendo volúmenes adecuados de dos soluciones de CuCl₂, un compuesto presente en algunos fungicidas (Rusjan 2012, NPI 2014) y que ha sido utilizado en otros experimentos de toxicidad (Di Palma et al. 2005), con unas concentraciones de 10 g_{Cu}/l y 100 g_{Cu}/l respectivamente. Los volúmenes de cada solución añadidos a los suelos para conseguir las concentraciones indicadas se realizó extendiéndolos en zigzag por toda la muestra. Esta metodología permitió una distribución homogénea de la solución de Cu en suelo a la vez que mantenía su estructura porosa. Las muestras control fueron tratadas de la misma manera pero utilizando agua destilada únicamente. Todas las muestras fueron almacenadas durante 7 días a temperatura ambiente (20 °C) en ausencia de luz para su homogeneización y equilibrado antes de ser utilizadas en los ensayos.

Para los experimentos realizados en la presente Tesis, citados anteriormente, se llevaron a cabo dos ensayos ecotoxicológicos diferentes basados en el test 208 de la OECD (OECD 2006): uno para evaluar el efecto tóxico del Cu sobre la producción de biomasa (test de biomasa) y otro para la evaluación de la absorción, transferencia y acumulación del metal en las diferentes partes del cultivo (test de acumulación). Para el test de biomasa, las muestras contaminadas de suelos se distribuyeron

en macetas de 10-15 cm de diámetro y se sembraron 10 semillas de lechuga a una profundidad de 1 cm en cada maceta. Para el test de acumulación, las muestras contaminadas de suelos también se distribuyeron en macetas, en este caso de 25 cm de diámetro, y también se sembraron 10 semillas de lechuga a una profundidad de 1 cm en cada maceta, aunque para este test sólo una de las semillas germinadas fue elegida para su desarrollo completo. Para ambos tipos de ensayo, cada tratamiento se realizó por triplicado (3 macetas para cada dosis y suelo y 3 para el control).

Todos los ensayos se llevaron a cabo en un invernadero, manteniendo las condiciones ambientales dentro de los rangos establecidos en el test 208 de la OECD (OECD 2006). La humedad del suelo se mantuvo a un 70% de su capacidad de campo a través de la adición de agua destilada. Además, se preparó una solución nutritiva en función de las necesidades específicas de cada cultivo y se añadió una vez a la semana a todas las macetas. La solución nutritiva utilizada para el cultivo de la lechuga estaba compuesta por Nitrato de calcio 4-hidrato, Sulfato de magnesio, Nitrato potásico, sulfato potásico y fosfato potásico dihidrogenado; y la utilizada para el tomate por Cloruro de calcio 4-hidrato, Sulfato de magnesio, Nitrato potásico y fosfato amónico dihidrogenado. La biomasa producida en las tres macetas del test de biomasa fue recolectada después de 28 días y secada a 65 °C hasta alcanzar un peso constante. En el caso del test de acumulación, los individuos se dejaron crecer hasta alcanzar el desarrollo maduro adecuado y posteriormente se recolectaron, separando raíces y tallos y hojas en el caso de la lechuga, y raíces, tallos y hojas, y fruto para el tomate. Todas estas partes también fueron secadas a 65 °C hasta alcanzar peso contante.

1.3.3 Análisis de los datos de biomasa y establecimiento de las concentraciones efectivas

Los pesos de la biomasa recogida para cada suelo y dosis del test de biomasa de cada uno de los ensayos llevados a cabo fueron utilizados para establecer las concentraciones efectivas EC_{50} y EC_{10} . Previo a esto y a la aplicación de estadísticos más complejos, se analizaron la normalidad de los datos de biomasa y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene, respectivamente. En aquellos casos en los que los datos de biomasa no cumplían los requisitos estadísticos para la aplicación de los posteriores análisis estadísticos necesarios, éstos fueron transformados, aplicando la función de transformación adecuada. En todos los casos, la transformación logarítmica fue suficiente para satisfacer dichos requisitos.

Los datos dosis-respuesta se ajustaron a un modelo logístico de acuerdo con la ecuación 1 (Doelman & Haanstra 1989) para cada uno de los suelos estudiados utilizando el programa TRAP versión 1.20 (Toxicity Relationship Analysis Program, United States Environmental Protection Agency), tal y como se ha aplicado en otros trabajos (p. ej. Hinojosa et al. 2008, Micó et al. 2008, Recatalá et al. 2010, Recatalá et al. 2012).

$$y = \frac{y_0}{1+e^{b(x-M)}} \quad (1)$$

donde y = biomasa producida (g)(peso del tallo de la lechuga/tomate), $x = \log_{10}$ (Cu añadido) (mg/kg), y_0 = biomasa producida sin inhibición (g), y M y b parámetros a ajustar, donde $M = \log_{10}(EC_{50})$, siendo EC_{50} la concentración efectiva de Cu que reduce la producción de biomasa en un 50%, y b la pendiente de la curva, que indica el grado de inhibición. Para poder llevar a cabo un adecuado tratamiento de los datos, la concentración de metal considerada en la dosis 1 (control) no fue de 0 sino que se le adjudicó el valor inicial de Cu de cada uno de los suelos. El nivel de adecuación y ajuste de este modelo se analizó teniendo en cuenta los valores residuales y la relación de éstos con los valores ajustados. También fueron calculados los coeficientes de regresión ajustados (R^2 adj.), los cuales representan la varianza contemplada por el modelo propuesto. La EC_{10} se calculó también de la manera descrita anteriormente.

Además, los valores de biomasa obtenidos para cada dosis y para cada suelo fueron comparados, y sus relaciones analizadas, a través de la aplicación de ANOVAs de un factor y de dos factores, y de diferentes pruebas de contraste, seleccionadas en función de las condiciones estadísticas que se produjeron. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa SPSS© versión 17.

1.3.4 Determinación de los contenidos en Cu en las diferentes muestras y cálculo de los factores de concentración

Todas las muestras, tanto inorgánicas (suelos) como orgánicas (raíces, tallos y hojas, y fruto) fueron trituradas y tamizadas a 0.5 mm para llevar a cabo el análisis del contenido en Cu. Los contenidos de Cu en planta (raíces, tallos y hojas, y fruto) se determinaron siguiendo el método USEPA 3052 para matrices orgánicas (USEPA 1996). Por otro lado, al principio de estos ensayos, el suelo sobrante en cada una de las dosis se utilizó para determinar el contenido total y extraíble de Cu para cada una de ellas. El contenido total de Cu se determinó siguiendo el método de digestión USEPA 3051A (USEPA 1998) mientras que el Cu en forma extraíble se determinó siguiendo el método de extracción con EDTA (Boluda et al. 1993). Para los suelos pertenecientes a la región mediterránea española, el Cu se determinó utilizando la espectrometría de absorción atómica, utilizando absorción atómica de llama. Los contenidos de Cu de las muestras pertenecientes a los ensayos realizados en Australia se determinaron utilizando espectrometría de emisión atómica de plasma por microondas (MP-AES, en inglés). La incertidumbre de todas las medidas analíticas se estableció mediante la utilización de diferentes materiales de referencia certificados (CRM, en inglés). Más concretamente, se utilizó el BCR 141-R (Quevauviller et al. 1996a) para establecer la incertidumbre del Cu total en suelo; el BCR 700 (Rauret et al. 2001) para establecer la incertidumbre del Cu extraíble también en suelos; BCR 679 (Herzig et al. 2001) para establecer la incertidumbre de contenido en Cu de las muestras de lechuga; y el NIST 1573^a (*tomato leaves*) para el Cu total en las

muestras de tomate. La precisión y la exactitud de las determinaciones fueron evaluadas a través del cálculo de la desviación estándar relativa de las medidas (RSD) y los porcentajes de recuperación del Cu. Las desviaciones estándar relativas estuvieron siempre por debajo del 10%, y las recuperaciones dentro del rango de porcentajes 80-120, que son valores considerados como adecuados y satisfactorios de acuerdo con diferentes autores (p. ej. Chen & Ma 1998).

Para analizar y evaluar la distribución y bioacumulación del Cu en las diferentes partes de los cultivos considerados, y establecer así su potencial fitorremediador, se calcularon diferentes factores de concentración (FC), los cuales fueron aplicados en función del tipo de cultivo y los datos disponibles: uno referido a la relación entre el contenido de Cu en suelo y el contenido en raíz; otro referido a la relación entre el contenido de Cu en suelo y el contenido en tallo; otro referido a la relación entre el contenido de Cu en raíz y el contenido en tallo y hojas; y un último referido a la relación entre el contenido de Cu en tallo y hojas y el contenido en fruto. Los factores de concentración (FC) o factores de bioacumulación (FBA) se pueden definir como “el ratio que relaciona la concentración de un contaminante en un organismo con la concentración del contaminante en el ambiente, donde el organismo puede incorporar dicho contaminante a través de la ingestión de comida contaminada o a través de contacto directo.” (USEPA 2010). Numerosos autores han utilizado este concepto para analizar la bioacumulación de numerosos contaminantes en plantas, explorar la biodisponibilidad de éstos en ciertos ambientes y determinar la capacidad fitorremediadora de las plantas ensayadas (p. ej. McKone & Maddalena 2007, Galfati et al. 2011, Rezvani & Zaefarian 2011).

1.3.5 Análisis estadísticos

Se llevaron a cabo análisis de correlación entre las concentraciones efectivas calculadas (EC_{10} y EC_{50}) y las propiedades edáficas determinadas para cada uno de los suelos ensayados; y entre los contenidos de Cu alcanzados en las diferentes dosis en los diferentes cultivos y las propiedades. Estos análisis permitieron analizar la importancia e influencia de éstas últimas sobre la producción de biomasa y la absorción de metal por parte de la planta. Todos estos análisis estadísticos también se llevaron a cabo utilizando el programa SPSS© versión 17.

1.3.6 Análisis con el P-XRF: Obtención de las curvas espectrales y tratamiento de los datos

En los ensayos llevados a cabo con los suelos agrícolas mediterráneos australianos, en los que también se evaluó la idoneidad y adecuación de la fluorescencia de rayos X para la determinación de la concentración de Cu en los diferentes tipos de muestras, se llevó a cabo el siguiente proceso, además del descrito anteriormente. Previo a la digestión ácida, y una vez habían sido pretratadas (tritadas y tamizadas), todas las muestras (suelos, raíces y tallos y hojas) fueron escaneadas con el

P-XRF. El sistema de fluorescencia de rayos X portátil utilizado consistía de dos unidades independientes: un Amptek Mini-X (fuente) y un espectrómetro Amptek X-123.

Los tiempos de medida fueron optimizados para cada uno de los tipos de matrices (inorgánicas y orgánicas). Se ensayaron tiempos de escaneo de 30 segundos, 1, 2, 4 y 6 minutos sobre los diferentes materiales de referencia, con la intención de determinar qué tiempo ofrecía la mejor calidad en términos de señal y cantidad de información. Finalmente, los tiempos seleccionados fueron de 2 minutos para las muestras de suelo y de 6 minutos para las muestras orgánicas.

Una vez obtenidas las curvas espectrales, éstas fueron procesadas y pretratadas de manera apropiada para poder llevar a cabo los análisis pertinentes. Las curvas espectrales fueron corregidas con el nivel basal y suavizadas en R, utilizando los paquetes hyperSpec y pavo. Una vez procesadas, éstas fueron analizadas considerando sólo las curvas espectrales alrededor de la línea de emisión de 8.05 keV, que es una de las líneas de emisión características del Cu y la que mayor calidad de señal ofrecía. Una vez hecho esto, se calculó la anchura total a la mitad de la altura (FWHH) y la altura máxima (H_{max}) para esta línea de emisión, y posteriormente, estos dos parámetros (comunes en el ámbito espectral, y fáciles de calcular) fueron correlacionados con los contenidos en Cu determinados para cada una de las muestras ensayadas, calculándose diferentes funciones lineales. Esto permitió evaluar la idoneidad de estos parámetros para llevar a cabo la cuantificación de este metal a través de esta técnica y analizar su independencia con respecto a los efectos químicos de matriz, uno de los mayores problemas en esta técnica. Los análisis de regresión se llevaron a cabo utilizando Microsoft Excel © 2013.

1.4 Resultados generales y Discusión

1.4.1 Caracterización de los suelos

Las propiedades de los diferentes suelos ensayados se muestran en las tablas 1.1 y 1.2.

Tabla 1.1 Propiedades de los suelos agrícolas mediterráneos españoles.

Suelo	pH	CE (dS/m)	SOM (%)	CCE (%)	CIC (cmol(+)/kg)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)
Rojales	7.66	0.90	1.6	52	14.5	28	38	33
Sollana	7.48	2.38	3.8	53	27.6	12	41	47
Nules	7.72	3.26	8.7	39	37.1	19	34	48
Peníscola	7.72	1.86	2.7	45	16.8	49	25	25

CE: conductividad eléctrica, SOM: contenido en materia orgánica, CCE: carbonato cálcico equivalente, CIC: capacidad intercambio catiónico.

Tabla 1.2 Propiedades de los suelos agrícolas mediterráneos australianos.

Suelo	pH	CE (dS/m)	SOM (%)	CIC (cmol(+)/kg)	Arcilla (%)	Limo (%)	Arena (%)
Suelo 1	5.36	1.10	3.7	4.2	9.80	10.03	80.17
Suelo 2	5.67	1.34	4.6	13.1	26.20	36.47	37.33
Suelo 3	7.41	2.05	3.5	36.5	42.40	43.40	14.20

CE: conductividad eléctrica, SOM: contenido en materia orgánica, CIC: capacidad intercambio catiónico.

El conjunto de suelos ensayados cubría una gran variedad de propiedades edáficas y rango de valores, permitiendo así observar y analizar su influencia en el comportamiento y la dinámica del metal en el suelo. De acuerdo con la “*World Reference Base for Soil Resources*” (WRB 2006) los suelos seleccionados corresponden a un Fluvisol Sálico (Rojales), dos Fluvisoles Calcáricos con diferentes propiedades (Sollana y Peníscola), un Fluvisol Gleico (Nules), un Luvisol Crómico (Suelo 1), un Planosol Éutrico (Suelo 2) y un Vertisol Pélico (Suelo 3), todos ellos representativos de los suelos Mediterráneos a nivel mundial. Además, este conjunto permitió abarcar diferentes tipos de suelos dedicados a la agricultura en las dos regiones mediterráneas consideradas (Tóth et al. 2008).

1.4.2 Experimento de Cu con Lechuga (acumulador) en suelos agrícolas mediterráneos españoles

Los resultados obtenidos mostraron que el estándar de calidad del suelo establecido en la legislación española no es válido ni desde el punto de vista de la producción de biomasa ni desde el punto de vista de la acumulación del Cu en la parte comestible de la planta. Los valores de las EC_{10} y EC_{50} variaron entre 8 y 159 mg_{Cu}/kg y entre 177 y 753 mg_{Cu}/kg , respectivamente, indicando claramente que el estándar de calidad del suelo propuesto por la legislación española (6590 mg_{Cu}/kg) no es válido desde el punto de vista de la producción de biomasa y que ésta se ve afectada por las propiedades del suelo. En general, los suelos con un mayor contenido en materia orgánica y arcilla fueron menos sensibles a la toxicidad del Cu, lo cual es adecuado y coherente teniendo en cuenta que estas dos propiedades facilitan la retención de este metal a través de reacciones de adsorción, reduciendo por tanto su movilidad y toxicidad (Mohamed et al. 2010, Soler-Rovira et al. 2010, Vega et al. 2010). Esto fue corroborado por los análisis de correlación llevados a cabo entre las concentraciones efectivas calculadas y las propiedades del suelo.

Por otro lado, como ya se ha indicado, el análisis de la transferencia y bioacumulación de Cu en lechuga también indicó que el estándar de calidad del suelo no es adecuado, pero además señaló una gran diferencia en términos de bioacumulación entre los suelos salinos y no salinos. El umbral crítico calculado para el suelo salino ensayado (1975 mg_{Cu}/kg) se situó por debajo del estándar de

calidad del suelo, mientras que éste se situó por encima de este nivel para los suelos no salinos ensayados (8697 mg_{Cu}/kg para el suelo Sollana y 30817 mg_{Cu}/kg para el suelo Nules), reflejando que la salinidad es una propiedad clave en la transferencia del Cu desde el suelo a la planta. De hecho, diversos autores han demostrado que la salinidad en el suelo puede facilitar la transferencia del Cu desde el suelo hasta la planta a través de la formación de complejos con el ión cloruro (López-Mosquera et al. 2000).

Así pues, las propiedades del suelo más relevantes en la movilidad y disponibilidad del Cu en el suelo son: el contenido en materia orgánica, el contenido en arcilla y la salinidad. Por tanto, estas propiedades deberían de considerarse tanto en la realización de análisis de riesgos como a la hora de establecer estándares de calidad del suelo adecuados para esta región.

Considerando el conjunto de los resultados obtenidos, se propusieron como estándares de calidad del suelo adecuados los establecidos por las concentraciones efectivas, debido a su carácter más restrictivo y a que ofrecen un escenario más realista en relación a los problemas de contaminación del suelo. Así pues, para los suelos ensayados, el estándar de calidad del suelo debería corresponder a un valor entre sus respectivas EC₅₀ and EC₁₀, el cual dependerá del compromiso con la producción agrícola de agricultores y políticos. Los estándares de calidad propuestos deberían ser más altos para aquellos suelos con un mayor contenido en materia orgánica y arcilla, y una baja salinidad.

Sin embargo, para poder establecer estándares de calidad más adecuados, a la vez que aumentar el conocimiento sobre la influencia de las propiedades del suelo en la dinámica del cobre en suelo y la influencia del tipo de cultivo, era importante continuar investigando en esta línea incluyendo más suelos de la región Mediterránea y otros cultivos, como por ejemplo, los no acumuladores. Diversos autores (Cintra et al. 2004, Angelova et al. 2009) han determinado que algunas especies no acumuladoras de Solanáceas acumulan Cu en raíces y tallos y hojas, pero que la transferencia a los frutos es baja cuando el nivel de contaminación en el suelo es bajo-moderado, lo cual abría una nueva vía de investigación, analizando las propiedades/posibilidades fitoremediadoras de este cultivo incluyendo niveles elevados de contaminación.

1.4.3 Experimento de Cu con Tomate (cultivo no acumulador) en suelos agrícolas mediterráneos españoles

Para el experimento realizado con tomate, los valores de toxicidad obtenidos variaron entre 32.9 y 491.4 mg/kg para la EC₁₀, y entre 500.7 y 1696.5 mg/kg para la EC₅₀, indicando, como en el caso de los ensayos con lechuga, que la toxicidad del Cu sobre la producción de biomasa cambia entre suelos, dependiendo de las propiedades edáficas de éstos. Nuevamente, aquellos suelos con un mayor contenido en materia orgánica y arcilla obtuvieron valores de toxicidad más elevados, corroborando así las conclusiones extraídas en los ensayos con lechuga sobre la influencia de estas dos propiedades sobre la dinámica del Cu en el suelo. Además, estos resultados fueron también corroborados por los

análisis de correlación llevados a cabo entre las concentraciones efectivas calculadas y las propiedades del suelo.

En cuanto a la acumulación de Cu en las diferentes partes de la planta, es importante en este caso presentar los resultados diferenciando entre tallos y hojas, y frutos. En el caso de tallos y hojas, en primer lugar, los resultados mostraron que, en general, el contenido de Cu en ellos aumentó a medida que aumentaba la concentración en el suelo, alcanzando un máximo de 1229.2 mg/kg en uno de los suelos ensayados. El análisis más detallado de los resultados mostró diferencias relevantes entre suelos en cuanto a las tasas de transferencia. Para todos los suelos, la transferencia fue baja a bajas concentraciones pero incrementó de manera brusca y considerable a altas dosis. Este significativo aumento se produjo en diferentes dosis en los diferentes suelos ensayados, indicando la influencia de las diferentes propiedades en la dinámica y disponibilidad del metal. Los dos suelos con un mayor contenido en materia orgánica y arcilla experimentaron este aumento de la concentración de Cu a partir de la 5 dosis, pero el suelo que presentaba una mayor salinidad alcanzó una concentración mayor en la última dosis, lo cual muestra, como en el caso de la lechuga, la influencia de la salinidad sobre la movilidad y disponibilidad del Cu en el suelo (López-Mosquera et al. 2000). Por otro lado, respecto a los otros dos suelos ensayados, aquél con una textura más gruesa experimentó este incremento tras la dosis 3 mientras que el otro aumentó su concentración tras la dosis 4, indicando que la textura también es una propiedad relevante.

Con respecto al contenido de Cu en fruto, es importante señalar que para todas las dosis y suelos, la concentración determinada fue constante y similar, a pesar de las diferentes propiedades de los suelos y a pesar de que, como se ha comentado antes, la concentración en planta incrementó a medida que lo hacía la del suelo. Estos resultados aumentan el conocimiento obtenido por otros autores (Cintra et al. 2004, Angelova et al. 2009), puesto que en este trabajo de Tesis las bajas tasas de transferencia planta-fruto se observaron no sólo en niveles bajos-medios de contaminación de Cu en suelo, sino también para niveles altos o muy altos (>1700 mg/kg). Por otro lado, la concentración determinada en todos los frutos y para todos los suelos y dosis fue siempre inferior al valor máximo permitido establecido en la legislación identificada (10 mg/kg en base fresca) (Codex 1998, McLaughlin et al. 2000).

Además, es importante señalar que, debido a que el contenido de Cu en fruto se mantuvo constante para todos los suelos y dosis ensayadas, el límite o umbral máximo para el tomate no fue posible calcularlo. Por este motivo, no se han podido comparar los umbrales críticos calculados para ambos cultivos.

Por otro lado, teniendo en cuenta todos los resultados, igual que en el caso de los ensayos realizados con estos suelos y lechuga, se puede concluir también que el estándar de calidad del suelo establecido en la legislación española no es válido ni desde el punto de vista de la producción de biomasa ni desde el punto de vista de la acumulación de Cu en la parte comestible del cultivo; y que además, el contenido en materia orgánica, el contenido en arcilla y la salinidad son las propiedades

del suelo que más influyen en la movilidad y disponibilidad del Cu en el suelo y, por tanto, las que deberían ser consideradas tanto en análisis de riesgos como en el establecimiento de dichos estándares de calidad del suelo. La presencia de texturas gruesas también parece ejercer una influencia determinante en la dinámica del Cu en el suelo, por lo que también debería ser considerada a la hora de establecer estándares de calidad del suelo adecuados. En relación con esto, los resultados obtenidos indicaron que sería adecuado y factible cultivar tomate en suelo cuyas concentraciones de Cu estuvieran entre sus respectivos EC_{50} y EC_{10} , ya que la producción sería adecuada tanto en términos de biomasa como de calidad del fruto, entendida esta última como la acumulación de Cu en éste por debajo del límite sanitario. Además, estos resultados también mostraron que se producirían bajas transferencias de Cu desde la planta al fruto en suelos con elevadas concentraciones de Cu (> 1700 mg/kg) pero con contenidos de materia orgánica y arcilla altos y baja salinidad.

Por tanto, los resultados de este trabajo muestran el uso potencial de este cultivo como fitorremediador, no sólo en suelos considerados como potencialmente contaminados sino también en aquellos con elevadas concentraciones de Cu. Este aspecto es muy relevante teniendo en cuenta que numerosos suelos agrícolas son abandonados debido a problemas de contaminación por metales pesados, tanto en la región Mediterránea Europea (Puga et al. 2006) como en otras partes del mundo (Wang & Björn 2014).

1.4.4 Experimento de Cu con Lechuga (acumulador) en suelos agrícolas mediterráneos Australianos

Los resultados alcanzados tras los ensayos realizados en los suelos agrícolas mediterráneos Australianos fueron ligeramente diferentes a los obtenidos en los ensayos en la Región Mediterránea Europea. Desde el punto de vista de la producción de biomasa, el Cu tuvo un efecto intenso y severo, ya que no se produjo biomasa en ninguno de los suelos ensayados después de una determinada dosis, específica para cada suelo. El hecho que la dosis después de la cual no se produjo biomasa fuese distinta para cada suelo indicó claramente la influencia de las propiedades del suelo sobre la movilidad y disponibilidad del Cu. Los suelos con un pH más bajo y un menor contenido en arcilla experimentaron este efecto en una dosis anterior que el resto. Los valores de EC_{10} variaron entre 49.0 y 443.1 mg/kg, y los de EC_{50} entre 104.0 y 728.9 mg/kg, mostrando también la influencia de las propiedades edáficas sobre la toxicidad del Cu. El suelo con un mayor valor de pH y con un mayor contenido en arcilla obtuvo valores de toxicidad más elevados que los suelos con un pH menor y un contenido en arcilla más bajo. Estos resultados son similares a los ya presentados y se consideran coherentes, ya que es ampliamente conocido el efecto de estas propiedades sobre la movilidad y disponibilidad del Cu. Varios autores (Adriano 2001, Rooney et al. 2006, Sherameti & Varma 2010) han demostrado que el pH afecta a la movilidad y disponibilidad de este metal, favoreciéndola en condiciones ácidas. Por otro lado, y como ya se ha discutido ampliamente en diversas publicaciones

(Mohamed et al. 2010, Soler-Rovira et al. 2010), la arcilla presenta una elevada afinidad por el Cu y lo retiene a través de reacciones adsorción. Además, también es muy conocido que un elevado contenido en arena aumenta la disponibilidad del metal debido a la escasa o incluso nula reactividad de los minerales que componen esta fracción granulométrica. Los resultados de los análisis de correlación entre las ECs y las propiedades edáficas apoyaron las conclusiones extraídas.

Por tanto, estos resultados contribuyen a aumentar el conocimiento sobre la toxicidad del Cu en suelos agrícolas (Rooney et al. 2006, Recatalá et al. 2012), señalando la importancia y relevancia del pH en relación a la disponibilidad del Cu y su efecto sobre la biomasa, incluso en suelos con contenidos medios de materia orgánica y arcilla.

En relación al contenido de Cu en las diferentes partes de la planta, para todas aquellas dosis en las que se recolectó algún individuo, la concentración de Cu, tanto en raíz como en tallo, aumentó a medida que también lo hacía en el suelo. En relación a la concentración de metal en raíz, esta fue, para todos los suelos, más alta que la determinada en la parte comestible de la planta, lo cual es adecuado considerando que las raíces están en contacto directo con el suelo y su solución, y que son el primer tejido donde entra el Cu (Sheramet & Varma 2010). Por otro lado, la concentración de Cu en raíz varió entre suelos, siendo menor en el suelo con el pH más elevado y el mayor contenido en arcilla, indicando así la influencia de estas propiedades en la transferencia del Cu desde el suelo a las raíces. En relación al contenido de Cu en tallos y hojas, es importante señalar que, a pesar de que la concentración en tallo y hojas aumentó a medida que también lo hacía en suelo y raíces, la concentración de Cu nunca superó el máximo permitido en productos alimenticios, específicamente frutas y verduras (10 mg/kg en base fresca) establecido por la legislación Australiana (ANZFA 1997) en ninguno de los individuos recolectados para todas aquellas dosis y suelo donde se produjo biomasa.

Así pues, este estudio mostró que concentraciones medias-altas de Cu (> 659 mg/kg) en los suelos agrícolas ensayados afectan de manera relevante la producción de biomasa y su bioacumulación en un cultivo acumulador como la lechuga (*Lactuca sativa* L.). El grado de toxicidad y bioacumulación está influenciado por las propiedades del suelo, especialmente por el pH y la textura. Suelos neutro-básicos con elevados contenidos en arcilla reducen la toxicidad de este metal y su acumulación en las diferentes partes de la planta. Además, la concentración de Cu alcanzada en la parte comestible de la planta nunca excedió la concentración máxima establecida por la legislación Australiana (ANZFA 1997). Por tanto, se considera que se podrían obtener cosechas adecuadas en los suelos ensayados cuando la concentración de Cu en éstos se encontrase entre sus respectivos EC_{10} y EC_{50} , los cuales varían entre 49.0 y 728.9 mg/kg. Con estas concentraciones, la producción de biomasa sería considerada aceptable y la concentración de Cu en parte comestible cumpliría con los estándares de calidad sanitarios australianos.

1.4.5 Aplicación del P-XRF para la determinación del contenido en Cu de suelos y plantas

La evaluación del potencial del P-XRF en la determinación de Cu en suelos y plantas se realizó comparando los contenidos en Cu determinados a través del método convencional y los obtenidos a través del análisis y procesados de los datos espectrales del P-XRF.

Los contenidos de Cu determinados a través del MP-AES mostraron que, en primer lugar, en las muestras de suelo, éstos fueron acordes a las cantidades añadidas para alcanzar las dosis deseada en cada una de ellas, cubriéndose un rango desde 7.6 ± 4.5 a 7227.8 ± 995.2 mg_{Cu}/kg. Por otro lado, el contenido de Cu tanto en raíces como en tallos y hojas aumentó a medida que éste aumentaba en suelo, hasta alcanzar el punto de máxima toxicidad en cada suelo, el cual provocó la mortalidad de las plantas o la no germinación de las semillas, como se ha indicado en el apartado anterior. El rango de concentraciones de Cu cubierto por la matriz raíces abarcó desde 7.9 ± 6.5 hasta 199.9 ± 21.3 mg_{Cu}/kg, y el cubierto por la matriz tallo y hojas fue desde 1.4 ± 0.9 hasta 35.5 ± 5.5 mg_{Cu}/kg.

A nivel espectral, los datos obtenidos para la matriz suelo ofrecían una mayor y mejor calidad, ya que las curvas espectrales de cada una de las muestras escaneas, una vez tratadas y subagrupadas en torno a la línea de emisión 8.05 keV, se pudieron diferenciar claramente. Éstas, las cuales mostraban el contenido en Cu para cada una de las muestras analizadas, se encontraban más separadas entre sí, reflejando de manera clara los diferentes contenidos de Cu. Esto parece lógico teniendo en cuenta el rango de concentraciones cubierto por las muestras de suelo. El contenido en Cu en las muestras de raíz y tallo y hojas era más similar entre sí, por lo que las curvas espectrales se encontraban más juntas y, por tanto, fueron más difíciles de interpretar.

Posteriormente, como se ha explicado en la sección anterior, se calcularon la altura máxima (H_{\max}) y la anchura máxima a mitad de la altura (Full Width at Half Height-FWHH) para cada una de ellas. Los patrones observados para cada uno de los diferentes tipos de matrices analizadas fueron similares al del análisis individual de las curvas espectrales. Para suelos, el rango de valores calculado fue, tanto para altura máxima como para FWHH, mayor que para raíces y que tallo y hojas.

Una vez calculados, estos parámetros fueron correlacionados con los contenidos en Cu de cada una de las matrices diferenciadas. Se calcularon diferentes funciones de regresión, siendo la lineal con la que mejor ajuste se obtuvo. El parámetro que mejor se correlacionó con los diferentes contenidos fue la altura máxima y los mejores resultados se obtuvieron para suelo ($R^2=95\%$) seguido de raíces ($R^2=58\%$) y finalmente tallos y hojas ($R^2=43\%$). Los resultados obtenidos para suelo muestran la idoneidad de la utilización de este parámetro y de la función lineal para la determinación del contenido de Cu en este tipo de muestras, ofreciendo una opción más simple y rápida que las existentes hasta ahora. Estos resultados aumentan el conocimiento sobre la utilización de esta técnica para la determinación del contenido de Cu en suelos agrícolas, ya que otros autores (Radu & Diamond 2009, Weindorf et al. 2012) también obtuvieron resultados satisfactorios en relación a la utilización de esta técnica para el análisis del contenido en metales pesados de diferentes suelos; sin embargo, en

estos experimentos, la cuantificación se realizó a través de métodos tradicionales, que suelen ser complicados y costosos. Por tanto, estos resultados sirven para demostrar que la P-XRF puede ser una técnica alternativa adecuada para el análisis de suelos contaminados.

Los resultados obtenidos para raíces y tallo y hojas no fueron tan relevantes como en el caso de los suelos, siendo los valores de ajuste bajos. Sin embargo, el análisis de estos datos debe hacerse con cautela y teniendo en cuenta diversos aspectos. En primer lugar, es importante señalar que las muestras analizadas presentaban contenidos en Cu parecidos entre sí, lo que limitó el ajuste a un rango de valores muy pequeño. Y en segundo lugar, es importante señalar que los contenidos de Cu determinados para algunas muestras de raíz y para la mayoría de las muestras de tallos y hojas se encontraban muy cerca del límite de detección ($\cong 3 \text{ mgCu/kg}$) del instrumento de medida, lo cual puede incrementar el error estándar de las medidas. Estos dos aspectos pudieron haber limitado significativamente el ajuste de los datos y es necesario tenerlos en cuenta a la hora de interpretar los datos.

Por eso, a pesar del bajo ajuste, los resultados obtenidos para muestras orgánicas muestran el potencial de este método y técnica para llevar a cabo la detección y el *screening* del Cu en muestras vegetales. Para raíces, donde la concentración de Cu varió de manera significativa y permitió al P-XRF diferenciar los diferentes niveles de Cu presentes en estas muestras, los resultados de correlación con el parámetro calculado (58%) muestra la potencialidad de esta técnica para llevar a cabo análisis semi-cuantitativos/orientativos de este tipo de muestras. Por otro lado, los resultados de ajuste obtenidos para tallos y hojas (43%) muestra que, a pesar de no tener un rango de concentraciones tan amplio como en el caso de raíces, se pudo establecer una correlación entre las concentraciones y el parámetro calculado, indicando que esta técnica puede ser potencialmente adecuada para el *screening* de este tipo de muestras también. Por todo ello, esta técnica y el método de cuantificación podrían ser potencialmente adecuados para detectar y llevar a cabo una evaluación primaria de la absorción y transferencia del Cu y otros metales, a la hora de llevar a cabo una rápida evaluación de la posible toxicidad del metal y determinar si el cultivo destinado a alimentación cumple con los estándares sanitarios correspondientes.

Así pues, en conclusión se puede decir que los resultados obtenidos en este trabajo muestran el potencial del P-XRF y el método de cuantificación propuesto para llevar a cabo la detección y el *screening* del Cu en un estudio integral de zonas contaminadas por este metal. Estos resultados deberían ser corroborados a través de la realización de experimentos en campo y la determinación *in situ* de los contenidos en Cu de las diferentes matrices. También es importante señalar que los resultados obtenidos en este experimento podrían ser ampliados llevando a cabo nuevos experimentos, donde las dosis ensayadas se repartiesen de manera más acorde con la respuesta tóxica de este metal en lechuga para los suelos ensayados. Esto permitiría corroborar tanto la adecuación de esta técnica para llevar a cabo el análisis integral de las zonas contaminadas como la independencia del método de cuantificación seleccionado en relación a los efectos de matriz.

1.4.6 Comparación de resultados

1.4.6.1 Suelos agrícolas mediterráneos Europeos vs suelos agrícolas mediterráneos Australianos cultivados con Lechuga

Los valores de toxicidad calculados para la producción de biomasa de lechuga, tanto en suelos agrícolas españoles como australianos, muestran que la producción de biomasa está fuertemente influenciada por la presencia de Cu en el suelo. Los rangos de valores obtenidos para los diferentes valores de toxicidad fueron similares entre las áreas, variando de 8 a 753 $\text{mg}_{\text{Cu}}/\text{kg}$ en la región española, y entre 49 y 728 $\text{mg}_{\text{Cu}}/\text{kg}$ en la región australiana. En ambas, el valor de toxicidad más elevado se obtuvo para el suelo con mayor pH y contenido en arcilla, independientemente del tipo de suelo. Así pues, estas dos propiedades son relevantes a la hora de analizar la movilidad y biodisponibilidad de Cu en suelo. La ligera diferencia entre ambas áreas en cuanto al valor máximo obtenido se puede deber a que el suelo de la región Mediterránea española contenía una mayor cantidad de materia orgánica, aumentando así la capacidad de retención.

Los resultados obtenidos para ambas áreas muestran que el efecto del pH en la movilidad y biodisponibilidad de Cu en el suelo es especialmente significativo y que es necesario analizar la influencia de las propiedades edáficas desde dos puntos de vista diferentes. En suelos agrícolas ácidos ($\text{pH} < 7$), el pH parece ser la propiedad edáfica más relevante, influyendo de manera determinante en la biodisponibilidad del metal y su efecto tóxico. Éste aumenta a medida que el pH decrece, y otras propiedades edáficas que muestran capacidad de retención parecen inefectivas o tener muy poco efecto. Sin embargo, en suelos básicos ($\text{pH} > 7$), el pH no es tan determinante de forma directa, pero sí indirectamente, ya que otras propiedades con mayor reactividad a pH básicos como el contenido en arcilla y la materia orgánica ejercen más adecuadamente su capacidad de retención del metal. Además, otras propiedades como el contenido en arena o la salinidad también parecen ejercer un efecto más significativo facilitando la transferencia del metal desde el suelo a la planta, aumentando así su toxicidad.

Por otro lado, el análisis de la transferencia de Cu del suelo a la planta indicó que esta variaba entre estas dos zonas. Sin embargo, su comparación detallada resultó difícil debido al efecto tóxico tan intenso observado en los suelos agrícolas australianos. No hubo producción de biomasa a partir de dosis de Cu bajas, lo que complicó la comparación de los valores de Cu determinados y sus tasas. En ambas áreas, el contenido en Cu de la parte comestible de los cultivos aumentó a medida que lo hacía en suelo pero no se pudo apreciar ningún patrón en particular debido a la escasez de datos en los ensayos en suelos agrícolas australianos. Sin embargo, los análisis de correlación llevados a cabo mostraron similitudes en relación a las propiedades del suelo que influyen en la absorción y con aquellas que influyen en la producción de biomasa. En este caso, pH, salinidad y una textura gruesa

favorecen la absorción de Cu por parte de la planta, mientras que el contenido en arcilla y materia orgánica la reducen.

1.4.6.2 Lechuga vs Tomate cultivados en suelos agrícolas mediterráneos Europeos

Los valores de toxicidad obtenidos en los suelos ensayados variaron significativamente entre cultivos. Las concentraciones efectivas calculadas para lechuga variaron entre 8 y 753 mg_{Cu}/kg mientras que para el tomate estas variaron entre 33 y 1697 mg_{Cu}/kg. Un análisis más detallado de estos resultados muestra que los valores de EC₁₀ obtenidos para tomate son casi el doble del máximo obtenido para este valor en el caso de la lechuga, y para la EC₅₀, el valor más bajo obtenido para tomate es muy similar al máximo obtenido para lechuga. Por tanto, esto muestra claramente un comportamiento diferencial entre cultivos, señalando que el tomate es más tolerante a los suelos contaminados por Cu. De hecho, de acuerdo con Ross (1994c), el tomate puede considerarse como un cultivo no-acumulador de metales mientras que la lechuga puede clasificarse como acumuladora. El análisis de la influencia de las propiedades del suelo sobre la producción de biomasa de ambos cultivos generó resultados/conclusiones similares, señalando el contenido en materia orgánica, el contenido en arcilla y la CIC como las propiedades más relevantes.

En relación a la acumulación de Cu en planta, la concentración de Cu determinada en los tallos y hojas de ambos cultivos fue similar o del mismo orden, aunque aquella determinada en lechuga estuvo siempre por encima. La conclusión más relevante extraída del análisis de este aspecto fue que en el caso del tomate, la transferencia de Cu desde la planta a los frutos fue baja para todos suelos, incluyendo aquéllos con elevadas concentraciones de Cu; mientras que para la lechuga, la transferencia y acumulación de Cu en la parte comestible aumentó a medida que también lo hacía la concentración en suelo. Los resultados del tomate fueron especialmente interesantes y relevantes, ya que el contenido de Cu en fruto se mantuvo constante en todas las dosis, independientemente del contenido en Cu de suelos y tallos y hojas, y siempre por debajo del valor máximo permitido establecido en la legislación identificada (10 mg/kg en base fresca) (Codex 1998, McLaughlin et al. 2000), lo que provocó que no se pudiese calcular el límite crítico para este cultivo y estos suelos. Por tanto, esta baja transferencia de Cu al fruto nos indica el potencial de esta planta como fitorremediadora, ya que ésta podría ser cultivada en zonas agrícolas contaminadas por Cu y producir frutos aptos para el consumo humano, a la vez que extrae el metal del suelo y lo acumula en sus partes no comestibles.

El análisis de la influencia de las propiedades edáficas, tanto en la transferencia como en la acumulación de Cu en ambos cultivos, indicó que para ambos las propiedades relevantes eran las mismas. La salinidad y un elevado contenido en arena favorecen la transferencia y acumulación, mientras que un elevado contenido en materia orgánica y arcilla tiene el efecto contrario.

Por otro lado, es importante señalar que la concentración máxima de Cu permitida en la parte comestible de vegetales establecida en las legislaciones identificadas (Codex 1998, McLaughlin et al. 2000) no fue superada en ningún caso para el tomate y sólo para el suelo salino en el caso de la lechuga, marcando este tipo de suelo como especialmente significativo cuando se cultiva lechuga y existen problemas de contaminación por Cu.

También es importante destacar que, teniendo en cuenta el conjunto total de los resultados obtenidos, el estándar de calidad del suelo establecido en la legislación española no es válido para ninguno de los cultivos y suelos considerados, ni desde el punto de vista de la producción de biomasa ni desde el punto de vista de la bioacumulación de Cu. Desde el punto de vista de la producción de biomasa, los valores de toxicidad calculados para ambos cultivos muestran que el estándar de calidad del suelo es demasiado permisivo, señalando esta perspectiva como la más restrictiva de las elegidas. Por el contrario, los límites críticos establecidos y los resultados de acumulación de Cu para la lechuga y para los suelos ensayados indican que el estándar de calidad de suelo español es demasiado restrictivo, puesto que el contenido máximo permitido en la parte comestible nunca sería sobrepasado con esas concentraciones en suelo. Sólo el límite crítico calculado para el suelo salino mostró que este estándar es demasiado permisivo. Por tanto, estos resultados muestran que el estándar de calidad propuesto no es adecuado, y que debería definirse teniendo en consideración la influencia de las diferentes propiedades del suelo y respondiendo a las condiciones particulares de cada caso.

Teniendo en cuenta los resultados y valores obtenidos en los experimentos, los estándares de calidad del suelo se podrían definir de la siguiente forma: por un lado, para los suelos salinos cultivados con cultivos de hoja, el límite o umbral crítico sanitario podría establecerse como un posible estándar de calidad del suelo. Este umbral crítico se definiría para cada uno de los diferentes cultivos de hoja, que son los que parecen acumular Cu en sus partes comestibles. Por otro lado, para los suelos no salinos cultivados con cultivos de hoja y para todos los suelos (salinos y no salinos) cultivados con un cultivo no-acumulador, los estándares de calidad del suelo podrían establecerse a través de un rango de concentraciones, definido por los valores de EC_{10} y EC_{50} . Estos valores serían propuestos en función del tipo de cultivo debido a su comportamiento diferencial. Es importante señalar que el hecho de que los estándares de calidad se definan como un rango de concentraciones significa que éstos tienen en cuenta la influencia de las propiedades del suelo en la movilidad y disponibilidad del metal, y que recogen la variabilidad que se puede producir en los suelos agrícolas de la región Mediterránea.

Por último, es muy importante destacar que el valor de referencia del Cu utilizado en este trabajo es similar al establecido en otras regiones Mediterráneas, tanto españolas (Pérez et al. 2000, 2002) como europeas (Facchinelli et al. 2001, Mitsios & Golia 2005), y que por tanto, los resultados obtenidos en este trabajo podrían ser utilizados como guía/referencia para el establecimiento de estándares de calidad del suelo adecuados en toda la región Mediterránea Europea; así como para

adoptar estrategias de fitorremediación adecuadas y exitosas en los suelos contaminados por Cu de la región.

1.5 Conclusiones

Las **principales conclusiones** de la presente Tesis son:

1. Los valores de toxicidad establecidos para los diferentes suelos cultivados con lechuga de las diferentes regiones agrícolas mediterráneas consideradas abarcaron rangos similares, siendo de 8 a 752 mg_{Cu}/kg en la región española y de 49 a 728 mg_{Cu}/kg en la australiana. En ambos casos, el valor máximo se obtuvo para el suelo con el mayor pH y el mayor contenido en arcilla, independientemente del tipo de suelo. Por tanto, estas dos propiedades edáficas son muy relevantes a la hora de analizar y evaluar la movilidad y la disponibilidad del Cu en el suelo. La diferencia entre los valores máximos obtenidos para cada área se puede deber al mayor contenido en materia orgánica que presenta el suelo de la región española, lo que aumenta ligeramente su capacidad de retención
2. Los valores de toxicidad establecidos para los suelos de la región mediterránea española con los cultivos considerados en esta Tesis mostraron una diferencia significativa entre cultivos en términos de tolerancia y respuesta tóxica. Según se ha comentado en el punto anterior, para la lechuga, los valores variaron entre 8 y 752 mg_{Cu}/kg, mientras que para el tomate entre 33 y 1697 mg_{Cu}/kg. Un análisis más en profundidad de estos resultados nos indica que, para la EC₁₀, los valores obtenidos para tomate son casi el doble de los obtenidos para lechuga en todos los suelos; y que para la EC₅₀, el valor mínimo obtenido es muy parecido al máximo obtenido para lechuga. Estos valores muestran claramente un comportamiento diferencial entre cultivos, mostrando al tomate como un cultivo más tolerante que la lechuga a los suelos contaminados por Cu. Por otro lado, el análisis de la influencia de las diferencias propiedades edáficas sobre la producción de biomasa de ambos cultivos mostró similitudes en cuanto a las propiedades más relevantes. En ambos casos, el contenido en materia orgánica, el contenido en arcilla y la capacidad de intercambio catiónico fueron las propiedades más influyentes en la dinámica del Cu en el suelo.
3. El análisis de la bioacumulación de Cu en lechuga señaló importantes diferencias entre ambas regiones mediterráneas. Sin embargo, es importante señalar que la comparación fue difícil debido al intenso efecto tóxico que mostraron las lechugas cultivadas en la zona mediterránea australiana. En los suelos de esta región, se dejó de producir biomasa en dosis más bajas que en

caso de los suelos mediterráneos españoles, por lo que la comparación en relación a valores y tasas de absorción fue complicada. En ambas áreas, el contenido en Cu en las partes comestibles del cultivo aumentó a medida que también aumentaba la concentración en suelo. Sin embargo, no se pudo extraer un patrón común debido a los limitados datos disponibles sobre los suelos y cultivos australianos. Por otro lado, los análisis de correlación entre el contenido en Cu y las propiedades del suelo mostraron resultados similares entre ellos y con los relativos a la producción de biomasa. En este caso, pH, salinidad y contenido en arena favorecieron la absorción del Cu por parte de este cultivo, mientras que el contenido en materia orgánica y el contenido en arcilla tuvieron el efecto contrario.

4. La comparación entre cultivos cultivados en suelos agrícolas de la región mediterránea española en términos de bioacumulación mostró diferencias significativas entre ellos. Tallos y hojas de ambos cultivos acumularon cantidades similares de Cu en las diferentes dosis, aunque la concentración en el caso de las lechugas estuvo siempre por encima de aquella determinada para tomate. Sin embargo, los resultados más relevantes se obtuvieron al analizar la concentración de Cu en la parte comestible del cultivo. Mientras que para la lechuga, el contenido en Cu en dicha parte del cultivo aumentó conforme lo hacía también la concentración en Cu en el suelo, para el tomate, en contenido en la parte comestible se mantuvo constante en todas las dosis y suelos ensayados para los que se obtuvieron frutos.
5. Los resultados de bioacumulación en la parte comestible de la lechuga y tomate obtenidos para las dos regiones agrícolas mediterráneas consideradas solo permitieron establecer el umbral crítico para las lechugas cultivadas en los suelos agrícolas mediterráneos españoles. Estos umbrales (1975 mg_{Cu}/kg para Rojales, 8697 mg_{Cu}/kg para Sollana, 30817 mg_{Cu}/kg para Nules) mostraron que el estándar de calidad establecido en la legislación española vigente es demasiado restrictivo para los suelos no salinos mientras que es demasiado permisivo para el caso de los salinos.
6. La concentración máxima de Cu establecida en la legislación identificada (Codex 1998, McLaughlin et al. 2000) sólo fue excedida en el caso del cultivo de la lechuga cultivada en el suelo salino de la región mediterránea española, y tras la dosis cuarta. Así pues, se debe prestar especial atención a aquellos suelos salinos con concentraciones elevadas (>1647.5 mg_{Cu}/kg), ya que algunos cultivos no deberían de ser cultivados debido a los riesgos sanitarios asociados.
7. Las propiedades edáficas son muy relevantes e influyen de manera significativa la movilidad y biodisponibilidad del Cu en suelo. Esta influencia depende principalmente del pH de suelo. En suelos básicos (pH>7), el contenido en materia orgánica y el contenido en arcilla reducen

esta movilidad a través de procesos de adsorción, mientras que la salinidad y el contenido en arena favorecen la absorción de este metal por la plantas. En suelos ácidos ($\text{pH} < 7$), el efecto de un bajo pH, es decir, de favorecimiento de la movilidad, es mucho más relevante y significativo que aquél de cualquier otra propiedad.

8. El análisis del efecto de Cu y su interacción con las propiedades del suelo sobre la producción de biomasa y sobre la bioacumulación de Cu en las diferentes partes de las plantas de lechuga y tomate indicó que el estándar de calidad del suelo español no es válido desde ninguno de los dos puntos de vista para todos los suelos agrícolas ensayados. Así pues, los estándares de calidad del suelo para suelos contaminados por metales pesados se deberían establecer teniendo en cuenta la influencia de las diferentes propiedades edáficas sobre la movilidad y biodisponibilidad del metal. Para el caso concreto del Cu, las propiedades que se deberían considerar son: pH, contenido en materia orgánica, contenido en arcilla, contenido en arena y salinidad.
9. Para los cultivos considerados en esta Tesis, el efecto más relevante se produjo a nivel de producción de biomasa. Por tanto, esta es la perspectiva que se debe considerar para establecer estándares de calidad del suelo adecuados.
10. El tomate mostró un potencial fitorremediador importante, extrayendo y acumulando Cu no sólo en suelos con concentraciones de este metal bajas o medias sino también en altas concentraciones ($> 1700 \text{ mg}_{\text{Cu}}/\text{kg}$), y mostrando en todas esas una tasa de translocación hacia la parte comestible muy baja. Sin embargo, los tomates cultivados en suelos con concentraciones elevadas de Cu experimentaron una importante reducción de biomasa. Por eso, es necesario encontrar un adecuado equilibrio entre estos dos aspectos, para poder proponer este cultivo como alternativa de fitorremediación en las condiciones edáficas adecuadas.
11. La fluorescencia de rayos X portátil (P-XRF) ha demostrado ser una técnica adecuada para llevar a cabo el *screening* y la evaluación primaria de áreas contaminadas por Cu. La aplicación de esta novedosa técnica parece más adecuada para analizar muestras inorgánicas, debido a su mejor ajuste en los modelos de regresión calculados, aunque mostró buen potencial para el caso de matrices orgánicas, a falta de más experimentos.
12. La determinación del contenido de Cu en matrices orgánicas a través del P-XRF debe incluir un adecuado pretratamiento de las muestras que reduzca las limitaciones introducidas por los efectos de matriz y de método.

Perspectivas futuras:

La continuidad de la línea de investigación en esta área mejoraría los resultados obtenidos en esta Tesis y aumentaría el conocimiento de la gestión y manejo de las áreas contaminadas por Cu. Así, la investigación debería centrarse en las siguientes áreas:

- Sería adecuado ampliar el conjunto de suelos ensayados, incluyendo suelos agrícolas de otras zonas de la región Mediterránea. Para ello, se deberían incluir suelos procedentes de otras áreas de la Cuenca Mediterránea (p. ej. Marruecos, Túnez, etc.), y del Norte (p. ej. California) y Sur de América (p. ej. Chile). De esta manera se cubriría un rango mayor de suelos agrícolas presente en esta región climática y se podrían proponer estándares de calidad del suelo más adecuados para todos ellos. Además, la inclusión y consideración de todos estos suelos permitiría mejorar las conclusiones extraídas en relación al efecto y la influencia de las diferentes propiedades del suelo sobre la movilidad y biodisponibilidad del metal en suelo.
- Los ensayos llevados a cabo en esta Tesis deberían ser repetidos incluyendo otros cultivos de hoja y de fruto para poder analizar y corroborar las conclusiones extraídas para cada uno de los tipos de cultivos ensayados, y extraer así conclusiones más robustas que puedan ser útiles para la gestión y fitorremediación de áreas contaminadas por Cu.
- Otros cultivos ampliamente extendidos y consumidos, como pueden ser los cereales, los cultivos de inflorescencia o los tubérculos deberían ser contemplados y ensayados con la intención de identificar posibles diferencias o similitudes con los cultivos ya considerados en términos de producción de biomasa y de bioacumulación de Cu. Esto permitiría corroborar o aumentar el conocimiento en esta área y mejorar las bases para el establecimiento de estándares de calidad del suelo adecuados y para el adecuado manejo de suelos agrícolas afectados por Cu.
- El potencial fitorremediador del tomate debería ser corroborado, ampliando el conjunto de suelos ensayados en esta Tesis, incluyendo entre otros los suelos ácidos. Esto permitiría analizar el comportamiento y la respuesta de este tipo de cultivo en condiciones edáficas ácidas y, al mismo tiempo, compararlo con los resultados obtenidos para la lechuga. Esto permitiría extraer conclusiones más robustas y significativas en relación a la influencia del tipo de cultivo y suelos en la dinámica del metal.
- Se deberían ampliar y mejorar los resultados obtenidos con el P-XRF, a través de la realización de nuevos experimentos que incluyan más suelos y cultivos. Estos nuevos experimentos deben incluir un diseño más adecuado en relación a las dosis ensayadas, además de que esta técnica

debe ser ensayada en suelos básicos. En éstos, las limitaciones asociadas al método y al tipo de matriz deben ser minimizados, mejorando la preparación de la muestra previa al análisis. Además, los resultados deberían ser corroborados con experimentos/ensayos en campo.



INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Suelo: Evolución e importancia en el medio ambiente

La palabra suelo proviene del latín *solum*, que significa suelo, tierra o parcela, y tradicionalmente ha sido entendido como el “medio natural en el que crecían las plantas terrestres” (Fadda 2012). Dicha definición está ligada al uso tradicional del suelo como medio de cultivo y, por tanto, a una visión más productivista de éste. Sin embargo, el concepto de suelo ha ido evolucionando en el tiempo, adquiriendo una visión más amplia e integrando aspectos no sólo productivistas, de manera que actualmente su definición es muy extensa y variada, y depende de la perspectiva desde la cual se observe.

En el ámbito de las ciencias naturales, y de un modo genérico, el suelo es la “capa superior y/o exterior de la corteza terrestre, la cual es el resultado de los efectos combinados del clima, organismos vivos, roca madre, relieve y tiempo.” El medio edáfico puede considerarse un sistema abierto y dinámico, tanto en el tiempo como en el espacio, a través del cual se producen y regulan diferentes flujos de materias y energías. La combinación de sus propiedades físicas, químicas y biológicas permite el desarrollo de sus funciones básicas (Blum 1990) (Figura 2.1).



Figura 2.1 Funciones del suelo (Blum 1990).

De acuerdo con Blum (1990), las funciones básicas del suelo son seis (Figura 1.1). En primer lugar, el suelo es el medio físico donde se desarrolla toda actividad en el medio terrestre, es decir, desarrolla una función de soporte. A su vez, y en relación con la anterior, se encuentra la función de medio histórico, ya que este contiene el registro de procesos pasados. En tercer lugar, el suelo también ejerce de hábitat biológico y sirve de sustento para el crecimiento de numerosas especies. Además, es fuente de materias primas necesarias para la comunidad humana y también actúa como productor de biomasa. Finalmente, el medio edáfico presenta una función reguladora que influye en el intercambio de componentes entre la atmósfera, la hidrosfera, la litosfera y la biosfera. Esta última es, sin duda, la función más compleja por los numerosos procesos implicados. De manera más concreta, esta función se manifiesta principalmente a través de los procesos de filtración, amortiguación y transformación de los diferentes elementos y compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos, los cuales se producen como consecuencia de los diferentes procesos biogeoquímicos del suelo. Estos últimos hacen referencia a diferentes mecanismos internos como por ejemplo el intercambio catiónico, la adsorción específica, la quelación, la precipitación, la inmovilización por organismos del suelo o las reacciones de oxidoreducción (Álvarez 1985, McBride 1989, McLean & Bledsoe 1992, Ross 1994a, Ross 1994b, Cala 1998, Martínez & Motto 2000, McLaughlin et al. 2000).

La multifuncionalidad del suelo hace que éste haya sido y sea uno de los recursos más utilizados y explotados, lo cual ha provocado y está provocando grandes alteraciones del mismo, muchas de las cuales derivan en su grave deterioro. El primero de los periodos clave en cuanto a la utilización del recurso suelo es la Revolución Industrial (1750-1840; 1880-1914). Este evento produjo la intensificación del uso del suelo, a través de su utilización como función soporte, de su mayor aprovechamiento como fuente de materias primas y de un aumento de la productividad agrícola. Además, el crecimiento de la industria y el aumento de la producción agrícola dió lugar a un gran aumento de la población, la cual comenzó a acumularse en grandes urbes. Esto, a su vez, dió lugar a la generación de grandes cantidades de residuos urbanos e industriales, los cuales fueron emplazados en el suelo de manera descontrolada. Actualmente, ésta sigue siendo una práctica habitual en muchas zonas del planeta. El segundo de los periodos clave para el suelo fue el comprendido entre los años 50 y la actualidad, durante el cual las políticas agrarias comienzan a tomar un gran protagonismo. Tras la Segunda Guerra Mundial (1939-1945), un aumento creciente de la población y un sistema agrario obsoleto, incapaz de abastecer a toda la población y que desequilibra los precios de los alimentos, hizo que en Estados Unidos y Europa se impulsaran fuertemente las políticas agrarias. Dichas políticas, sobre todo la Política Agraria Común (PAC) en Europa, trajeron consigo una tecnificación del sistema agrario, basándolo en la mecanización, en la extensión del monocultivo y en el uso intensivo de agroquímicos y fertilizantes (Recatalá et al. 2009). Estos dos periodos cambiaron la relación que, hasta el momento, la comunidad humana había tenido con el recurso suelo, intensificándose la explotación de sus funciones de soporte, de fuente de materia primas y de

productor de biomasa, e introduciendo gran cantidad de productos y compuestos, los cuales modifican el equilibrio físico, químico y biológico de este recurso.

El vertido de residuos urbanos e industriales y el uso abusivo de fertilizantes y agroquímicos pueden ser tamponados por la función amortiguadora (de regulación) del suelo. Sin embargo, dicha capacidad no es ilimitada, sino que depende de las propiedades físico-químicas de las sustancias introducidas y almacenadas, de las propiedades y características edáficas y de las condiciones ambientales imperantes en el medio (Felipó & Garau 1987, Ritchie & Sposito 1995, Ge et al. 2000). Dependiendo de estos factores, los efectos perjudiciales que pueden originar dichas sustancias en el suelo pueden ser más o menos intensos, y manifestarse a corto o largo plazo. En cualquier caso, cuando se supera la capacidad amortiguadora del suelo, éste puede dejar de ser eficaz como sistema depurador y puede comportarse como fuente de sustancias tóxicas, actuando como una bomba química en el tiempo (del inglés *Chemical Time Bomb*), pudiendo entonces desencadenar efectos perjudiciales sobre la salud humana y el medio ambiente (Nriagu 1990, Macías 1993, Oliver 1997).

Entre las sustancias que se acumulan en el suelo, y que se encuentran tanto en vertidos urbano-industriales como en productos agroquímicos y fertilizantes, los metales pesados merecen una mención especial debido a su persistencia y toxicidad.

2.2 Metales pesados y Contaminación del suelo

El término metal pesado hace referencia a una propiedad física y no química de los metales, denominando así a todo aquel elemento metálico que presenta una densidad superior a 6 g/cm³, cuando está en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo los alcalinos y alcalinotérreos) (Davies 1980, Tiller 1989, Alloway 1990, Cala 1998).

A pesar de lo concreta que parece la definición expuesta, algunos autores denominan metales pesados a ciertos elementos semi-metálicos (metaloides), como el As, o a metales ligeros como el Al. Además, en las últimas décadas, el término metal pesado ha sido utilizado en varias publicaciones y legislaciones relacionadas con el peligro químico y el uso adecuado/inadecuado de productos químicos, empleándolo para identificar/denominar un grupo de metales y metaloides asociados a la contaminación y a problemas de toxicidad o ecotoxicidad (Duffus 2002). Algunos autores (p. ej., Adriano 2001, Duffus 2002) consideran esta acepción ambigua, puesto que relaciona el término metal pesado con elementos tóxicos y contaminantes. Por esta razón, suele adoptarse la denominación de “elemento o metal traza” para hacer referencia a todos los elementos presentes en el medio ambiente en un rango de concentración entre 0.01-100 mg/kg (Jenkins & Gareth 1980, Alloway 1990), donde se incluirían tanto elementos esenciales como elementos contaminantes.

A pesar de la problemática asociada a esta denominación, en este trabajo se utilizará la palabra metales pesados para referirse a los elementos Cd, Pb, Cu, Zn, Ni, Co y Cr, considerando así

la denominación que aparece ampliamente extendida en la bibliografía científica internacional sobre la temática.

Dentro del conjunto de metales señalados en el párrafo anterior, y desde un punto de vista biológico, se pueden distinguir dos grandes grupos. El primer grupo engloba aquellos elementos que presentan una función biológica conocida en los seres vivos, y se denominan elementos esenciales. Éstos desempeñan un papel primordial en diferentes procesos metabólicos y de síntesis de proteínas, y son requeridos en cantidades pequeñas o muy pequeñas, por lo que superado cierto umbral (característico de cada uno de los metales) pueden ser tóxicos. Dentro de este grupo se encuentran el Cu, Zn, Ni, Co y Cr (Tabla 2.1). El segundo grupo engloba a aquellos metales que no tienen ninguna función biológica conocida y, por tanto, no producen fenómenos de deficiencia cuando se encuentran a bajas concentraciones. Como en el caso de los elementos esenciales, estos metales son tóxicos cuando se supera cierto nivel umbral. Sin embargo, dicho umbral es mucho más bajo que en los casos anteriores. En este segundo grupo quedarían incluidos el Cd y el Pb.

Tabla 2.1 Micronutrientes con función biológica y principales funciones en plantas, animales y humanos (Gómez García & Magaña Garns 2004, Alloway 2013)

Elemento	Función
Cu	Importante papel estructural y funcional en las enzimas oxidativas.
Zn	Constituyente de enzimas involucradas en la síntesis de proteínas y en la regulación genética.
Ni	Vital para el combate de algunas enfermedades, tanto en plantas como animales y humanos.
Co	No es un micronutriente estricto pero en las plantas es necesario para la fijación de nitrógeno en los nódulos de las leguminosas.
Cr	Sólo requeridos por los animales y humanos. Interviene en el control del azúcar en sangre.

Todos estos elementos han sido y siguen siendo objeto de numerosos estudios, debido a que presentan los siguientes rasgos comunes, que les confiere un gran interés ambiental (Alloway 1990, Facchinelli et al. 2001):

- 1) Los metales pesados tienen un carácter acumulativo ya que no son biodegradables, de tal forma que su concentración en el medio ambiente no disminuye con el tiempo, a diferencia de la mayoría de los contaminantes orgánicos.
- 2) Como se ha indicado anteriormente, algunos de ellos resultan esenciales o, en determinados casos, beneficiosos para los organismos vivos a pequeñas concentraciones, pero sin embargo todos ellos se convierten en elementos tóxicos cuando se exceden ciertos umbrales.

3) Generalmente, la mayoría de metales pesados se encuentran en forma de cationes, pudiendo interactuar con algunos componentes del suelo (p. ej., materia orgánica, arcillas, etc.), los cuales influyen en su dinámica (movilidad y disponibilidad) en los ecosistemas y el medio ambiente.

4) Los metales pesados se encuentran presentes en el suelo de forma natural, en función del tipo de material originario y de los procesos edafogénicos ocurridos, por lo que se requiere el estudio de las concentraciones normales (geogénicas) o niveles de fondo para poder caracterizar procesos de contaminación de origen antrópico.

2.2.1 Origen de los metales pesados y de la contaminación de los suelos

El origen de los metales pesados en el suelo puede ser natural, proveniente del material originario, o antrópico, procedente de diferentes actividades antrópicas contaminantes.

Por un lado, el origen natural de los metales en el suelo hace referencia a la concentración de metales en un suelo derivada de los procesos de erosión/meteorización del material originario (concentraciones geogénicas). La presencia de unos metales u otros, y sus respectivos niveles dependen del contenido en metales de dicho material. Durante el proceso de formación de los suelos, diferentes procesos de descomposición química afectan a la roca madre o material originario, los cuales provocan la liberación de algunos de sus constituyentes en forma soluble y la formación de nuevos constituyentes (secundarios) derivados de la reacción química entre algunos productos liberados/meteorizados (Alloway 2013). Ciertos materiales originarios son ricos en metales pesados (Tabla 2.2), por lo que las concentraciones de éstos en suelos formados a partir de ellos pueden ser altas y en ocasiones tóxicas.

Tabla 2.2 Concentración de metales pesados (mg kg^{-1}) en diferentes materiales originarios de suelos (Alloway 2013).

Elemento	Corteza terrestre	Granito	Basalto	Rocas ultramórficas	Areniscas	Pizarras	Calizas	Carbón
Cd	0.1	0.1	0.2	0.05	< 0.04	0.25	0.1	1
Pb	17	20	4	0.05	10	22	5	20
Cu	14	12	90	40	2	45	6	20
Zn	52	50	100	80	20	100	40	50
Ni	19	5	130	2000	2	70	5	20
Co	12	4	45	110	0.3	20	0.1	10
Cr	35	10	250	2300	35	100	5	20

Otras fuentes naturales como las erupciones volcánicas, las cenizas volantes y los incendios incrementan los niveles de metales en el suelo, si bien las dos últimas se pueden ver acentuadas por la actividad humana (Freedman & Hutchinson 1981).

Debido a la presencia natural de metales pesados en el suelo y a su variabilidad en éste, resulta necesario el establecimiento de una serie de valores “normales” o “naturales” de concentraciones de estos elementos en el suelo de origen geogénico. Estos valores “normales” son los denominados valores de fondo o fondo geoquímico (Kabata-Pendias & Pendias 2001). El valor de fondo de cada elemento variará según el material originario, y la distribución y niveles que alcancen los metales pesados en los suelos dependerá tanto del nivel de fondo como de los aportes antrópicos. Así, los contenidos naturales de los metales pesados presentes en el suelo pueden verse incrementados por las actividades antrópicas. De acuerdo con Alloway (2013), los principales mecanismos de transporte/incorporación de metales pesados desde las diferentes actividades antrópicas hasta el suelo son:

- Transporte a través de corrientes de aire y deposición de polvo, de partículas tamaño aerosol ($< 30 \mu\text{m}$) y de formas gaseosas de los metales (ej. Hg).
- Movimiento de aguas (escorrentía o inundación) seguido de la deposición de los sedimentos con contenido metálico aguas abajo o en las llanuras de inundación.
- Movimiento gravitacional de materiales rocosos ricos en metales o material contaminado de minería.
- Deposición intencionada en los suelos a través de las diferentes prácticas agrícolas e industriales.

La contaminación antrópica puede clasificarse en puntual o difusa, dependiendo de las características del foco emisor de contaminantes (Van Camp et al. 2004, Alloway 2013). Dentro de la contaminación difusa, se encontrarían las fuentes de contaminación cuya área de acción es extensa e inespecífica. Se engloba en este grupo la deposición atmosférica, procedente de actividades urbano-industriales; el aporte por sedimentos fluviales contaminados; y la contaminación derivada de las prácticas agrícolas y ganaderas. La contaminación difusa se caracteriza por un menor aporte de contaminantes por unidad de superficie que la puntual, aunque de extensión y magnitud más importantes (Felipó & Garau 1987, Díaz-Fierros 1992, Van Camp et al. 2004). Por otro lado, la contaminación puntual recoge aquellas fuentes de contaminación que realizan un aporte de metales pesados muy localizado. Las fuentes contaminantes que originan una contaminación puntual pueden clasificarse en estacionarias y móviles, en función de la movilidad del foco contaminante (Freedman & Hutchinson 1981). Se consideran focos estacionarios la actividad urbano-industrial y la actividad minera, capaces de generar residuos sólidos, efluentes líquidos y emisiones gaseosas que pueden incorporar sustancias nocivas al suelo en las zonas próximas al foco emisor si no se lleva a cabo un tratamiento adecuado de las mismas. Por otro lado, las fuentes móviles, referidas mayoritariamente a los medios de transporte (p. ej., vehículos, aviones), generan emisiones en forma de gases y polvo en

suspensión compuestos por diferentes sustancias contaminantes, entre las que se encuentran los metales pesados. En este caso, suelen encontrarse mayores concentraciones en las proximidades de las zonas de mayor intensidad contaminante (p. ej., carreteras).

Los metales pesados presentes en el suelo pueden encontrarse en diferentes formas en función de su origen, de las características del metal, de las propiedades edáficas y de las condiciones ambientales. Shuman (1991) y McLean & Bledsoe (1992) establecen siete posibles estados:

- (1) en la solución del suelo como metal libre, formando complejos o asociados a coloides móviles.
- (2) en las posiciones de intercambio de los constituyentes inorgánicos del suelo.
- (3) adsorbidos específicamente a los constituyentes inorgánicos.
- (4) adsorbidos a la materia orgánica insoluble.
- (5) precipitados en forma de carbonatos, fosfatos, hidróxidos, etc.
- (6) en la estructura de los minerales secundarios.
- (7) en la estructura de los minerales primarios.

Los metales pesados que han sido introducidos a través de las actividades humanas suelen encontrarse en las cinco primeras formas, sobre todo en la primera, mientras que los metales pesados de origen natural pueden presentarse en cualquiera de las formas mencionadas, en función de la formación y evolución del suelo. En ambos casos, la solución del suelo y las reacciones de equilibrio entre las diferentes fracciones representan los factores más importantes que determinan el comportamiento y la movilidad de los metales pesados.

La concentración de metales pesados en la solución del suelo está gobernada por una gran variedad de procesos interrelacionados, entre los que se incluye la formación de complejos con ligandos orgánicos e inorgánicos, las reacciones de oxidación-reducción, las reacciones de precipitación-disolución y las reacciones de adsorción-desorción, principalmente (Adriano 2001, Harter & Naidu 2001). La Figura 2.2 presenta un esquema de estos procesos y de los componentes del suelo que controlan, de forma directa o indirecta, la fracción adsorbida, precipitada o complejada de metales pesados y la concentración de éstos en la solución del suelo, que puede ser absorbida por las raíces de las plantas o lixiviar hasta el acuífero.

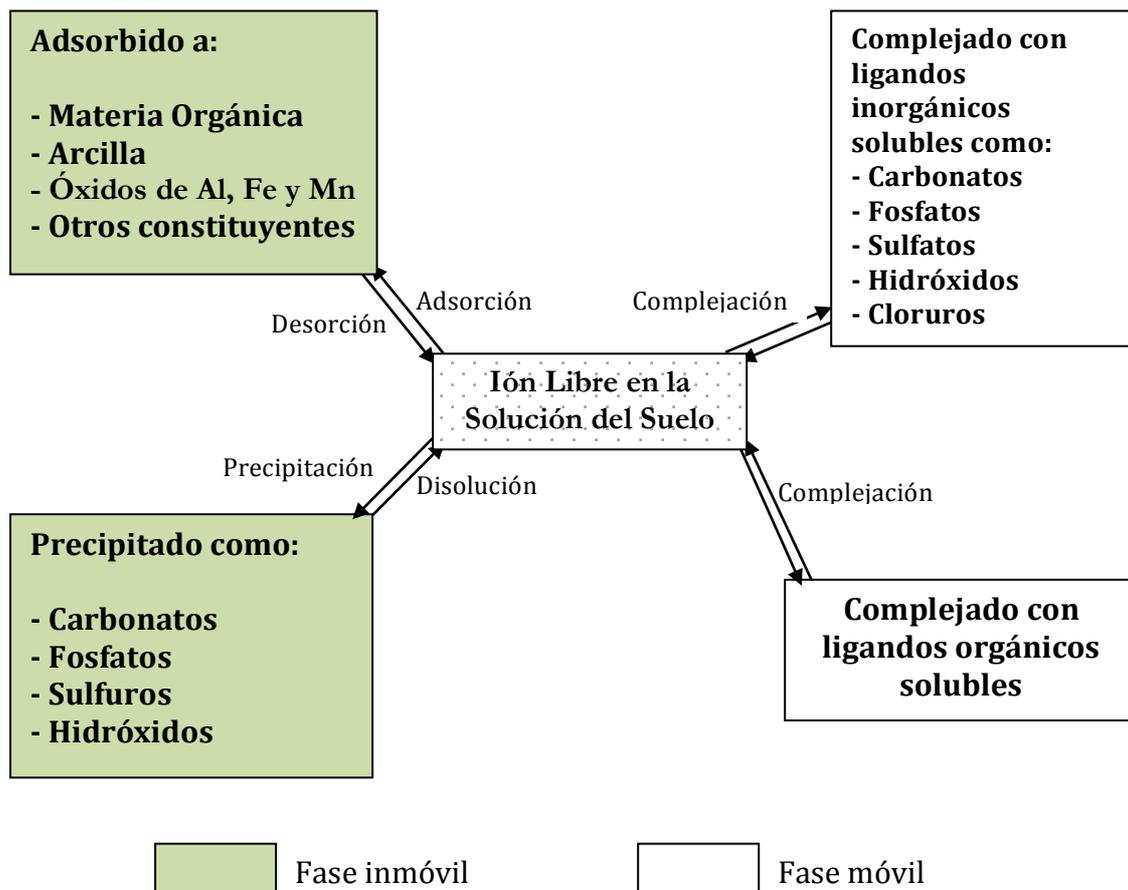


Figura 2.2 Procesos y componentes del suelo que controlan la movilidad de los metales pesados (McLean & Bledsoe 1992, Adriano 2001, Micó 2005).

Estas reacciones se ven influenciadas y condicionadas por determinados componentes del suelo como, por ejemplo, la materia orgánica, las arcillas, los carbonatos, y algunas características y propiedades del suelo tales como el pH, la capacidad de intercambio catiónico, etc. (Alloway 1990, McLean & Bledsoe 1992, Jopony & Young 1994, Ritchie & Sposito 1995, McBride et al. 1997, Mortvedt 2000, Kabata-Pendias 2004, Mico 2005).

2.2.2 Suelos agrícolas y contaminación por Cobre

Teniendo en cuenta lo expuesto hasta el momento, la presencia de metales pesados en los suelos es común, debido a la presencia de éstos de manera natural en el material originario, y necesaria, ya que muchos de ellos son micronutrientes esenciales para otros organismos. Sin embargo, los aportes externos de origen antrópico aumentan significativamente esas concentraciones, desequilibrando las relaciones internas del suelo y generando así problemas de contaminación.

Los ecosistemas agrarios/suelos agrícolas son especialmente relevantes en este sentido ya que elevadas concentraciones de ciertos metales pesados puede dar lugar a problemas en el uso de estos

suelos. Un aumento de la concentración de metales pesados incrementa la biodisponibilidad de éstos, lo cual facilita su incorporación a la plantas. Dicha incorporación o asimilación puede generar problemas de toxicidad, entendida como los posibles efectos tóxicos sobre la planta y los efectos derivados sobre la producción, y de acumulación de metales, lo cual conlleva un problema de sanidad ambiental a través de la entrada de estos elementos en la cadena trófica. Este aspecto se abordará con un mayor detalle en la siguiente sección.

La figura 2.3 esquematiza el ciclo biogeoquímico de los metales pesados en los sistemas agrarios.

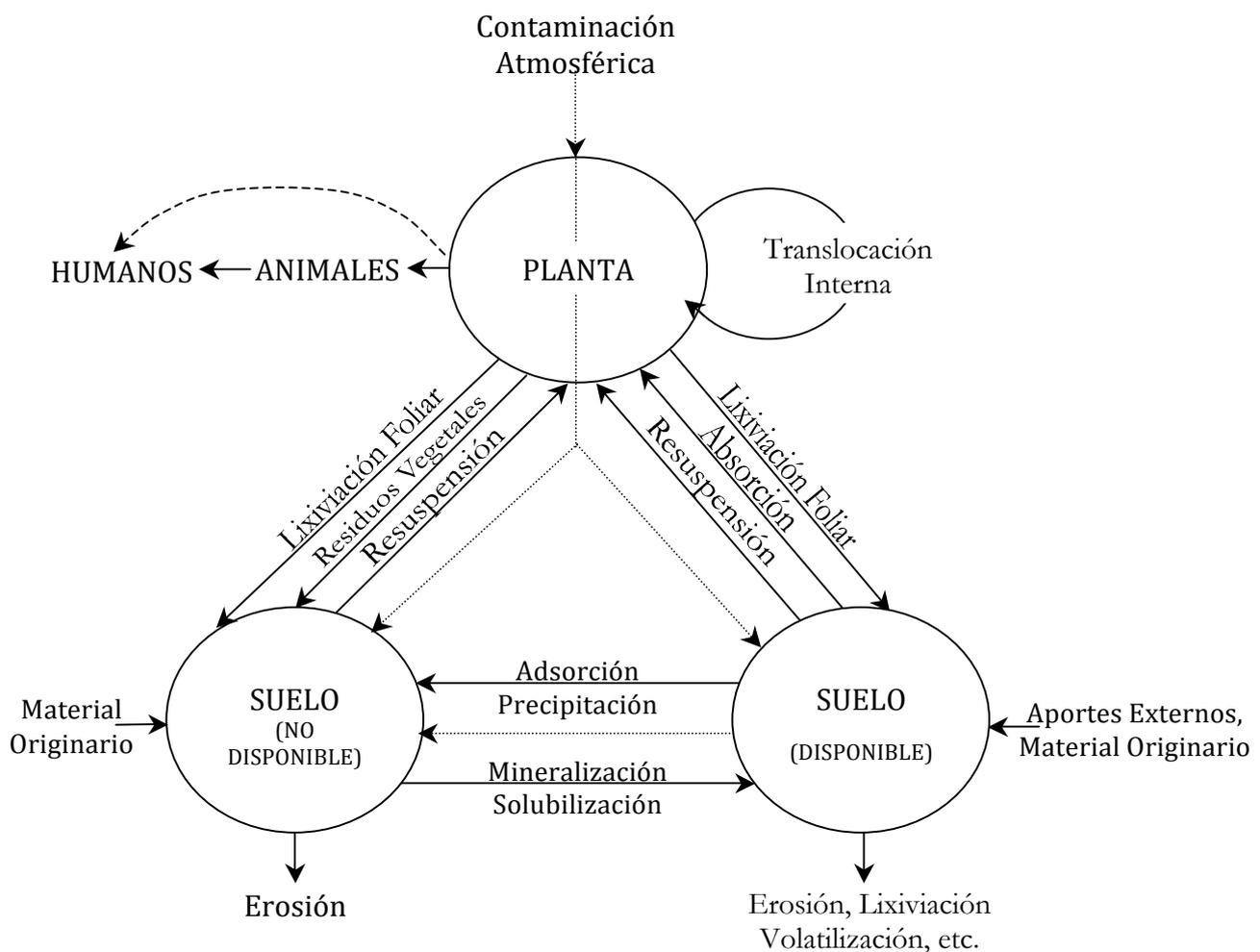


Figura 2.3 Esquema del ciclo biogeoquímico de los metales pesados en el sistema agrario. (Adriano 2001, Micó 2005)

De acuerdo con el esquema de la figura 2.3, en el ciclo biogeoquímico de los metales de los sistemas agrarios, dos son las entidades o componentes que desempeñan un papel fundamental: el suelo y la planta. El sistema agrario y su funcionamiento no se entienden sin la intervención de ambos, siendo su equilibrio de gran relevancia. Dicho equilibrio está controlado por una serie de

procesos o rutas de transferencia que dependen del elemento considerado, del tipo de suelo y de las propiedades del mismo, de la localización geográfica, de las especies de plantas, y de las prácticas de manejo, entre otras (Adriano 2001).

La entrada de metales pesados en el sistema agrario se puede producir por diferentes vías. Según lo expuesto en el esquema, una de las vías de entrada es la deposición atmosférica, que afecta directamente a las plantas y al suelo. La alteración del material originario y los aportes externos, donde se incluyen aquellos contaminantes procedentes de la actividad humana, pueden suponer otras fuentes de metales pesados, en este caso específicas para el suelo. Asimismo, las plantas pueden también ser una fuente de estos elementos en los suelos agrícolas, a través de la lixiviación foliar o a través de la descomposición de los residuos vegetales depositados sobre el suelo.

Por otro lado, la salida de los metales pesados en el sistema se produce como consecuencia de las pérdidas por erosión, lixiviación, volatilización, o a través de la absorción por las plantas y su posterior consumo por animales o humanos. En función del equilibrio entre las vías de entrada y salida, el sistema agrario puede sufrir una acumulación de determinados metales pesados, sobre todo cuando aumentan los aportes externos bajo diversas formas.

Dentro de este esquema, también juega un papel importante la relación entre la fracción disponible o asimilable por organismos, principalmente, plantas, la cual depende de procesos como la mineralización o la solubilización; y la fracción no disponible o no asimilable, que depende de otros procesos como la adsorción o la precipitación. A su vez, estos procesos dependen de una serie de propiedades edáficas, las cuales son clave en su regulación y, por tanto, en el balance de las fracciones disponible y no disponible. Las propiedades del suelo más relevantes son: pH, contenido en materia orgánica (SOM), textura, capacidad de intercambio catiónico (CIC), salinidad (CE) y contenido en carbonatos (CCE) (Adriano 2001, Recatalá et al. 2001, Carrillo-González et al. 2006, Rieuwerts et al. 2006).

En el suelo, los hidrogeniones (H^+) están tanto en la solución del suelo (acidez activa) como en el complejo de cambio (acidez de cambio). Ambas formas se encuentran en equilibrio dinámico y debido a esto, los suelos presentan una fuerte resistencia a cualquier cambio de su pH. El valor del pH es de gran importancia, ya que influye en la reactividad del suelo, haciendo más disponibles los cationes metálicos a pH ácidos, ya que éstos son desplazados del complejo de cambio por los hidrogeniones (H^+) y pasan a la disolución del suelo.

La materia orgánica y los carbonatos, por su parte, también influyen en la dinámica de los metales, ya que ambas propiedades presentan una elevada capacidad de retención de diversos metales a través de procesos de adsorción, y también de precipitación en el caso de los carbonatos (Adriano 2001, Kabata-Pendias 2011). Los metales retenidos por los componentes del suelo son diferentes, dependiendo de la afinidad que presenta cada una de ellas por tales elementos.

La textura depende de la fracción granulométrica mayoritaria del suelo y también influye en la retención de metales pesados. La presencia de un mayor contenido de arena favorece la aireación y

permeabilidad del suelo. Sin embargo, se trata de una fracción de baja-nula reactividad lo que hace que su capacidad de retención sea baja o incluso nula. Por otro lado, la arcilla es la fracción del suelo más fina y un exceso de ésta, constituida mayoritariamente por minerales de arcilla, provoca la impermeabilización del suelo, a través de la retención de agua y de la escasa porosidad que produce en el suelo. Sin embargo, los minerales de arcilla que forman parte de esta fracción forman coloides y agregados, favoreciendo la retención de metales en el complejo de cambio. Diferentes tipos de arcillas tienen diferente capacidad de retención dependiendo de su estructura y composición química.

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) se refiere a la reactividad del suelo, es decir, a la capacidad del suelo de retener o liberar diferentes cationes a la solución del suelo. Está determinada principalmente por la presencia de arcillas y de materia orgánica. Una mayor CIC significará una mayor cantidad de espacios para el cambio de iones y, por tanto, una mayor capacidad de retención de metales pesados (Adriano 2001, Kabata-Pendias 2011).

Por último, la salinidad (CE) tiene el efecto contrario que la CIC. La salinidad influye en la dinámica de los metales en el suelo y los hace más disponibles a través de la formación de complejos con el ión cloruro, que suelen ser solubles (Doner 1978, Jiménez 1998, López-Mosquera et al. 2000).

En el sistema agrario, los aportes externos tienen diferentes orígenes, los cuales se pueden clasificar/resumir de la siguiente manera (Nriagu 1990, Ross 1994a, Tan 1994, Mulero 1999, Adriano 2001, Nicholson et al. 2003, Van Camp et al. 2004):

- 1) Fertilizantes fosfatados y nitrogenados.
- 2) Productos fitosanitarios (p. ej., herbicidas, insecticidas, fungicidas).
- 3) Abonos orgánicos procedentes de restos de origen animal (p. ej., purines, gallinaza) o vegetal (p. ej., vinazas, alpechín).
- 4) Enmiendas orgánicas derivadas del compostaje de residuos.
- 5) Lodos de depuración.
- 6) Aguas residuales utilizadas para el riego.
- 7) Emisiones atmosféricas procedentes de diversas actividades humanas.
- 8) Vertidos de actividades urbano-industriales próximas a los suelos agrícolas.

Así, por ejemplo, la concentración de metales pesados en suelos agrícolas ha aumentado en todo el mundo debido a la fuerte influencia de determinadas actividades urbano-industriales. Un ejemplo de ellos es la minería. Hart (1982) estableció niveles altos de metales en suelos agrícolas australianos cercanos a zonas mineras, mientras que Conesa & Schulín (2010) también detectaron niveles elevados de metales en suelos agrícolas debido a la influencia de la actividad minera en la zona de Cartagena-la Unión (España). Por otro lado, Andreu & Gimeno-García (1996) señalaron una alta biodisponibilidad de metales en suelos hortícolas de la provincia de Valencia (Comunidad Valenciana, España) derivado de fuentes urbano-industriales, como vertidos industriales o emisiones

atmosféricas.

Sin embargo, el mayor aporte de metales pesados a suelos agrícolas en términos cuantitativos, y el más sostenido en el tiempo, procede de la aplicación de diferentes prácticas agrícolas inadecuadas. Estas prácticas se refieren a la inapropiada y excesiva utilización de fertilizantes, de productos fitosanitarios, de enmiendas orgánicas y de lodos de depuración para la mejora de la productividad del suelo.

Los contenidos aproximados de metales pesados de estos diferentes productos se resumen en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Contenido en metales pesados (mg/kg) en fertilizantes, lodos de depuradora, enmiendas orgánicas y cenizas (Colomer & Sánchez 2001, Kabata-Pendias 2011).

Metal pesado	Fertilizantes fosfatados	Fitosanitarios	Lodos de depuradoras	Purines (enmiendas orgánicas)
Cd	0.1	1.38-1.94	2-1500	0.25
Pb	9.1	60	33-3000	2
Cu	109	12-50	50-3300	113
Zn	54	1.3-25	550-4900	680
Ni	11	0.8-14	16-5300	6.1
Co	5	0.2-1.9	2-260	1.1
Cr	12	13	20-40600	11

Diferentes autores han establecido aumentos de los metales pesados en suelos agrícolas debido a la utilización de estos productos en diferentes países. Así pues, por ejemplo, Giuffréde López Carnelo et al. (1997) y Nicholson et al. (2003) determinaron elevados contenidos de metales pesados en suelos agrícolas derivados del uso de fertilizantes fosfatados en Argentina e Inglaterra y Gales, respectivamente; por otro lado, Huang & Jin (2008) y Luo et al. (2009) señalan el riesgo asociado a la aplicación de purines en suelos agrícolas debido a su alto contenido en metales pesados. Además, numerosos estudios señalan que el consumo de lodos aumenta la concentración de metales en el suelo (Hooda et al. 1997, Pinamonti et al. 1997, Krebs et al. 1998, Moral et al. 1998, Planquart et al. 1999, Moral et al. 2002). La presencia de metales pesados en estos materiales es relativamente elevada, en función de su origen y tratamiento.

Dentro del grupo de metales pesados que afectan a los suelos agrícolas, el Cobre (Cu) es, sin duda, uno de los más relevantes, como se puede apreciar en la Tabla 2.3, pues representa la base de muchos fertilizantes y productos fitosanitarios, ya que es clave en la formulación de éstos, y se encuentra en unas concentraciones muy elevadas en lodos de depuradora y purines. Como todos los metales pesados, y a pesar en este caso de ser un elemento esencial, la superación de determinadas concentraciones de este elemento en el suelo provocan problemas de toxicidad en plantas y, además, elevadas concentraciones en animales o en humanos dan lugar a desordenes fisiológicos que desembocan en problemas de salud. No obstante, y como se ha citado anteriormente, se trata de un

elemento esencial (oligoelemento) para el desarrollo de las plantas. De manera más detallada, su importancia reside en el hecho de ser un constituyente esencial de algunas de las enzimas vegetales más importantes; de desarrollar un papel primordial en diferentes procesos fisiológicos clave como son la respiración, la fotosíntesis, la distribución de los carbohidratos, la reducción y fijación del nitrógeno, o el metabolismo de proteínas y de la pared celular; de controlar la permeabilidad del xilema; de regular la producción de DNA y RNA, por lo que su deficiencia afecta a la reproducción de la planta; y de desempeñar un papel secundario o indirecto en la resistencia fúngica de las plantas (Kabata-Pendias 2011). También en animales y en humanos el cobre desempeña una función muy relevante ya que es un constituyente muy importante de algunas proteínas y metaloenzimas, y es además necesario en los procesos de óxido-reducción y de síntesis de hemoglobina (Kabata-Pendias & Mukherjee 2007).

De acuerdo con Nicholson et al. (2003), la deposición atmosférica aporta una media de 34 g/ha de cobre a los suelos agrícolas en Europa, aunque la incorporación de éste debido a esta fuente varía entre 5-100 g/ha. Sin embargo, el mayor aporte de Cu a los suelos agrícolas se produce a través del uso inadecuado y excesivo de los diferentes productos agroquímicos (fertilizantes, herbicidas fungicidas y pesticidas), y la aplicación de enmiendas orgánicas y lodos de depuradoras, como se ha señalado anteriormente.

El consumo de fertilizantes ha experimentado un importante incremento desde mediados del siglo XX en todo el mundo, debido a la modernización de la agricultura y a la creciente población mundial. España no es una excepción y dicho incremento se mantuvo hasta los años 2004-2005 cuando el consumo por unidad de superficie comenzó a estabilizarse, según muestra la Figura 2.4.

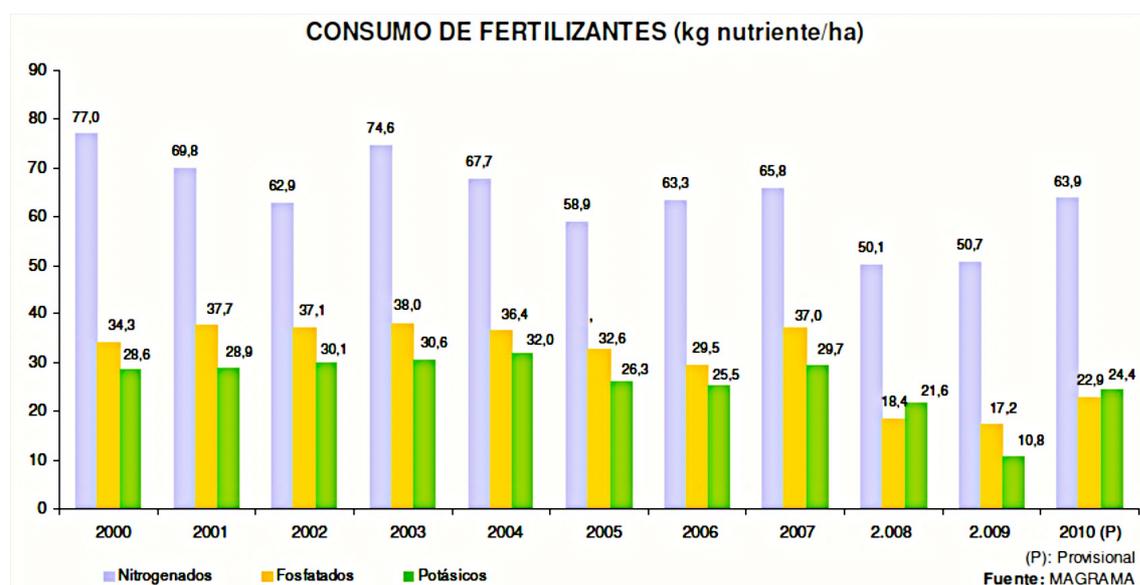


Figura 2.4 Consumo de fertilizantes (nitrogenados, fosfatados y potásicos) en España durante el periodo 2000-2010 (MAGRAMA 2012a).

Por otro lado, el consumo de productos fitosanitarios en Europa y, en particular, en España también experimentó una evolución creciente desde mediados del siglo XX, tanto en las cantidades aplicadas como en la variedad de compuestos utilizados. De forma similar al consumo de los fertilizantes, la tendencia en el consumo de estos productos ha sido ascendente, en paralelo con la modernización de la agricultura. En la última década, la utilización de estos productos por unidad de superficie se ha estabilizado en cuotas muy elevadas, mientras que la superficie cultivada se ha visto reducida en el mismo período de tiempo. El consumo principal procede mayoritariamente de tres tipos de productos como son los herbicidas, los insecticidas y los fungicidas, de tal forma que España es el país europeo con mayor uso de insecticidas por hectárea y año, seguido de Bélgica y los Países Bajos (Mulero 1999). La evolución del consumo de estos productos en España se puede observar en la Figura 2.5.

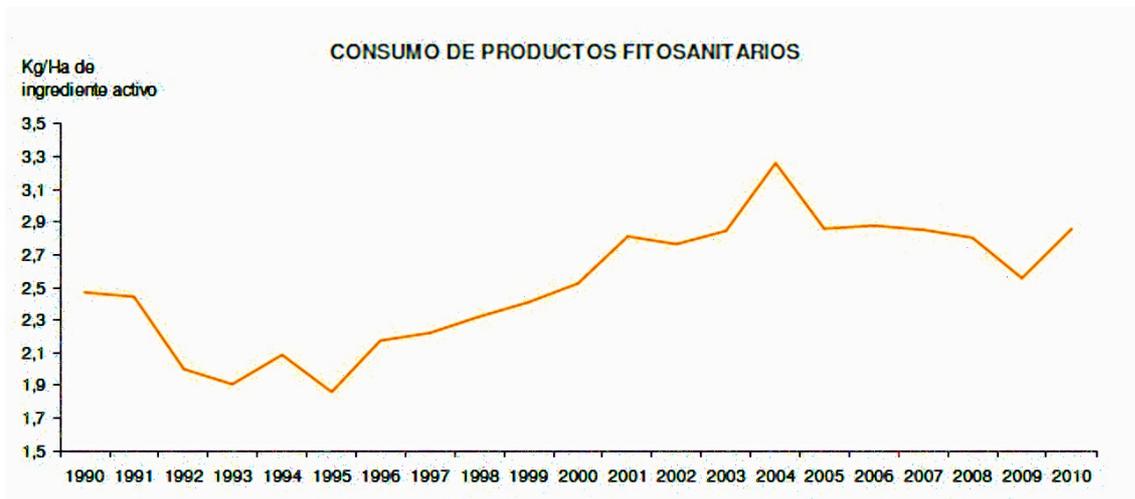


Figura 2.5 Consumo de productos fitosanitarios en España durante el periodo 1990-2010. (MAGRAMA 2012b)

Especialmente significativo es el aporte debido la aplicación de fungicidas, utilizados principalmente en suelos de cultivos hortícolas (Adriano 2001) y viñedos (Komárek et al. 2010). Así, por ejemplo, Micó et al. (2006) detectó niveles elevados de Cu en algunos suelos agrícolas de la provincia de Alicante (España) debido al uso de un alguicida/fungicida cúprico en los canales de riego. Brun et al. (1998) determinó que el contenido en Cu de algunos suelos agrícolas mediterráneos franceses había aumentado hasta los 200-500 mg/kg debido al uso intensivo de fungicidas. Por otro lado, Komarek et al. (2010) llevaron a cabo una extensa revisión bibliográfica sobre el uso de fungicidas cúpricos en suelo vitícolas en todo el mundo, particularmente en Europa. Estos autores detectaron niveles de hasta 3216 mg de Cu/kg pero la mayoría se situaban por debajo de los 700 mg de Cu/kg. El valor más elevado se produjo en unos suelos de viñedos de Brasil, los cuales habían sido explotados durante más de 100 años. Por su parte, en el norte de España, se han llegado a detectar

concentraciones de 603 mg de Cu/kg en suelos vitícolas debido al uso intensivo y continuado de este tipo de fungicidas (Nóvoa-Muñoz et al. 2007).

Con respecto a la aplicación de enmiendas orgánicas es importante señalar que la aplicación de purines también provoca el aumento del contenido en Cu de los suelos agrícolas ya que las dietas del ganado porcino incluyen este metal, tanto por motivos de salud como para acelerar el proceso de crecimiento y engorde (Nicholson et al. 2003). De acuerdo con Rosen & Roberts (1996), el Cu es añadido en las dietas para porcinos para mejorar el engorde de los individuos y también se cree que actúa como agente antibacteriano en el tracto intestinal. La aplicación continuada de este tipo de enmiendas ha producido un aumento considerable de las concentraciones Cu y Zn algunos países, como, por ejemplo, Dinamarca (Gräber et al. 2005) o China (Liu et al. 2005).

Por último, la aplicación de lodos de depuradora a los suelos agrícola, como enmiendas de mejora de las propiedades de éste y su efecto sobre los niveles de metales pesados, y en particular del Cu de los suelos ha sido ampliamente estudiado (p. ej., Hooda et al. 1997, Pinamonti et al. 1997, Krebs et al. 1998, Moral et al. 1998, Planquart et al. 1999, Moral et al. 2002). En el ámbito nacional, el Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario (BOE 1990), traspone la Directiva 86/278/CEE, de 12 de junio de 1986 (DOCE 1986) y establece los valores límite de concentración de metales pesados para que un suelo pueda ser tratado con lodos de depuración, así como el valor límite permitido en el lodo. En este sentido, la apertura de nuevas estaciones depuradoras en municipios con más de 15000 habitantes, tal y como exige la legislación europea (Directiva 91/271/CEE sobre el tratamiento de aguas residuales urbanas), y la puesta en marcha de mejoras en las prácticas de depuración han permitido aumentar la cantidad de aguas residuales depuradas y disminuir los contenidos de metales pesados en los lodos de depuración, lo que repercute en la preservación de la calidad de los suelos agrícolas.

Debido a la diversidad de fuentes que pueden incrementar el contenido de metales pesados y, en particular Cu, en los suelos agrícolas, es necesario estudiar en profundidad cual es el estado de los suelos agrícolas en relación a los metales pesados, y sobre todo, establecer criterios para determinar cuál es el grado de contaminación. Esto es especialmente relevante en el caso del Cu puesto que, de acuerdo Kabata-Pendias (2011), este metal tiende a acumularse en los horizontes superficiales de los suelos.

2.3 Protección de los suelos agrícolas: Estándares de calidad del suelo.

2.3.1 Necesidad de protección del suelo

Así pues, teniendo en cuenta lo expuesto hasta el momento y de acuerdo con algunos autores (Kabata-Pendias 2011), la contaminación de los suelos agrícolas por metales pesados y, en concreto por Cu, es un proceso muy extendido y que muy probablemente continúe produciéndose.

La acumulación de sustancias nocivas (p. ej. Cu) en el suelo hace que el equilibrio interno de éste se vea perturbado, repercutiendo tanto sobre él como sobre otros componentes del medio ambiente. De acuerdo con la FAO-UNESCO (<http://www.fao.org/soils-portal/degradacion-del-suelo/es/>), la degradación del suelo hace referencia a todos aquellos procesos que rebajan la capacidad actual y potencial del suelo para producir, cuantitativa y cualitativamente, bienes y servicios. Por tanto, la contaminación del suelo se puede clasificar como un proceso de degradación, ya que se trata de un proceso que limita la capacidad actual y futura de los suelos para cumplir sus funciones. De hecho, la contaminación de los suelos está definida por la FAO-UNESCO como un proceso de degradación química.

Como se ha indicado anteriormente, además de afectar al propio suelo, la acumulación de metales pesados puede afectar a otros componentes o sistemas del medio ambiente. Según lo expuesto por numerosos autores (p.ej., Alloway 1995, Adriano 2001, Kabata-Pendias & Mukherjee 2007), los metales pesados pueden pasar, por ejemplo, a las aguas subsuperficiales a través de procesos de lixiviado, contaminando los recursos hídricos subterráneos (acuíferos) de las zonas donde se produce una elevada acumulación de metales; o pueden llegar y contaminar zonas relativamente distantes del punto o foco de contaminación a través de la erosión y transporte de sedimentos con un elevado contenido metálico. Uno de los efectos más relevantes y significativos se produce en el sistema planta-suelo, debido a la fuerte y estrecha relación entre ambas entidades. La acumulación de metales pesados en el suelo es la principal vía de entrada de éstos en la cadena trófica. Dicha absorción y acumulación, y entrada en la cadena trófica, tiene consecuencias relevantes tanto a nivel de planta como en el resto de niveles tróficos (Rooney et al. 2006, Recatalá et al. 2010). Esto es especialmente significativo en zonas agrícolas, ya que la transferencia de metales pesados a los seres humanos puede producirse de manera directa.

Por un lado, a nivel de planta, la absorción de metales pesados genera problemas de fitotoxicidad. Así, superadas ciertas concentraciones umbrales, las plantas comienzan a manifestar síntomas de fitotoxicidad como, por ejemplo, clorosis (decoloración o amarilleamiento de las hojas debido a la falta de clorofila), reducción de la producción de biomasa, malformación de ciertos órganos como raíces y hojas, o la no producción de órganos reproductivos, los cuales pueden desembocar en la muerte de la planta si la concentración es muy elevada. En el caso concreto del Cu, el contenido normal en planta varía entre 5-30 mg de Cu/kg, dependiendo de la especie vegetal y sus requerimientos; la concentración tóxica varía entre 20 y 100 mg de Cu/kg; y el rango tolerable en cultivos está entre 5-20 mg de Cu/kg (Kabata-Pendias 2011).

En relación al análisis y estudio de la absorción de metales pesados, y por tanto de Cu, por parte de las plantas es importante tener en cuenta dos aspectos clave: si el elemento es o no un micronutriente y la tolerancia de la especie a los metales pesados. Por un lado, es necesario resaltar que los micronutrientes son elementos más fácilmente absorbidos y asimilados por plantas y cultivos, ya que éstos son reconocidos como necesarios, y su transporte desde la solución del suelo a la raíz y

su posterior circulación interna a través del xilema o floema es más sencilla y rápida que en los casos de metales tóxicos no esenciales, como por ejemplo en el caso del Pb o del Cd que, al ser elementos extraños, su absorción está más limitada. A diferencia de estos últimos, la entrada de micronutrientes no es limitada por la planta a través de los diferentes mecanismos de defensa de las plantas como son, por ejemplo, la exclusión en la absorción o el bloqueo por la unión a ácidos orgánicos excretados por la raíz (Shaw 1990, Yruela 2005). Por otro lado, la tolerancia de la especie a los metales pesados es también un aspecto importante. Diferentes plantas presentan diferentes estrategias de defensa/absorción que influyen en su nivel de tolerancia frente a los metales pesados. Baker & Walker (1990) definieron tres tipos de estrategias de tolerancia: la estrategia “excluder”, donde las plantas mantienen bajas las concentraciones de metales pesados en tallos y hojas, hasta que se alcanza una determinada concentración en suelo, a partir de la cual su absorción y transporte aumenta de manera considerable, generando problemas de toxicidad; la estrategia “indicator”, donde la absorción y transporte de los metales pesados en planta está muy regulada y controlada, de manera activa o pasiva, por la planta, y es un reflejo preciso de la concentración externa de estas sustancias tóxicas; y la estrategia “accumulator” donde las plantas acumulan activamente metales en sus tejidos y es capaz de crecer dentro de un gran rango de concentraciones de metal muy amplio en suelo. Esta última estrategia lleva asociados mecanismos y procesos fisiológicos muy específicos y especializados. Dentro de este último grupo, algunos autores (p. ej., Reeves & Baker 2000) diferencian entre acumuladores e hiperacumuladores, englobando este último grupo todas aquellas especies capaces de absorber y acumular grandes cantidades de metales pesados. Con respecto al Cu, numerosos acumuladores e hiperacumuladores corresponden a plantas silvestres como el *Thlaspi caerulescens*, *Agrostis capillaris* o la *Pistia stratiotes* (McCutcheon & Schnoor 2004). Sin embargo, ciertos cultivos de interés comercial también pueden acumular Cu, como la mostaza India (*Brassica juncea* L.) o el girasol (*Helianthus annuus*) (McCutcheon & Schnoor 2003). Algunos estudios recientes han comenzado a estudiar la absorción y acumulación de determinados cultivos hortícolas como la lechuga, el tomate o la berenjena (p. ej., Tambasco et al. 2000, Kachenko & Singh 2006, Rooney et al. 2006, Angelova et al. 2009, Recatalá et al. 2012, Sacristán et al. 2014).

Por otro lado, en referencia a niveles tróficos superiores, la bioacumulación (proceso de acumulación creciente de sustancias nocivas a medida que se avanza en el nivel trófico de la cadena alimenticia) es un proceso de gran relevancia. Ciertas especies de vegetales son consumidas por animales, los cuales bioacumulan los metales en el tejido graso. Esta bioacumulación puede desembocar en ciertos problemas de salud en el animal, aunque esto suele ser poco habitual. Sin embargo, el problema aumenta cuando estos animales son consumidos por los humanos y más aun cuando los humanos consumen ciertas especies vegetales directamente. Por lo tanto, es necesario establecer las concentraciones máximas permitidas en los diferentes productos de consumo humano y animal, ya que las plantas pueden alcanzar niveles no tóxicos para ellas pero con riesgo para la salud animal o humana.

La legislación Europea vigente (DOUE 2006) establece los niveles máximos permisibles de determinados contaminantes para ciertos productos de consumo humano. Dicha legislación define el nivel máximo permisible para los metales pesados considerados como tóxicos, es decir, Cd, Pb, Hg y estaño/hojalata, además de para una serie de pesticidas y compuestos orgánicos, en diferentes productos de consumo humano como carnes, pescados frutas y verduras. Sin embargo, no contempla los metales pesados considerados micronutrientes, a pesar de que éstos, al igual que los anteriores, resultan tóxicos si se supera una determinada concentración límite. Otras legislaciones, como por ejemplo la Australiana o la Internacional Codex, sí establecen las concentraciones máximas admisibles en los productos de consumo humano para algunos micronutrientes (Cu y Zn) (Codex 1998, McLaughlin et al. 2000). En el caso concreto del Cu, ambas legislaciones establecen una concentración máxima admisible de 10 mg de Cu/kg en producto fresco para frutas y verduras. En relación a este último aspecto, es importante señalar que muy probablemente estos contaminantes serán incluidos en las diferentes legislaciones específicas en los próximos años, puesto que ya han sido señalados por algunas instituciones como la Agencia Americana de Protección Ambiental (EPA) y la Agencia Europea de Medio Ambiente (EEA) como contaminantes que pueden alcanzar gran toxicidad en determinadas situaciones.

2.3.2 Protección del suelo: Evolución y desarrollo de Estándares de Calidad del suelo

Así pues, teniendo en cuenta el efecto y las consecuencias de la acumulación de metales en el suelo sobre el propio suelo, así como sobre otros componentes del medio ambiente, parece evidente la necesidad de proteger el suelo contra este proceso de degradación química.

En la década de los 80, diversos países europeos (p.ej., Holanda, Gran Bretaña) emprendieron distintas iniciativas para la protección del suelo, incluyendo a los suelos agrícolas (Alloway & Ayres 1993). Debido a la estrecha relación existente entre el suelo y las aguas subterráneas, y debido a los procesos de contaminación señalados anteriormente, la investigación de la contaminación del medio edáfico resultó ser una cuestión de primera necesidad, sobre todo en países con una gran dependencia de los recursos hídricos subterráneos, como Holanda (Vegter 1995, Ferguson 1999), sobre todo después de varias décadas de un agricultura intensiva promovida por la Política Agraria Común (PAC). Siguiendo la línea impulsada por estos países pioneros, en el año 1991 se publicó en el ámbito de la Unión Europea la Directiva 91/156/CEE, del Consejo de 18 de marzo, por la que se modificaba la Directiva 75/442/CEE relativa a los Residuos (DOCE 1991), con el objeto de establecer medidas medioambientales que permitieran una gestión adecuada de los residuos y minimizar así los impactos generados por éstos sobre el suelo.

En este contexto, y siguiendo la tendencia iniciada en los años 90, en el ámbito de la Unión Europea se realizó en el 2002 la Comunicación de la Comisión de las Comunidades Europeas denominada “Hacia una Estrategia Temática para la Protección del Suelo” (CCE 2002). El principal

objetivo de esta Comunicación era la creación de diferentes grupos de trabajo enfocados en el desarrollo de medidas medioambientales para evitar la degradación del suelo, principalmente en lo que respecta a la erosión, la pérdida de materia orgánica y la contaminación. En dicha Comunicación, el suelo agrícola se definía como un recurso inestimable y limitado, cuyo valor se debe a la labor desarrollada por el hombre durante décadas e incluso siglos, por lo que la degradación irreversible de este recurso supone destruir un bien preciado e hipotecar las oportunidades agrícolas de generaciones futuras (CCE 2002). Además, se planteaba la necesidad de establecer políticas de protección del suelo, poniendo una especial atención al uso sostenible del mismo y a la gestión de los suelos agrícolas para garantizar su valor agronómico. En el año 2004, como resultado de esta comunicación, se publicó un informe realizado por el grupo de trabajo de contaminación y manejo del suelo centrado en el estudio de la contaminación (Van Camp et al. 2004), el cual estableció una serie de recomendaciones encaminadas a la creación de sistemas de vigilancia que proporcionasen información acerca del contenido de metales pesados, especialmente As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb y Zn, con el fin de preservar las funciones básicas del suelo.

Posteriormente, en el año 2006, una vez analizados los resultados derivados de la Comunicación Europea del año 2002 (CCE 2002), se realizó una segunda Comunicación, la cual se denominó “Estrategia temática para la protección del suelo” (CCE 2006). En dicha comunicación, la Comunidad Europea establece que, gracias al impulso de Comunicación del año 2002, la conciencia sobre la importancia del suelo para el adecuado funcionamiento del medio ambiente aumentó en Europa, desarrollándose en algunos Estados miembros legislación específica de protección del suelo, como es el caso de España. Sin embargo, de acuerdo con lo expuesto en la Comunicación de 2006, estas nuevas legislaciones no suelen referirse más que a una amenaza específica, como puede ser la contaminación del suelo, y no siempre ofrecen un marco coherente de protección. Es precisamente en esta dirección, en la de ofrecer un marco general coherente y adecuado a las particularidades del territorio europeo, en la cual se trabaja actualmente, y pretende derivar en el establecimiento de una Directiva marco, la cual continúa en fase de consulta.

En España, la preocupación por la contaminación del suelo y sus consecuencias se puso principalmente de manifiesto en el Plan Nacional de Recuperación de Suelos Contaminados para el período 1995-2005 (BOE 1995). Este Plan contemplaba la necesidad urgente de actuación en 274 sitios contaminados de los 4532 sitios que fueron inicialmente inventariados siguiendo la metodología holandesa (Callaba 1998). En el año 1998, se promulgó a nivel nacional la Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos (BOE 1998), con el fin de trasponer la Directiva Europea anteriormente mencionada a la legislación española, en la que se establecía la necesidad de desarrollar criterios propios que facilitasen la gestión de los suelos contaminados en España.

En este contexto, a nivel nacional, en el año 2005 se publicó el Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se estableció la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados (BOE 2005), de tal forma que se

obligó a la identificación y recuperación de los suelos contaminados. Este Real Decreto es el primer marco normativo que estableció criterios para la declaración de suelos contaminados. Sin embargo, a pesar de la importancia de los metales pesados como contaminantes, este Real Decreto no estableció valores de estándares concretos/específicos basados en el análisis de la dinámica de los metales en el suelo para la identificación y caracterización de suelos contaminados por estos elementos.¹ Este hecho se debe, entre otras razones, a la complejidad del análisis de la influencia de las propiedades del suelo sobre dicha dinámica y a que los metales pesados pueden encontrarse presentes en los suelos de forma natural, por lo que el establecimiento de los estándares de calidad debe realizarse a escala regional, en función de la naturaleza del suelo y el uso del mismo (López de Velasco 1996, Callaba & Chacón 2002). No obstante, el Real Decreto sí establece procedimientos para la derivación de dichos estándares, aunque no basados o contemplando la dinámica del metal en el suelo, así como criterios para su aplicación. Así pues, dicho Real Decreto establece cómo definir los denominados Niveles Genéricos de Referencia (NGR) y también que un suelo debe considerarse como potencialmente contaminado cuando la concentración determinada para el metal se encuentra entre el NGR y cien veces ese valor, o contaminado cuando se determina en él una concentración igual o superior a cien veces el valor de referencia para ese metal pesado.

En relación con esto, Sánchez et al. (2004) y Micó et al. (2007) establecieron los niveles genéricos de referencia para una serie de metales pesados para la Comunidad Valenciana, una región representativa de Región Mediterránea Europea. Los valores establecidos por estos autores son similares a los establecidos en otras áreas mediterráneas, tanto españolas (Pérez et al. 2000, 2002) como europeas (Facchinelli et al. 2001, Mitsios & Golia 2005), lo que añade valor y relevancia a los resultados obtenidos.

El seguimiento del contenido total de metales pesados en los suelos agrícolas tiene gran importancia, ya que permite caracterizar la situación actual del suelo y prever el riesgo potencial que supondría la presencia de elevadas concentraciones de metales, si se produjera una variación de las propiedades y características edáficas (p. ej., pH, condiciones redox) (Alloway 1990). Además, el carácter tóxico y acumulativo de estos elementos obliga al estudio de su contenido, con el fin de evitar la afectación de las aguas subterráneas, de los cultivos y, en último término, de la salud humana (Nriagu 1990, Ross 1994a, Cala 1998, Kabata-Pendias 2011). Por otro lado, el desarrollo sostenible de los sistemas agrarios, a través de la prevención de la acumulación de metales pesados, permitiría asegurar la productividad del suelo y la calidad de los productos generados a partir del mismo (Moolenaar & Beltrami 1998).

¹ Aunque este Real Decreto sí que contempla la definición de estándares de calidad para la identificación y caracterización de suelos potencialmente contaminados o contaminados a través de procedimientos basados en ensayos ecotoxicológicos, no contempla para ello la dinámica del metal en el suelo en función de las propiedades edáficas. La presente Tesis Doctoral pretende establecer/proponer estándares a través de procedimientos en los que sí se considere este aspecto de la dinámica del metal en suelo, que es de gran relevancia para regular su acumulación en el suelo y transferencia a otros componentes medioambientales.

2.3.2.1 Estándares de calidad

En este marco de caracterización y protección de los suelos, diferentes países han adoptado diferentes estrategias y procedimientos. En Europa, la caracterización de los suelos contaminados se ha realizado, básicamente, desde dos perspectivas diferentes: (1) estándares de calidad del suelo (2) análisis de riesgos.

El análisis de riesgos ofrece indudablemente una perspectiva más realista que los estándares de calidad, ya que la caracterización de los suelos contaminados se hace considerando algunas propiedades edáficas que afectan a la movilidad de los contaminantes y las rutas que éstos siguen hasta alcanzar los diferentes elementos del ecosistema (plantas, animales y humanos) (USEPA 1989). Así pues, esta perspectiva permite tener en cuenta las particularidades de cada caso y de cada área contaminada. Sin embargo, también presenta una serie de importantes inconvenientes. Para poder llevar a cabo un análisis de riesgos adecuado, se requiere una cantidad de información del suelo y un nivel de detalle no siempre disponible, y cuya elaboración, en el caso de no disponer de ella, conllevaría un importante gasto no asumible por todos los países (Page 1997). Por otro lado, los modelos predictivos en relación a las rutas de transporte y movimiento son, en ocasiones, muy complejos y dependen de algunas características ambientales muy cambiantes en el tiempo (viento, lluvia, temperatura) (Recatalá et al. 2001). Por todo ello, algunos países han preferido definir diferentes estándares de calidad del suelo, simplificando así el proceso de identificación y caracterización de suelos contaminados.

Los estándares de calidad del suelo son estimaciones numéricas genéricas de los niveles de contaminación en suelo, que indican un riesgo para la salud humana y el medio ambiente cuando éstas son excedidas. La caracterización de suelos contaminados utilizando estándares de calidad se basa en la comparación de la concentración actual de metal en dicho suelo con el nivel definido por dicho estándar. La principal ventaja de este tipo de caracterización es que ésta se puede llevar a cabo de manera rápida y con un coste mucho inferior al análisis de riesgos.

Dentro de esta perspectiva, se pueden definir dos aproximaciones bien diferenciadas: un conjunto de países que definen un único estándar, el cual aplican para determinar qué suelo debe ser controlado e intervenido para su descontaminación; y otro conjunto que define dos o tres niveles, uno de vigilancia y otro de intervención (*trigger e intervention level*, respectivamente). La superación del primero de ellos conlleva la posible aparición de procesos de contaminación debido al efecto acumulativo y se recomienda un control, vigilancia y seguimiento de dicho suelo; mientras que la superación del segundo nivel implica directamente la ejecución de acciones de recuperación y remediación del suelo. En el caso de aplicar tres niveles (p. ej., Holanda hace algunos años) el primer nivel se utilizaba para distinguir un suelo no contaminado de uno potencialmente contaminado que habría que vigilar o controlar, o incluso aplicar análisis de riesgos para determinar sus implicaciones

medioambientales.

Estos niveles pueden definirse y aplicarse en los casos en los que se define al suelo tanto como un ente multifuncional, como en aquellos casos en los que se diferencian los suelos en función de su uso potencial.

La Tabla 2.4 presenta ejemplos de valores únicos aplicados en algunos países de Unión Europea.

Tabla 2.4 Estándares de calidad (mg/kg en peso seco) para Alemania, Noruega y Reino Unido (Alloway & Ayres 1993, Schäfer 1996, Umweltdaten 1999).

Metal	Alemania	Noruega	Reino Unido
As	50	20	10
Cd	20	1	3
Cr	400	100	25
Hg	20	1	1
Pb	400	50	500

A diferencia de estos países, como se ha comentado anteriormente, España es uno de los países que define dos tipos de niveles: el de vigilancia/control, a partir del cual se debe llevar a cabo un análisis de riesgos, y un control y seguimiento del suelo; y el de intervención, a partir del cual es necesario llevar a cabo acciones de restauración.

Sin embargo, la definición de estándares de calidad también presenta algunas desventajas. En primer lugar, no existe un consenso en Europa sobre cuál es el procedimiento más adecuado para definir y establecer los estándares de calidad. En segundo lugar, tampoco existe un reglamento/protocolo sobre cómo deben realizarse los muestreos de suelo para la caracterización de éstos, ni cuáles son las técnicas analíticas más adecuadas para determinar el contenido de metales pesados en los suelos. Por último, la fiabilidad de dichos niveles se pone en entredicho cuando se considera la complejidad de los suelos y la influencia de determinadas propiedades edáficas sobre la dinámica de los metales en el suelo, como ya se ha explicado con detalle anteriormente.

Con respecto a este último punto, algunos países han intentado considerar la influencia de las características edáficas a la hora de definir estándares de calidad adecuados. Un ejemplo son Bélgica y Holanda, los cuales expresaron el nivel de vigilancia y el nivel de intervención en forma de funciones matemáticas donde se deben tener en cuenta algunas características edáficas, como el contenido en materia orgánica, el contenido en arcilla o el pH. Sin embargo, también dan valores únicos y específicos basándose en lo que consideran como un suelo de referencia. Por ejemplo, en el caso de Holanda, su legislación define como un suelo de referencia aquel que presenta un 25% de contenido en arcilla y un 10 % de contenido en materia orgánica. A pesar de incluir estas propiedades edáficas, estas aproximaciones no son suficientes ya que la dinámica de los metales y/o contaminantes

en el suelo no sólo está influenciada únicamente por estas dos propiedades, puesto que el tipo de planta y sus estrategias de defensa también puede determinar la influencia de un metal pesado u otro contaminante.

En este sentido, es importante tener en cuenta que el conocimiento de los impactos de los metales pesados sobre el medio ambiente es relativamente amplio. Sin embargo, no hay suficientes datos como para establecer valores definitivos que permitan desarrollar un criterio básico para la protección del suelo contra los efectos a largo plazo de la contaminación de suelos, especialmente los agrícolas.

A lo hora de definir estos valores, es necesario tener en cuenta los diferentes aspectos que se han ido destacando hasta el momento. Para establecer estándares de calidad del suelo adecuados es importante tener en cuenta el tipo de suelo y sus características y propiedades, así como el tipo de planta o cultivo, ya que según hemos visto, el efecto de los metales sobre la planta, y su acumulación y posterior avance en la cadena trófica van a depender de su tolerancia con respecto a los metales. Además, estos estándares se deben definir siguiendo un diseño experimental y una metodología estándar y válida para todos los ámbitos de manera que los resultados sean comparables y se puedan extrapolar a otras áreas de características similares.

Es por todo esto que surge la necesidad de realizar estudios más detallados y adecuados, que contemplen la influencia de los diferentes factores mencionados anteriormente y que permitan establecer valores o estándares más realistas y aplicables en cada una de las zonas/regiones geográficas descritas a nivel europeo e incluso mundial, incluida la región Mediterránea, que es la considerada en este estudio. Es en este contexto, en el que se encuadra esta Tesis Doctoral, la cual pretende contribuir a incrementar el conocimiento en este campo, centrándose en una región con elevado interés agrícola y unos cultivos de gran relevancia, para establecer bases científicas adecuadas para la protección de los suelos, uno de los objetivos principales de la UE y España, según se ha indicado y descrito en apartados anteriores. Además, ante posibles episodios de contaminación aguda, es aconsejable explorar las diferentes estrategias de manejo del suelo que permitirían mejorar la calidad de éste. Asimismo, el estudio del contenido de metales pesados en los cultivos hortícolas permite evaluar la calidad de una parte de los alimentos consumidos por los seres humanos, que pueden incrementar los niveles de estos elementos en el cuerpo humano con las consiguientes posibles repercusiones para la salud.

2.4 Técnicas para la determinación de metales pesados: Fluorescencia de rayos X (XRF)

Como en el caso de la mayoría de procedimientos de análisis químico, la determinación del contenido en metales pesados y otros compuestos metálicos en diferentes muestras ambientales (suelos, sedimentos, aguas, muestras vegetales, etc.) ha experimentado una evolución significativa. Diferentes técnicas de análisis y determinación se han ido sucediendo en el tiempo, a medida que cada

una de ellas iba mejorando la calidad de los resultados generados, aumentando su precisión, exactitud y reproducibilidad. Actualmente, la mayoría de las técnicas de determinación de metales pesados y compuestos metálicos se basan en métodos espectrofotométricos, aunque recientemente han emergido otros métodos no-espectrofotométricos.

En general, la determinación de metales pesados comprende tres acciones consecutivas bien diferenciadas. En primer lugar, se realiza el muestreo del área que se desea analizar; en segundo lugar, se lleva a cabo un pretratamiento de las muestras, el cual varía en función del tipo de muestra; y finalmente se determina el contenido metálico de cada una de ellas. En el caso de suelos y muestras vegetales, que son el tipo de muestras que se han considerado y analizado en la presente Tesis Doctoral, el pretratamiento consiste, en primer lugar, en un tamizado y pulverizado en el caso de los suelos, y únicamente en un triturado en el caso de las muestras orgánicas; seguido de una digestión ácida (Reidinger et al 2012). La digestión debe ser completa, de manera que sea posible determinar el contenido total de metal en la muestra. Para ello, la combinación de ácidos utilizados en las digestiones depende de la naturaleza de la muestra, aunque suele incluir, en mayor o menor grado, al menos dos de los siguientes ácidos: ácido nítrico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y/o ácido fluorhídrico. Por otro lado, la digestión puede ser abierta o asistida por microondas, dependiendo del material de laboratorio del que se disponga y del procedimiento seleccionado como más adecuado para la comparación de resultados. Una vez realizada la digestión, la determinación del contenido metálico de la muestra se realiza a través de la técnica analítica más adecuada. En ocasiones, la digestión no es completa por lo que es necesario filtrar el digerido para eliminar pequeñas partículas en suspensión que provoquen interferencias o dificulten la posterior medida espectrofotométrica. El filtrado es posteriormente analizado para determinar el contenido en metales.

Según se ha citado anteriormente, la mayoría de las técnicas analíticas de metales pesados se basan en métodos espectrofotométricos. Entre estas, las más utilizadas son la espectrometría de absorción atómica (AAS, en inglés) (p.ej. Hauptkorn et al. 2001, Micó et al. 2007, Recatalá et al. 2010), la espectrometría atómica de emisión con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES, en inglés) (p. ej. Li et al. 1995, Li et al. 2001, Moor et al. 2001) y la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, en inglés) (McBride & Spiers 2001, Moor et al. 2001). La espectrometría de absorción atómica (AAS) mide la concentración de un analito, en este caso el metal, a través de determinación de la radiación óptica absorbida por los átomos libres. El flujo de radiación con y sin muestra es medido, y la absorbancia se convierte a una concentración a través de aplicación de la ley de Beer-Lambert. En esta técnica, la muestra es atomizada al pasar por una llama, donde la energía térmica excita los átomos a estados electrónicos que emiten luz al volver a su estado original. La longitud de onda y la intensidad proporcionan información sobre la identidad del elemento y su cantidad en la muestra. Por otro lado, la espectrometría atómica de emisión con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) y la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) se basan en el mismo principio, es decir, en la liberación de energía por parte del

átomo excitado y en la longitud de onda medida. Sin embargo, en este caso, los átomos son excitados mediante un plasma. La exactitud y precisión de las determinaciones realizadas por estas técnicas son muy buenas y presentan unos límites de detección bajos, especialmente la ICP-AES y la ICP-MS, permitiendo determinar concentraciones muy bajas en muestra.

Sin embargo, su utilización presenta algunas desventajas importantes. El pretratamiento de las muestras suele ser costoso, tanto en tiempo como en dinero, debido a la utilización de diferentes reactivos y de instrumentación compleja y cara (p. ej. Microondas). Además, este pretratamiento también supone una destrucción de la muestra, lo que limita su posterior utilización para otro tipo de análisis. En relación con esto, para determinadas matrices, no se produce una destrucción total de la muestra, haciendo que la determinación del Cu de la muestra no sea del total sino del denominado “pseudototal”. Por último, el manejo de ácidos y la digestión asistida por microondas son dos pasos altamente peligrosos, que pueden provocar grandes daños si no son realizados con extremada precaución.

Así pues, ante esto, surgen nuevas técnicas que minimizan los inconvenientes arriba citados. De entre ellas, destaca la Fluorescencia de Rayos-X, técnica analítica ampliamente conocida y que es objeto de estudio y aplicación en esta Tesis Doctoral debido los avances acontecidos en los últimos años, sobre todo en el desarrollo de instrumentos portátiles.

2.4.1 Fluorescencia de Rayos-X: origen, evolución y fundamentos

La fluorescencia de rayos X es una técnica con aplicaciones en numerosas áreas (minería, industria alimentaria, industria química, petroquímica, etc.), aunque se utiliza principalmente para el análisis no destructivo de elementos mayores, menores y traza en rocas, suelos y sedimentos.

El origen de esta técnica se sitúa en 1895, cuando el físico alemán Wilhelm Conrad Roentgen descubre accidentalmente estos rayos mientras estudiaba los rayos de cátodo de alto voltaje. Sin embargo, no es hasta 1913 cuando se identifica el elevado potencial de esta técnica, cuando Henry Moseley establece una relación entre la longitud de onda característica de un fotón de rayos X y el número atómico del elemento excitado. En 1925 se utilizaron por primera vez los rayos X para excitar una muestra, aunque la fluorescencia de rayos X no comenzó a ser practicada hasta 1950, cuando se comercializó el primer espectrómetro. Estos primeros espectrómetros se basaban en la longitud de onda dispersiva de la fluorescencia (WDXRF - *wavelength dispersive x-ray fluorescence*, en inglés) y medían la longitud de onda de cada elemento, realizando esta medida de elemento en elemento. Posteriormente, en los años 60, se desarrollaron los espectrómetros de energía dispersiva (EDXRF - *energy dispersive x-ray fluorescence*, en inglés), los cuales permitían analizar todos los elementos de una muestra al mismo tiempo y ofrecían una mejor energía de resolución. Desde entonces, la técnica ha experimentado un espectacular desarrollo como un método rápido y robusto para la evaluación del contenido en diferentes elementos de una gran variedad de matrices. De hecho, en los últimos años, se

han empezado a fabricar y utilizar espectrómetros de fluorescencia de rayos X portátiles, cuya validez es objeto de estudio en la actualidad (UIS 2014).

En la técnica de Fluorescencia de Rayos X de energía dispersiva, o EDXRF (*Energy Dispersive X Ray Fluorescence*), las muestras son irradiadas con fotones de una energía comprendida normalmente entre 6 y 120 keV, que pueden tener su origen en un tubo de rayos X, capaz de proporcionar intensidades y energías diferentes con una emisión policromática continua, o bien en la emisión espontánea de ciertos radionúclidos. La radiación, al incidir sobre la muestra, provoca ionizaciones en los átomos de la misma, con el consiguiente relleno de vacantes acompañado de la emisión de rayos X. Estos rayos X son característicos de cada elemento, de manera que su detección permite la identificación de todos los elementos que componen la muestra (CNA 2014). La figura 2.6 muestra un esquema del proceso a nivel atómico.

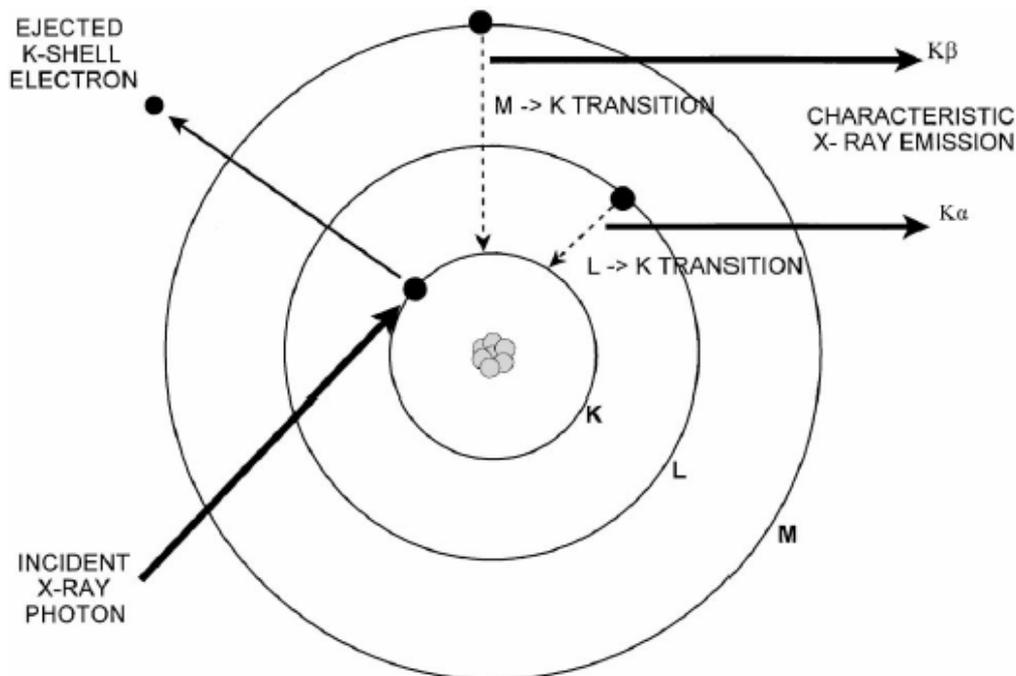


Figura 2.6. Mecanismo de fluorescencia de rayos X de un átomo (Kalnicky & Singhvi 2001)

Las principales ventajas de esta técnica son, en primer lugar, que elimina algunos procesos de pretratamiento de las muestras necesarios en las técnicas convencionales (Cozzolino & Moron 2004), reduciendo así el tiempo de análisis, la complejidad y la peligrosidad de las técnicas tradicionales. En segundo lugar, la cantidad de residuos generados con esta técnica es nula, ya que no se hace necesario el pretratamiento de las muestras con reactivos, reduciendo así el impacto sobre el medio ambiente y el coste de los análisis. En tercer lugar, se trata de una técnica no destructiva, es decir, que mantiene la integridad y complejidad de la muestra, debido a la ausencia de muchos de los procesos de

pretratamiento. Esto permite repetir los análisis sobre la muestra en caso de que se produzca algún error en el procedimiento de determinación. Por último, la fluorescencia de rayos X permite realizar un análisis multielemental de la muestra en un único evento de análisis puesto que, como ya se ha indicado anteriormente, cada elemento emite una energía específica.

Sin embargo, la fluorescencia de rayos X también presenta algunas limitaciones. Para obtener una mejor determinación, se sigue requiriendo un mínimo pretratamiento de la muestra, el cual suele incluir un secado de la muestra, ya que la humedad en la muestra genera problemas de dispersión difíciles de compensar en el posterior tratamiento de las medidas/señales, seguido de un triturado/pulverizado y homogenización de ésta, la cual evita los problemas físicos derivados de la matriz. Además, a nivel analítico, la precisión y exactitud de esta técnica es ligeramente más baja que las descritas hasta ahora y los límites de detección un poco más elevados (Margui et al. 2008).

Estas limitaciones se ven acentuadas cuando se aplican los instrumentos de fluorescencia de rayos X portátiles (P-XRF o FP-XRF), instrumentación que ha experimentado un gran avance en la última década. Por ello, en la utilización de esta técnica portátil, es necesario minimizar dichos inconvenientes. Para ello, es clave tener muy en cuenta los siguientes aspectos (Kalnicky & Singhvi 2001, USEPA 2007a):

- Muestreo y análisis

En referencia al muestreo, es necesario tener en cuenta una serie de requisitos y características y/o propiedades que una muestra debe cumplir/presentar. En primer lugar, y como es el caso para toda técnica analítica, la muestra recogida debe ser representativa de nuestra zona o punto de estudio, de manera que refleje de manera exacta la concentración de esa zona o punto de estudio. De manera más particular para esta técnica, y para que las medidas realizadas sean adecuadas y puedan ser comparables, es necesario tener en cuenta también algunos aspectos físicos de la muestra como es la eliminación de la humedad de la misma; la uniformidad de ésta, en relación al tamaño de partícula y lo plano de la superficie donde incide el rayo; y la colocación de la muestra, en relación a la distancia y al ángulo de incidencia. El mantenimiento constante de estas características garantiza la reproducibilidad y comparabilidad de las muestras, a la vez que minimizan las posibles interferencias generadas a nivel físico.

- Precisión

Es importante tener en cuenta y controlar la precisión de la medida realizada por el instrumento de FP-XRF. Esta se determina realizando un mínimo de 8 repeticiones no consecutivas de una muestra cuya concentración del elemento/s a medir sea cercana a una muestra con una concentración de acción o nivel de referencia, o a través de la medida no consecutiva de muestras con una concentración baja, media y alta del analito que se pretende

determinar. Los resultados de dichas medidas son comparados, la media extraída y la desviación estándar y el porcentaje de desviación estándar calculados (% RSD). Para los instrumentos de FP-XRF, se considera adecuada y aceptable una variación del % RSD de un ± 20 (Kalnicky & Singhvi 2001, USEPA 2007a). La comprobación de la precisión se puede realizar con estándares de calidad específica para un área, cuya concentración de los diferentes elementos haya sido previamente determinada mediante métodos oficiales de laboratorio, o con diferentes materiales de referencia certificados (MRC).

- Exactitud

Este aspecto hace referencia a la estabilidad del instrumento y su capacidad para mantener su rendimiento en el tiempo. En concreto, se recomiendan realizar medidas con blancos y patrones externos/materiales de referencia al principio de cada ejercicio/sesión de medida y cada 20 muestras. Esto permite detectar posibles transferencias o contaminaciones y controlar la estabilidad de la medida.

- Comparabilidad

Para determinar la calidad de los datos de campo generados por el instrumento de FPXRF es necesario realizar también la determinación de los elementos implicados mediante métodos de laboratorio certificados, es decir, a través de digestiones ácidas. De esta manera se pueden comparar los resultados y establecer la calidad de aquéllos obtenidos con el FPXRF. En este apartado, es necesario tener en cuenta el tipo de matriz de la muestra y el método de digestión seleccionado ya que, de acuerdo con Kean (1993), existe una importante variación en la recuperación de metales de diferentes muestras en función del método de la Environmental Protection Agency (EPA) seleccionado.

- Replicas de método

La introducción de replicas en el conjunto de muestra a analizar permite controlar e identificar errores en el proceso de preparación de la muestra; controlar la heterogeneidad de la matriz de la muestra; y evaluar la precisión del análisis.

- Muestras de confirmación

Se trata de confirmar los datos obtenidos mediante el análisis de un segundo subconjunto de muestras, recolectadas de manera independiente al muestreo general en el área de estudio. Durante el muestreo, se deben obtener muestras independientes, es decir, que no forman parte del bloque general de muestras que se pretende analizar, para utilizarlas como muestras de confirmación. El número de muestras de confirmación que se deben recolectar es de como

mínimo un 10 % del número de muestras totales y deben cubrir el rango de concentraciones que se esperan determinar en el área de estudio. Previo al análisis mediante el FPXRF, estas muestras deben haber sido analizadas mediante métodos estándar de laboratorio (digestiones ácidas).

Otras limitaciones de esta técnica están asociadas a los efectos de matriz. Según han señalado algunos autores (Kalniky and Singhvi 2001, Markowicz 2011) y organizaciones internacionales (USEPA 2007a), las medidas con XRF están influenciadas por varias características/condiciones de la matriz, siendo los efectos químicos de la matriz uno de los más relevantes. Esto significa que el tipo de matriz y su composición influyen en la medida y que no todos los métodos de cuantificación son adecuados para todo tipo de muestras. Normalmente, la cuantificación de muestras “gruesas” (muestras de densidad baja) se realiza utilizando métodos basados en la radiación primaria dispersa, el método de parámetros fundamentales y el método de coeficientes empíricos y teóricos influyentes (Markowicz 2011), que son métodos que suponen un procesado de datos complejo y que se ven afectados significativamente por la matriz (Markowicz 2011). Este aspecto es de gran relevancia a la hora de llevar a cabo el análisis integral de diferentes áreas contaminadas.

2.4.2 Aplicación de la Fluorescencia de Rayos-X portátil (FP-XRF) a suelos y plantas

Las áreas contaminadas, tanto agrícolas como no agrícolas, son zonas consideradas como peligrosas, especialmente cuando se considera el riesgo para la salud asociado al consumo de cultivos, plantas y productos derivados de ellas. Por ello, resulta imprescindible definir y acotar estas zonas y realizar un análisis integral de ellas, contemplando tanto muestras de suelo como de plantas.

Normalmente, las áreas contaminadas por metales pesados (p. ej., minas, suelos industriales, suelos agrícolas) presentan una gran variación en la distribución y la concentración de metales pesados (Hernández & Pastor 2008). Esto significa que un correcto análisis del área supone el manejo de una gran cantidad de muestras de suelo. Además, el análisis del contenido de las diferentes plantas para la identificación de problemas de toxicidad y evaluar si cumplen los estándares, también requiere el manejo de una gran cantidad de muestras orgánicas. Por ello, surge la necesidad de utilizar una técnica analítica rápida y precisa que permite llevar a cabo la evaluación de las áreas contaminadas y determinar su extensión; y que sea adecuada para analizar los diferentes tipos de matrices presentes en estas áreas.

Según se ha explicado anteriormente, los métodos y técnicas tradicionales para evaluar la contaminación de los suelos y la acumulación de metales pesados en plantas se basan en digestiones ácidas (Masson et al. 2007) seguidas de un análisis espectrométrico de la solución (Hauptkorn et al. 2001, Sastre et al. 2002, Nematy et al. 2010). Por tanto, estas técnicas suelen ser lentas, destructivas, peligrosas y caras. Así pues, para poder llevar a cabo un análisis rápido y preciso de las áreas

contaminadas, es necesario el desarrollo de nuevas técnicas que reduzcan el tiempo de análisis, los costes y el tratamiento de la muestra.

A pesar del estado prematuro o incipiente de esta técnica en la determinación del contenido metálico en determinados tipos de muestras, la comunidad científica ha aceptado la fluorescencia de rayos X portátil (P-XRF o FP-XRF) como una metodología adecuada para analizar una gran variedad de materiales peligrosos (p.ej., Swift 1995, Fluk et al. 1994).

Con respecto a muestras ambientales, la FP-XRF se utiliza principalmente para llevar a cabo el análisis de suelos y sedimentos (Radu & Diamond 2009, Weindorf et al. 2011), ya que permite una rápida determinación de las muestras con un bajo coste (Kalnicky & Singhvi 2001). Además, a pesar de que los límites de detección del FPXRF son más altos que algunos métodos analíticos de laboratorio, éstos son adecuados para llevar a cabo una evaluación del estado de un suelo, ya que, en la mayoría de casos, se encuentran por debajo de las concentraciones establecidas en los estándares de calidad del suelo o por debajo de los niveles de intervención citados en el apartado 2.3.2. De hecho, la Agencia Americana para la Protección del Medio Ambiente (USEPA) desarrolló en 2007 un protocolo para la aplicación de esta técnica para la determinación elemental de muestras de suelo y sedimento (USEPA 2007a). Es, por tanto, una técnica muy adecuada y con un elevado potencial para llevar a cabo la evaluación y seguimiento de suelos/áreas contaminados por metales pesados, debido a su bajo coste y a su rapidez, exactitud y precisión en el análisis.

Sin embargo, su aplicación no está tan extendida en otro tipo de muestras como son las muestras ambientales vegetales, donde sólo algunos trabajos al respecto han sido recientemente publicados (p. ej., Reidinger et al. 2012, Gutiérrez-Ginés et al. 2013). La mayoría de ellos estudia las diferentes posibilidades de la técnica, analizando tanto el pretratamiento de la muestra como la influencia de las diferentes características físicas de ésta sobre el resultado final. Se está investigando, por tanto, cuales son las condiciones específicas de las muestras que permiten una medida exacta y precisa del contenido metálico de ésta.

El estudio y perfeccionamiento de esta técnica resulta clave en el campo de la contaminación ambiental, ya que la determinación elemental de diferentes tipos de muestras ambientales permitirá realizar un análisis rápido e integral de zonas afectadas por procesos de contaminación, y así poder establecer el tratamiento más eficaz para abordar el problema. Esto es especialmente significativo para la evaluación de los suelos/áreas agrícolas, ya que la utilización de esta técnica permitiría realizar *in situ* un análisis integral de las áreas contaminadas, permitiendo evaluar, por un lado, el estado y la calidad de los suelos, y por otro, el cumplimiento de los estándares de calidad sanitarios en referencia a los cultivos presentes en las diferentes áreas.

2.5 Estrategias de manejo de suelos contaminados

Una vez detectados y caracterizados los suelos contaminados de una zona (tanto por metales como por otros contaminantes), surge la necesidad de establecer diferentes acciones para recuperar y/o utilizar dichos suelos, permitiendo así que estos desempeñen sus funciones potenciales e incluso en ocasiones que vuelvan a su estado inicial, recuperando así su calidad.

Esto se desarrolla a través de diferentes técnicas o procesos de remediación del suelo, las cuales se refieren a todas aquellas prácticas que permiten eliminar o estabilizar los contaminantes del suelo, o convertirlos a compuestos menos móviles o inertes (Kabata-Pendias 2011), es decir, menos biodisponibles. Estas prácticas/acciones pueden ser desarrolladas tanto *in situ* como *ex situ*. La selección del método más adecuado depende, generalmente, de la naturaleza del contaminante, del tipo de suelo y de las características de la zona contaminada. A su vez, también es importante considerar el coste de ejecución y la legislación vigente, ya que ambos aspectos también pueden condicionar la selección del método/práctica más adecuada. De acuerdo con Kabata-Pendias (2011) las prácticas de remediación de suelo contaminados, tanto *in situ* como *ex situ*, se pueden clasificar en (i) físicas, (ii) químicas, (iii) biológicas y (iv) termo/eléctricas. Las principales técnicas son:

1. Lixiviado/ lavado de suelos: se basa en añadir grandes cantidades de agua o agua y un surfactante para eliminar los metales pesados y otros contaminantes. No es un método muy utilizado ya que requiere grandes cantidades de agua y tiene un coste muy elevado.
2. Solidificación/estabilización/inmovilización: Diferentes enmiendas con materiales con una alta capacidad de retención de contaminantes se añaden al suelo para la captación y retención de contaminantes metálicos.
3. Biodegradación: los compuestos metálicos presentes en el suelo son degradados por diferentes microorganismos y posteriormente los elementos metálicos son lavados del suelo.
4. Vitrificación: los contaminantes se inmovilizan a través de una corriente eléctrica. Se trata de una técnica extremadamente costosa.
5. Bloqueo: se trata de bloquear la migración hacia abajo de metales y otros contaminantes a través de la instalación de barreras físicas (p. ej., capa de arcilla, línea de plástico).
6. Encapsulamiento: las zonas afectadas por contaminación se ocluyen de manera física, evitando así la percolación de metales pesados o el arrastre por acción del viento. Se trata de una técnica muy cara.
7. Extracción: extracción química o térmica de los contaminantes. Es una técnica extremadamente costosa.
8. Excavación: incluye procesos de excavación y traslado de los suelos contaminados a zonas de vertido especiales.

9. Coprecipitación con barras de acero: las barras de acero se insertan en el suelo y éstas inmovilizan la mayoría de metales pesados debido a la presencia de óxidos de hierro en ellas.
10. Reacciones de oxidación-reducción: Destrucción química de los contaminantes por oxidación o reducción, haciendo uso de diferentes reactivos oxidantes (ej. Permanganato, ozono, cloro, etc.) o reductores (ej. sulfuro de calcio, sulfato ferroso, etc.).
11. Fitorremediación: Se trata de la utilización de plantas para extraer o inmovilizar los metales pesados de suelos contaminados.

Muchas de estas técnicas presentan una serie de desventajas que hacen que en muchas ocasiones no puedan utilizarse y que presenten una baja aceptación social. La mayoría de ellas tienen un elevado coste de ejecución y muchas comportan una importante alteración de las propiedades del suelo, e incluso la destrucción total o parcial de éste. Además, suelen suponer un elevado coste de energía y de logística. La única técnica que no presenta estas desventajas y que, por tanto, es la técnica cada vez más utilizada y de mayor aceptación social es la fitorremediación.

La fitorremediación se puede definir como el uso de las plantas y los microorganismos asociados para eliminar los contaminantes del medio ambiente. Esta técnica se aplica para la eliminación de contaminantes tanto inorgánicos como orgánicos, y en sustratos tanto sólidos como líquidos. En ciertos casos, puede ser utilizada también para la depuración de ‘sustratos’ gaseosos.

Las principales ventajas de esta técnica son: se realiza *in situ*, utilizando la planta como bomba extractora o estabilizadora, y por tanto presenta un bajo coste y no tiene dependencia energética de ningún tipo; es un método que permite actuar sobre grandes extensiones; y además cuenta con una gran aceptación social, como se ha indicado anteriormente. Además, es importante tener en cuenta que ciertos procesos de degradación ocurren más rápidamente en plantas que en microorganismos, por lo que esta técnica puede ser la más adecuada en determinadas ocasiones (Kabata-Pendias 2011).

Sin embargo, esta técnica tiene también ciertas limitaciones. La remediación queda limitada a la profundidad de penetración de las raíces o a aguas poco profundas y está muy condicionada por las condiciones climáticas; la fitotoxicidad es un factor limitante en áreas fuertemente contaminadas; y el tiempo del proceso suele ser prolongado, dependiendo del ciclo vital de la planta y de su capacidad remediadora. Además, la biodisponibilidad de los compuestos o metales está fuertemente influenciada por las propiedades del suelo, limitando en ocasiones su captación y muchos de los contaminantes, sobre todo los metales pesados, tienen consecuencias negativas sobre la cadena trófica.

En concreto, y de acuerdo con Favas et al. (2014), se pueden distinguir diferentes estrategias de fitorremediación (Figura 2.7):

- Fitoextracción: Las plantas absorben el contaminante o metal y lo acumulan en sus tejidos. La acumulación suele producirse en las partes aéreas de las plantas. Se utilizan plantas

acumuladoras y/o hiperacumuladoras, que sean capaces de tolerar y acumular los metales pesados. La extracción, en ocasiones, se mejora mediante la adición de quelatos en el suelo. En la mayoría de los casos las plantas se cosechan, se incineran y las cenizas se almacenan en lugares acondicionados para ello o son transformadas para recuperar los metales acumulados (fitominería).

- Fitoestabilización: Los contaminantes del suelo, del agua o del aire son retenidos por procesos de adsorción a nivel radicular (alrededor de las raíces), de manera que se reduce su biodisponibilidad. El proceso a veces se puede amplificar y acelerar mediante la adición de compuestos orgánicos o minerales, naturales o artificiales. Es un método eficaz para prevenir la dispersión de contaminantes en aguas superficiales o subterráneas.
- Fitoestimulación: Los exudados radiculares se utilizan para promover el desarrollo de microorganismos degradativos. Es una característica de muchas plantas hiperacumuladoras.
- Fitodegradación: las plantas captan, almacenan y degradan los contaminantes a formas menos tóxicas o no tóxicas. Esta estrategia sólo se aplica con compuestos orgánicos, ya que son los únicos que pueden ser degradados a formas no tóxicas.
- Fitovolatilización: Las plantas captan y modifican los contaminantes y metales pesados a formas/compuestos volátiles, los cuales son posteriormente liberados a la atmósfera a través de la transpiración. La fitovolatilización libera sustancias volátiles a la atmósfera, las cuales puede ser o no tóxicas.
- Rizofiltración: Los contaminantes son absorbidos o adsorbidos por las raíces de las plantas, donde se acumulan.

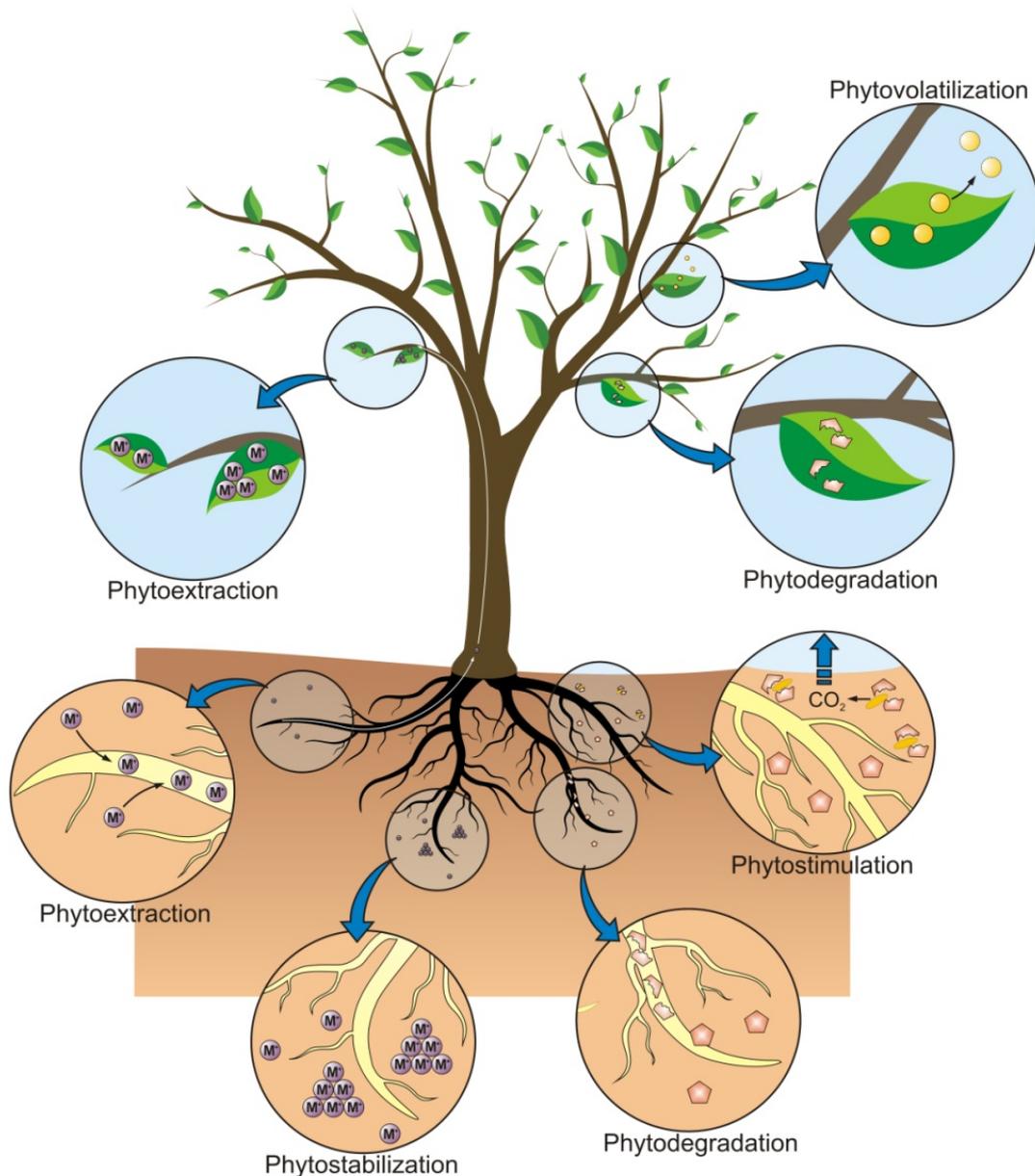


Figura 2.7 Modelo conceptual de los principales tipos de fitorremediación (Favas et al. 2014)

2.5.1 Fitorremediación de los suelos naturales y agrícolas contaminados por metales pesados

Centrándonos en la remediación de los suelos, tanto naturales como agrícolas, contaminados por metales pesados, los tipos de fitorremediación más extendidos y los que mayor atención han recibido hasta el momento son la fitoextracción y la rizofiltración. Los metales pesados son compuestos que no se degradan a formas menos tóxicas y, por tanto, tienen un efecto perjudicial constante en el medio ambiente. Estos dos tipos de técnicas de remediación son, sin duda, los más adecuados para los metales pesados ya que permiten eliminar los contaminantes del suelo, extrayéndolos y acumulándolos en diferentes partes de la plantas. Posteriormente, éstas pueden ser

incineradas para la obtención de energía, y las cenizas pueden ser procesadas para la recuperación de los distintos elementos metálicos (fitominería) o almacenadas como material peligroso en áreas especialmente diseñadas para ello.

Las características adecuadas que debe presentar una especie vegetal para ser utilizada como fitorremediadora de metales pesados son: que presente un crecimiento vegetativo rápido, una alta producción de biomasa, una alta competitividad y una alta tolerancia a los metales pesados. Además, es muy recomendable que la planta presente una elevada tasa de absorción, de translocación y de acumulación en las partes recolectables. Las especies que presentan estas características se denominan acumuladoras e hiperacumuladoras, en función de su capacidad de acumulación.

Para la fitorremediación de suelos naturales, estas características las presentan algunas especies vegetales nativas silvestres o con escaso interés económico. Numerosos trabajos han explorado la capacidad fitorremediadora de estas plantas (p. ej. Yoon et al. 2006, Mahmud et al. 2008, Mkumbo et al. 2012). Sin embargo, para el caso de los suelos agrícolas, es interesante y adecuado encontrar diferentes cultivos que presenten estas características y, por tanto, esta capacidad fitoextractora, y que además dicha acumulación se produjese en la partes no comestibles, dándole así un mayor interés económico. Se han realizado ya numerosos ensayos con diferentes cultivos como la mostaza india (*Brassica Juncea*), el maíz (*Zea mays*) o el girasol (*Helianthus annuus*) (Safari Sinangani & Khalilikhah 2008, John et al. 2009, Szczygłowska et al. 2011). Sin embargo, a pesar de su buen resultado como fitoextractores, y debido a su gran importancia en el mercado de la alimentación (como alimentos y como producto para la elaboración de aceites vegetales), estos cultivos no pueden ser comercializados posteriormente ya que acumulan gran cantidad de metales pesados, entre ellos Cu (Clemente et al. 2005), en las partes consumibles.

Así pues, resulta evidente la necesidad de seguir explorando la utilización de diferentes cultivos, los cuales presenten las características mencionadas anteriormente y que acumulen metales en sus diferentes partes pero nunca en aquellas comestibles. Recientemente, la investigación en este campo ha empezado a incluir los cultivos hortícolas (Angelova et al. 2009, Yang et al. 2009) debido a su elevada transcendencia dentro de la dieta de los seres humanos, sobre todo dentro de la Mediterránea (Cuadrado et al. 1995). Además, algunas especies hortícolas están incluidas entre las especies recomendadas por diversas organizaciones (ISO 1995a, OECD 2006) para la realización de ensayos de toxicidad. De entre ellas, destacan la lechuga y el tomate, que son dos de los cultivos agrícolas más consumidos en España y Europa (MAGRAMA 2009). Con respecto a estos dos cultivos, ya se han realizado algunas publicaciones (p. ej. Tambasco et al. 1999, Angelova et al. 2009; Recatala et al. 2010) aunque los resultados obtenidos no son del todo concluyentes por ser específicos para unos determinados tipos de suelos y para estos cultivos.

De manera más concreta, para los suelos contaminados con Cu, es cierto que algunas especies vegetales (incluidos algunos cultivos) han mostrado una elevada capacidad de acumulación de metales y, por tanto, un elevado potencial de fitorremediación, como es el caso de las especies

nativas. Sin embargo, la extracción de Cu en suelos es todavía muy limitada (Pietrach & Uren 2011). En el caso de suelos agrícolas, los principales especies/cultivos utilizadas para la fitorremediación de Cu son, al igual que para la mayoría de metales pesados, la mostaza india (*Brassica juncea*), el maíz (*Zea mays*) o el girasol (*Helianthus annuus*) (Ariyakanon & Winaipanich 2006, Jadia & Fulekar 2008, Rahman et al. 2013). También se han realizado estudios con diferentes cultivos hortícolas (Tambasco et al. 1999, Angelova et al. 2009, Recatalá et al. 2012) pero igual que para los metales pesados en general los resultados no son del todo concluyentes y/o no se incluyen elevadas concentraciones de Cu en los ensayos, las cuales pueden llegar a darse en suelos agrícolas de acuerdo con diversos autores (Nicholson et al. 2003, Komarek et. 2010, Ruyters et al. 2013) debido, sobre todo, a prácticas agrícolas inadecuadas.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto hasta el momento, resulta evidente la necesidad de continuar investigando el potencial fitorremediador de los diferentes cultivos hortícolas, sobre todo aquéllos que son ampliamente consumidos por la especie humana, como puede ser la lechuga, el tomate, la patata o la berenjena, por citar algunos ejemplos.

Para llevar a cabo el estudio del potencial fitorremediador y fitoextractor de los diferentes cultivos o especies vegetales, es necesario determinar su bioacumulación. Ésta se puede definir como “término general que describe un proceso por el cual diferentes elementos químicos son absorbidos por un organismo, ya sea de manera directa debido a la exposición a un medio contaminado o indirecta a través del consumo de comida que contenga el elemento químico en cuestión.” (USEPA 2010). La bioacumulación se estudia a través de los factores de concentración (FC) o factores de bioacumulación (FBA), los cuales se pueden definir como “el ratio que relaciona la concentración de un contaminante en un organismo con la concentración del contaminante en el ambiente, de donde el organismo puede incorporar dicho contaminante a través de la ingestión de comida contaminada o a través de contacto directo.” (USEPA 2010). Numerosos autores han utilizado este concepto para analizar la bioacumulación de numerosos contaminantes en plantas, explorar la biodisponibilidad de éstos en ciertos ambientes y determinar la capacidad fitorremediadora de las plantas ensayadas (p. ej. McKone & Maddalena 2007, Galfati et al. 2011, Rezvani & Zaefarian 2011).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3. Justificación y objetivos

3.1 Justificación

La contaminación de los suelos, especialmente los agrícolas, por metales pesados es un proceso de degradación muy extendido, que afecta a numerosas áreas del planeta (Holmgren et al. 1993, Wong et al. 2002, Nicholson et al. 2003, Romić & Romić 2003, Mapanda et al. 2005, Luo et al. 2009, Wei & Yang 2010). En un mundo basado en un modelo productivo intensivo y de grandes extensiones, los procesos de contaminación directa (depósito de residuos urbanos, desechos de minería, etc.) e indirecta (prácticas agrícolas inadecuadas) de los suelos seguirán produciéndose, y por tanto, afectando y perjudicando a los ecosistemas, tanto en la actualidad como en el futuro, ya que, según se ha comentado, los metales pesados son elementos persistentes dado que no se biodegradan.

Así pues, la protección del suelo y de sus funciones es un aspecto clave y muy relevante, que presenta un amplio y especial interés. Como ya se ha expresado anteriormente, en Europa, la importancia de proteger el recurso suelo quedó recogida inicialmente en la Comunicación “Hacia una Estrategia Temática para la Protección del Suelo” de 2002 de la Comisión de las Comunidades Europeas (CCE 2002). Los esfuerzos europeos para conseguir una adecuada conservación del recurso suelo continuaron en 2006 con la comunicación “Estrategia temática para la protección del suelo” (CCE 2006), la cual derivará en la elaboración de una Directiva Europea del suelo, que continúa discutiéndose en la actualidad. Por otro lado, en España, este interés quedó plasmado en el Plan Nacional de Suelos Contaminados, el cual se puede dividir en dos fases: una de 1995 a 2005, y otra del 2005 a 2015; y en el Real Decreto 9/2005 (BOE 2005), y la ley 22/2011 de residuos y suelos contaminados (BOE 2011). Esta última fue modificada por la ley 5/2013 (BOE 2013).

A pesar de reflejar este creciente interés por la protección y conservación del suelo, la legislación española, basada en la definición de estándares de calidad, presenta algunos inconvenientes que dificultan su aplicación en relación a la contaminación por metales pesados. El Real Decreto 9/2005 no establece estándares de calidad concretos/específicos para la identificación y caracterización de suelos contaminados por metales pesados basándose en el análisis de la dinámica de éstos en el suelo, y dicho aspecto no ha sido modificado posteriormente por las sucesivas leyes (BOE 2011, 2013). No obstante, el Real Decreto sí establece procedimientos para la derivación de dichos estándares, así como criterios para su aplicación. Así pues, dicho Real Decreto establece cómo definir los denominados Niveles Genéricos de Referencia (NGR) y también que un suelo debe considerarse como potencialmente contaminado cuando la concentración determinada para el metal se encuentra entre en NGR y cien veces ese valor, o contaminado cuando se determina en él una concentración igual o superior a cien veces el valor de referencia para ese metal pesado. De acuerdo con la comunidad científica internacional, los NGR en suelos agrícolas corresponden a la

concentración total del metal pesado en suelos no afectados por procesos de contaminación puntual (p. ej. industrias) pero si pueden estarlo por procesos de contaminación difusa (p. ej. deposición atmosférica y fertilización) (McLaughlin et al. 1999, Adriano 2001, Singh 2001, ISO/DIS 19258 2005). Estos niveles se refieren al límite superior del rango normal de concentraciones que cubren la variabilidad natural de determinados metales pesados a nivel regional. En relación con esto, Sánchez et al. (2004) y Micó et al. (2007) establecieron los niveles genéricos de referencia para una serie de metales pesados para la Comunidad Valenciana, una región representativa de Región Mediterránea Europea.

Por otro lado, teniendo en cuenta la influencia de las características de los suelos en la dinámica (movilidad y disponibilidad) de los metales pesados en suelo; y la influencia del tipo de planta/cultivo presente en los suelos agrícolas en relación a la toxicidad y la acumulación, resulta evidente la necesidad de tener en cuenta estos dos aspectos en la definición de estándares de calidad del suelo adecuados y en la propuesta de medidas de protección, conservación y recuperación adecuadas. Sin embargo, de manera genérica, la influencia de estos dos aspectos no suele ser contemplada en la definición de estándares de calidad ni en la propuesta de medidas de conservación y recuperación adecuadas, ni a nivel estatal ni a nivel europeo, a pesar de que, como ya se ha visto, la protección del suelo y su calidad, y el uso sostenible de este recurso sea un aspecto clave en la Unión Europea (CCE 2002). Esto provoca que, generalmente, los niveles de concentración máxima permitida sean excesivamente permisivos, no reflejando así la complejidad de los sistemas agrarios y poniendo en riesgo la salud de los ecosistemas y la humana.

Como consecuencia, surge la necesidad de realizar estudios más detallados y adecuados, que contemplen la influencia de los diferentes factores mencionados anteriormente, de manera que permitan establecer valores o estándares más realistas y aplicables en cada una de las zonas geográficas descritas a nivel estatal, europeo e incluso mundial.

Con respecto a este último aspecto, la región Mediterránea es la región climática en la que se centra la presente Tesis Doctoral debido a que el clima de tipo Mediterráneo es el predominante en la Península Ibérica y a que la región Valenciana, dentro de la cual se sitúan algunos de los suelos agrícolas seleccionados, es representativa de región Mediterránea Europea, según se explica posteriormente. Sin embargo, a pesar de que la zona dominada por un clima mediterráneo se encuentra principalmente situada en la denominada Cuenca Mediterránea, otras zonas del mundo también presentan este tipo de clima, como por ejemplo Chile, Argentina o Australia, y forman parte de la región Mediterránea Mundial. Dentro de este grupo de países, Australia es un país de especial interés debido a los intensos procesos de contaminación de suelos agrícolas que se producen asociados a la industria minera del país y a la intensa actividad agrícola de muchas de sus zonas, incluida la Mediterránea (McLaughlin et al. 2000). Australia está considerada como uno de los países mineros más importantes del mundo. De acuerdo con Hart (1982), la actividad minera ha contaminado el medio ambiente con metales pesados en muchas zonas de Australia, y Sultan (2007) detectó elevados niveles de metales y

metaloides en los suelos de la región de Victoria. Por otro lado, la agricultura es una parte muy importante de la economía Australiana y este país está considerado uno de los principales productores mundiales (DAFT 2013). Sin embargo, las prácticas agrícolas inadecuadas han provocado una acumulación excesiva de Cu (McLaughlin et al. 2000), especialmente en las zonas hortícolas y de viñedos (Wightwick et al. 2008).

Un aspecto importante a tener en cuenta en relación a Australia es el hecho que la legislación de contaminación de suelos y los estándares de calidad del suelo vigentes han sido establecidos a nivel regional (p.ej., SA EPA 1996, NSW EPA 1997, Victorian EPA 1997), basándose en estudios europeos y en la legislación europea. Así pues, no reflejan la particularidades edáficas y climáticas de Australia. Los suelos en Australia son predominantemente ácidos lo que los hace especialmente interesantes de evaluar debido a la diferencia existente con los considerados en esta Tesis Doctoral de la región mediterránea europea, los cuales son mayoritariamente básicos.

Por todo ello, y para incrementar el conocimiento alcanzado en relación a los suelos contaminados por Cu en la región Mediterránea, se consideró adecuado llevar a cabo diferentes ensayos en suelos agrícolas mediterráneos australianos. Esto fue posible gracias a la beca concedida por la Generalitat Valenciana para realizar una estancia de 6 meses en la *Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation* (CSIRO), en Australia.

Por tanto, la presente Tesis Doctoral se encuadra en este contexto, y pretende contribuir a los esfuerzos realizados hasta ahora en la protección de los suelos, uno de los objetivos principales de la UE y España, según se ha indicado y descrito anteriormente, a través de la revisión del estándar de calidad establecido por la legislación vigente y del análisis y estudio de la influencia de las propiedades del suelo en la dinámica del Cu en suelos agrícolas Mediterráneos. Además, la presente Tesis también analiza el comportamiento de dos de los cultivos más consumidos en el Mediterráneo y en el mundo (lechuga y tomate) frente a la presencia de Cu en el suelo, analizando la toxicidad a nivel productivo y la acumulación, translocación y distribución del Cu en ellos; y explora la capacidad de fitorremediación de éstos. Con respecto a este último aspecto, los ensayos incluidos en esta Tesis pretenden analizar la idoneidad de estos cultivos y su “cercanía” a las “condiciones ideales”, es decir, aquéllas en las que los cultivos no presentan efectos de toxicidad muy intensos y cuya acumulación se produce mayoritariamente en las partes no consumibles de éstos, generando así productos adecuados para el consumo humano al no superar el estándar de calidad sanitario. Se pretenden establecer, además, rangos de concentración en suelo que permitan poner en valor los suelos agrícolas afectados por Cu, teniendo en cuenta para ello que el efecto tóxico sobre la productividad sea bajo-moderado y que, por supuesto, se cumplan los estándares de calidad sanitarios para estos dos cultivos.

Es importante destacar, en este sentido, que muchos de los estudios realizados hasta el momento se centran en ensayos con suelos con niveles de concentración de metales pesados bajo-medios (p. ej., Angelova et al. 2009). Por tanto, y para poder determinar los límites de la influencia de las propiedades edáficas y de los diferentes comportamientos de las plantas frente a suelos altamente

contaminados, es necesario llevar a cabo ensayos con suelos que presenten elevadas concentraciones de metales pesados. Estas condiciones pueden darse en suelos agrícolas cercanos a zonas mineras e industriales (Belmonte Serrato 2010), o en suelos agrícolas donde se ha producido una intensiva y prolongada utilización de fertilizantes y productos fitosanitarios (Nicholson et al. 2003, Komárek et al. 2010).

Por último, la presente Tesis también estudia y analiza el potencial de la fluorescencia de rayos-X portátil (P-XRF o FP-XRF) en la detección y caracterización de zonas contaminadas, en relación al contenido de Cu en suelos y matrices vegetales. El estudio y perfeccionamiento de esta técnica resulta clave en el campo de la contaminación ambiental, ya que la determinación de la composición elemental de diferentes tipos de muestras ambientales permitirá realizar un análisis rápido e integral de las zonas declaradas como contaminadas. Esto es especialmente significativo para la evaluación de los suelos/áreas agrícolas, ya que la utilización de esta técnica permitiría realizar *in situ* un análisis completo de las áreas contaminadas, permitiendo evaluar, por un lado, el estado y la calidad de los suelos, y por otro, el cumplimiento de los estándares de calidad sanitario en referencia a los cultivos presentes en las diferentes áreas, y plantear así las estrategias más adecuadas para la gestión de los suelos.

3.2 Objetivos

Así pues, los objetivos principales de la presente Tesis son: en primer lugar, incrementar el conocimiento existente en relación a la declaración de suelos contaminados por Cu y su posterior manejo y recuperación, utilizando dos cultivos hortícolas de amplio interés. Se pretende analizar la validez de la legislación actual y explorar el potencial fitorremediador de la lechuga y el tomate, realizando ensayos ecotoxicológicos donde se evalúe tanto la influencia de las propiedades edáficas en la dinámica del Cu como la influencia del tipo de cultivo en el grado e intensidad del efecto nocivo/tóxico del metal, esto último evaluado en relación a la producción de biomasa y a la acumulación del metal en los diferentes tejidos vegetales. Se pretenden establecer valores que sirvan como base para el establecimiento de estándares de calidad del suelo adecuados y de análisis de riesgos en la región Mediterránea, tanto a nivel estatal como europeo. En segundo lugar, se pretende analizar el potencial de la fluorescencia de rayos-X portátil (P- XRF o FP-XRF) en la detección, caracterización y evaluación integral de zonas agrícolas contaminadas con cobre, evaluando su capacidad para determinar el contenido en Cu de los diferentes compartimentos de estos ecosistemas, incluyendo muestras de suelos como vegetales.

Para alcanzar estos objetivos generales se plantean los siguientes objetivos específicos:

- 1) Determinar los valores de toxicidad del Cu en suelos agrícolas representativos, referidos tales valores a las concentraciones efectivas que producen un 50% (EC_{50}) y un 10% (EC_{10}) de inhibición en los cultivos, como información relativa al efecto tóxico de este metal sobre la biomasa, que pueda resultar útil para el análisis de riesgos y para el establecimiento de estándares adecuados de calidad del suelo.
- 2) Determinar la concentración máxima en suelo de Cu que no supera el contenido máximo admisible en cultivos hortícolas representativos (lechugas y tomate) según lo establecido por la legislación (límite sanitario crítico), como información relativa a la acumulación de este metal en las diferentes partes de los cultivos, que pueda resultar útil para el análisis de riesgos y para el establecimiento de estándares de calidad del suelo adecuados.
- 3) Identificar y evaluar las características del suelo que influyen en la producción de biomasa y en la transferencia del Cu en el sistema suelo-planta, y determinar su grado de influencia.
- 4) Caracterizar la dinámica del Cu en suelos representativos de zonas agrícolas hortícolas de la Región Mediterránea Europea y Australiana.
- 5) Validar, y en su caso, desarrollar el criterio establecido por el RD 9/2005 para la declaración de suelos contaminados por Cu, para suelos agrícolas Mediterráneos representativos (europeos y australianos) cultivados con un cultivo acumulador (lechuga) y otro no acumulador (tomate), a través del análisis del efecto del Cu sobre la producción de biomasa y de su acumulación en las diferentes partes de los cultivos.
- 6) Explorar el potencial fitorremediador de los cultivos de lechuga y tomate en diferentes suelos agrícolas, a través del análisis de bioacumulación de Cu en sus diferentes partes/tejidos y del cálculo de diferentes factores de bioacumulación y translocación.
- 7) Análisis del potencial de FP-XRF para la determinación del contenido en Cu en plantas y suelos agrícolas para la caracterización, vigilancia y seguimiento de zonas agrícolas contaminadas por Cu.



MATERIAL Y MÉTODOS

4. Material y Métodos

4.1 Selección, muestreo y preparación de las muestras de suelos

4.1.1 Selección, muestreo y transporte

Un conjunto de cuatro suelos agrícolas (Rojales, Sollana, Nules y Peñíscola) de la región Mediterránea Valenciana, región representativa de la región Mediterránea Europea (Recatalá et al. 2010, 2012), y otro conjunto de tres suelos agrícolas (Soil 1, Soil 2, Soil 3) representativos de la región Mediterránea Australiana (FAO 1992), todos ellos con diferentes propiedades edáficas, fueron seleccionados para su utilización en los diferentes ensayos ecotoxicológicos que se plantearon en la presente Tesis.

La región Mediterránea Valenciana está situada en el este-sureste de España, dentro de la denominada región Mediterránea Europea. Tanto las condiciones climáticas (temperatura media anual de entre 14-18 °C, y precipitación media anual de entre 400-600 mm) como las propiedades del suelo (suelos calcáreos, generalmente pobres en materia orgánica, con un elevado contenido en carbonato y salino en algunas áreas) son típicos de esta región Europea. Además, en las últimas décadas, el mosaico de usos del territorio en la región Valenciana ha cambiado considerablemente, produciéndose un aumento e intensificación del desarrollo agrario (caracterizados por un elevado uso de agroquímicos), y una expansión de los usos urbano-industriales, algo que también se ha producido en la región Mediterránea Europea (Coccossis 1991, Groom et al. 1995, Recatalá et al. 2009). Por todo ello, la región Mediterránea Valenciana puede considerarse representativa de la región Mediterránea Europea.

Para la selección de las zonas agrícolas representativas de la región Mediterránea Europea, se tuvo en cuenta la información generada en proyectos anteriores por el grupo de investigación al cual se adscribía el doctorando, de tal forma que éstas incluían diferentes tipologías de suelos representativos de áreas agrícolas con cultivos hortícolas, que ya habían sido ensayadas en proyectos recientes (Referencias: CGL2005-05596/BTE y CGL2006-07250/BTE). Concretamente, las zonas seleccionadas en las que están los suelos ensayados son las siguientes:

La zona 1 engloba la comarca de la Vega Baja de la Segura al sur de Alicante, donde un gran número de suelos agrícolas presentan problemas de salinidad, debido a altos contenidos de sales en la solución del suelo (Fluvisol sálico, de acuerdo con la *World Reference Base on Soil Resources*) (WRB 2006). Estas sales pueden afectar a la biodisponibilidad de los metales pesados, a la vez que crean un fuerte estrés para los cultivos, afectando negativamente a la producción.

La zona 2 abarca una zona agrícola de la provincia de Valencia, situada en la comarca de la Ribera, donde existen amplias zonas agrícolas dedicadas al cultivo de hortícolas. En esta zona se

seleccionó una parcela que presenta un suelo con un alto contenido en carbonato cálcico y una textura fina (Fluvisol calcárico, de acuerdo con la *World Reference Base on Soil Resources*) (WRB 2006).

La zona 3 se sitúa en la comarca de La Plana Baixa en la provincia de Castellón, donde existe una zona dedicada al cultivo de hortalizas. En esta zona se seleccionó una parcela que presenta un suelo con un elevado contenido en materia orgánica (Gleysol calcáreo, de acuerdo con la *World Reference Base on Soil Resources*) (WRB 2006).

Finalmente, la zona 4 se sitúa en la comarca de El Baix Maestrat en la provincia también de Castellón. Se trata de una zona más al norte pero que también cuenta con grandes extensiones dedicadas al cultivo de hortalizas. En esta zona se seleccionó una parcela que presentaba un suelo con una textura media-gruesa (Fluvisol arénico, de acuerdo con la *World Reference Base on Soil Resources*) (WRB 2006).

La localización comarcal de las distintas zonas agrícolas se refleja en la Figura 4.1. Asimismo, en términos generales, los criterios que se han seguido en la selección de las 4 zonas representativas quedan reflejados en la Tabla 4.1. La selección de estas zonas de características ambientales y edáficas diferentes permitiría obtener conclusiones relevantes acerca de la influencia de las diferentes propiedades del suelo en la dinámica del metal.



Figura 4.1 Localización (●) de las cuatro zonas agrícolas representativas de la región Mediterránea Valenciana.

Tabla 4.1 Criterios de selección de las parcelas representativas de la región Mediterránea Europea.

Zona	Criterio	Suelo (p. ej.)	Muestra
Provincia de Alicante	Suelo agrícola con problemas de salinidad	Fluvisol sálico	1
Provincia de Valencia	Suelo agrícola carbonatado	Fluvisol calcárico	2
Provincia de Castellón	Suelo agrícola con alto contenido en materia orgánica	Gleysol calcáreo	3
Provincia de Castellón	Suelo agrícola de textura media-gruesa	Fluvisol arénico	4

Por otro lado, para la selección de las zonas agrícolas representativas de la región Mediterránea Australiana, se tuvieron en cuenta los principales tipos de suelos presentes en esta zona (FAO 1992) dedicados a la agricultura y que también estuvieran presentes en la estación experimental del CSIRO de Canberra, situada en Ginninderra, una población a unos 10 km al NW de la capital. De manera más concreta, los suelos seleccionados fueron un Luvisol crómico (Soil 1), un Planosol eutrítico (Soil 2) y un Vertisol Pelico (Soil 3), de acuerdo también con la *World Reference Base on Soil Resources* (WRB 2006). Los diferentes puntos de muestreo se encuentran señalados en el mapa de suelos de la estación experimental que se muestra en la Figura 4.2.

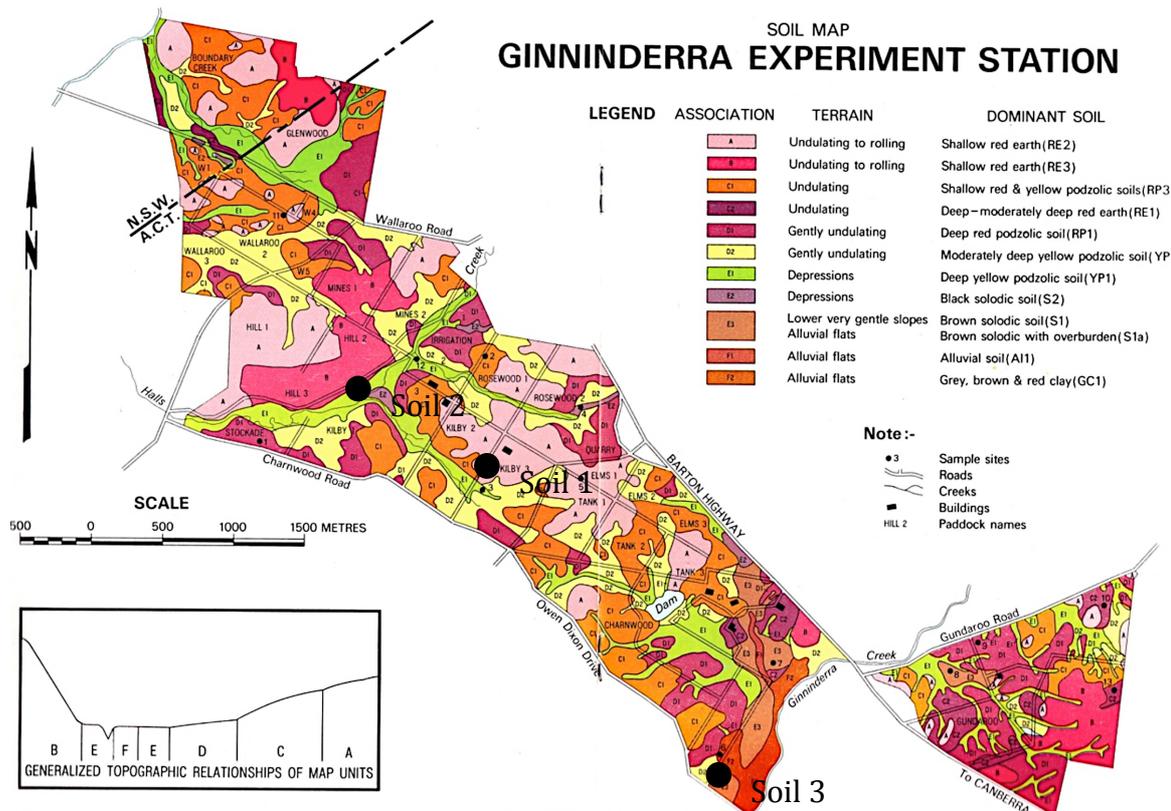


Figura 4.2 Mapa de suelos de la estación experimental de Ginninderra y localización (●) de los puntos de muestreo.

En términos generales, los criterios que se han seguido en la selección de las 3 zonas representativas quedan reflejados en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2 Criterios de selección de las parcelas representativas de la región Mediterránea Australiana.

Nombre Suelo	Criterio	Suelo (p. ej.)
Soil 1	Suelo agrícola con pH ácido	Luvisol crómico
Soil 2	Suelo agrícola con contenido en materia orgánica bajo o medio y pH medio	Planosol eutrico
Soil 3	Suelo agrícola con un alto contenido en materia orgánica y pH neutro-básico	Vertisol pelico

Para cada una de las parcelas agrícolas seleccionadas, y con la intención de llevar a cabo un muestreo adecuado y representativo, se obtuvieron muestras compuestas de cada una de ellas. La obtención de muestras compuestas es aplicable a suelos agrícolas en los que se prevé una homogeneidad intraparcela, debido a la uniformidad en las prácticas de manejo en los primeros centímetros (Cline 1944, Dick et al. 1996, Schleub & Müller 2001). Este tipo de muestreo consiste en tomar diferentes submuestras alrededor del punto de muestreo, dentro de cada parcela. Diferentes autores han establecido que el mínimo número de submuestras para formar una muestra compuesta debe situarse entre 4 y 5 (Rigney & Fielding 1956, Jones 1985), mientras que el número máximo varía entre 16 y 20 (Rigney & Fielding 1956, Jones 1985, Junta de Andalucía 1999, Barahona & Iriarte 2001). De manera más concreta, en este caso, se recogieron 16 submuestras en diferentes puntos regulares de cada una de las parcelas, siguiendo el esquema representado en la Figura 4.3.

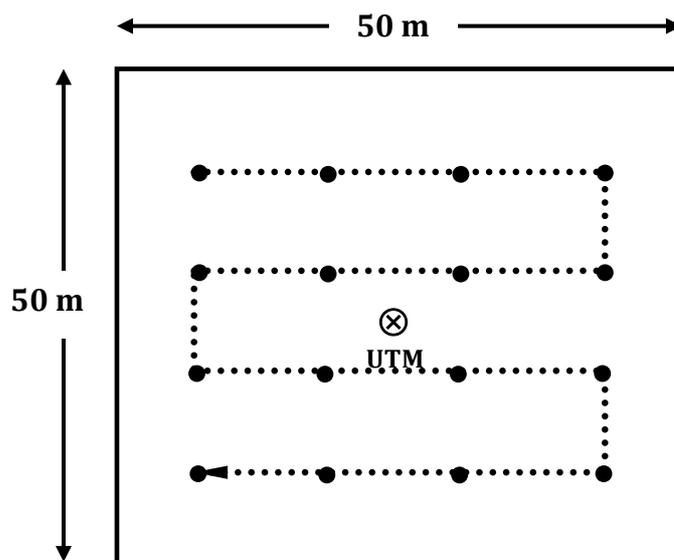


Figura 4.3 Esquema de la distribución de las 16 submuestras que componen la muestra compuesta.

La profundidad máxima de toma de muestra que se recomienda para analizar el contenido de metales pesados en suelos agrícolas varía entre 20 y 30 cm (Welch & Fitts 1956, IHOBE 1994, Dick et al. 1996, Barahona & Iriarte 2001, Theocharopoulos et al. 2001). En cualquier caso, se trata de muestras superficiales, por ser aquella parte del suelo en la que se acumulan mayoritariamente los metales pesados procedentes de las actividades antrópicas y donde se sitúan la mayoría de las raíces de los cultivos hortícolas (Jones 1985, Nriagu 1990, McLean & Bledsoe 1992, Ross & Kaye 1994, Alcalá 1995). Concretamente, en este estudio se realizó una toma de muestra superficial en los primeros 25 centímetros del suelo. Todas las muestras tomadas fueron almacenadas en bolsas de polietileno debidamente etiquetadas y transportadas al laboratorio para su preparación el mismo día del muestreo.

4.1.2 Preparación y conservación de las muestras del suelo.

Una vez en el laboratorio, se homogeneizó el suelo contenido en cada bolsa de plástico, considerando toda la muestra tomada, para no obviar las partículas de menor tamaño que suelen quedar en el fondo, y se procedió a la preparación de las muestras de suelo siguiendo los criterios establecidos en la norma UNE 74303 (AENOR 1997), que establece el pretratamiento de muestras de suelo para análisis físico-químico (secado, tamizado y molienda). La presencia de humedad puede producir alteraciones en los resultados, debido a posibles reacciones entre distintos componentes que, en última instancia, pueden modificar las propiedades del suelo o producir pérdidas de peso por evaporación durante la fase de análisis (Cline 1944, Porta et al. 1986). Por ello, las muestras de suelo se extendieron sobre bandejas cubiertas con papeles de filtros y se mantuvieron durante varios días a temperatura ambiente, con el objeto de equilibrar la humedad de la muestra de suelo a la humedad atmosférica.

Tras equilibrar la humedad de la muestra, se eliminaron las partes vegetales (raíces, hojas), los restos de materiales procedentes de actividades antrópicas (plásticos) y los elementos gruesos. Posteriormente, la muestra se pasó a través de un tamiz de 2 mm de luz mediante un tamizado mecánico con rodillos de púas y tamiz de malla inoxidable. De esta forma, se obtuvo una muestra de suelo tamizada y homogeneizada denominada “muestra seca al aire”. Sin embargo, determinados análisis (contenido total de metales) requieren una mayor homogeneidad de la muestra, al trabajar con cantidades muy pequeñas (Porta et al. 1986), por lo que una parte de la muestra se pulverizó mecánicamente mediante un molino de bolas FRITSCH® Centrífuga Ball Mill Pulverisette 6 y se pasó a través de un tamiz de 0.25 mm de luz.

Las muestras tamizadas se conservaron de nuevo en bolsas de polietileno, rotuladas de forma adecuada y almacenadas en un ambiente seco. Una muestra representativa de cada bolsa y las muestras pulverizadas se guardaron también en pequeños botes de plástico con tapón de rosca,

identificados con el nombre de la muestra y la fecha de preparación de la misma, hasta la realización de los análisis de caracterización pertinentes.

Las submuestras de suelo secas al aire, tanto tamizada como pulverizada, presentan todavía una cantidad de agua, la cual debe ser estimada previamente a cualquier análisis, con el fin de realizar la corrección en los cálculos posteriores. La determinación de la humedad residual del suelo se realizó por gravimetría, de acuerdo con el método oficial del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA 1994). Para ello, una porción de la muestra de suelo se pesó en una cápsula de porcelana, previamente tarada, y se introdujo en una estufa de aire forzado a 105°C hasta alcanzar peso constante. Una vez enfriada en un desecador se pesó y se calculó el porcentaje de humedad, para cada una de las muestras de suelo, mediante la ecuación 1:

$$\% H_{\text{suelo}} = \frac{(P - P')}{P'} * 100 \quad (1)$$

donde % H_{suelo} es el porcentaje de humedad residual del suelo, P es el peso (g) de suelo inicial y P' es el peso (g) de suelo secado a 105°C.

El cálculo de la humedad se realizó tanto para la muestra tamizada (tamaño de partícula menor a 2 mm) como para la muestra pulverizada (tamaño de partícula menor de 0.25 mm), puesto que la corrección se lleva a cabo en función del tamaño de partícula utilizado. Los porcentajes de humedad calculados en la presente Tesis Doctoral variaron entre un 2 y un 4% para todas las muestras.

4.2 Análisis de las propiedades y características del suelo.

Las propiedades y características edáficas analizadas se seleccionaron atendiendo a su importancia para el estudio de la contaminación del suelo y disponibilidad de los metales pesados en los suelos de estudio (Kabata-Pendias & Pendias 1984, McLean & Bledsoe 1992, Kabata-Pendias 1995, McBride et al. 1997, Jiménez 1998, Adriano 2001, Recatalá et al. 2001, Hlavay et al. 2004). Concretamente, las propiedades y características que han sido analizadas son: la reacción del suelo, la conductividad eléctrica en el extracto de saturación, el contenido de materia orgánica, los carbonatos, la capacidad de intercambio catiónico y el análisis granulométrico.

Reacción del suelo

La determinación de la reacción del suelo se realizó a partir de la medida potenciométrica de la concentración de hidrogeniones en una suspensión suelo:agua 1:2.5, siguiendo el método oficial del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA 1994). Para la determinación del pH en agua, se pesaron 10 g de suelo tamizado y se añadieron 25 ml de agua desionizada. La mezcla se agitó

en un agitador mecánico modelo SELECTA® Rotabit durante 5 minutos y se dejó reposar 30 minutos. Al finalizar el período de reposo, se realizó la medida del pH en el sobrenadante. La medida se realizó en un pH-metro modelo CRISON® MicropH 2000, calibrado previamente mediante las soluciones tampón adecuadas.

Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica se midió en el extracto de pasta saturada, siguiendo el método oficial del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA 1994). De acuerdo con el método, se pesaron 250 g de suelo tamizado y se añadió agua desionizada de manera sucesiva y escalonada, removiendo con una espátula en cada adición y esperando 30 minutos entre cada una de ellas, hasta llegar al punto de saturación. Tras reposar durante aproximadamente 4 horas con el recipiente tapado, se procedió a la obtención del extracto de saturación mediante una bomba de succión. Una vez recogido el extracto, la conductividad eléctrica en el extracto de saturación (CEes) se midió en un conductímetro modelo CRISON® MicroCM 2201 y se expresó en dS/m a 25°C.

Materia orgánica

El contenido de materia orgánica de las diferentes muestras de suelo se determinó mediante el procedimiento por vía húmeda de Walkley y Black, siguiendo el método oficial del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA 1994). Este método consiste en la oxidación parcial del carbono orgánico oxidable, que se encuentra formando parte de la materia orgánica del suelo, con dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$) y una valoración por retroceso con sulfato ferroso amónico (sal de Mohr) ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$). Para ello, se pesó 1 g de suelo tamizado y se añadieron 10 ml de $K_2Cr_2O_7$ 1N y 20 ml de H_2SO_4 concentrado, dejando reaccionar la mezcla durante 30 minutos.

Posteriormente, se añadieron 200 ml de agua desionizada y 10 ml de H_3PO_4 al 85%. Una vez enfriada, el exceso de dicromato potásico se valoró con sulfato ferroso de normalidad aproximada 0.5N, añadiendo 5 gotas de O-fenantrolina para determinar el punto final, de modo que por diferencia puede determinarse el dicromato potásico consumido.

El dicromato potásico consumido en el proceso de oxidación es equivalente al carbono orgánico oxidable de la muestra y, por tanto, al contenido de materia orgánica, tras aplicar una serie de factores de corrección. Los resultados se expresaron en % materia orgánica.

Carbonatos

La determinación de los carbonatos se efectuó en un dispositivo cerrado (calcímetro de Bernard) a temperatura y presión constantes, siguiendo el método oficial del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA 1994). El procedimiento consiste en medir el volumen de

CO₂ que se forma al hacer reaccionar los carbonatos del suelo con ácido clorhídrico (HCl 1:1), según la reacción I.



Se pesaron 0.2-0.3 g de suelo pulverizado en un matraz erlenmeyer que disponía de un tapón de rosca con un compartimento, donde se depositó HCl (1:1). El ácido se vertió sobre el suelo y se midió el volumen de CO₂ desprendido, a partir de la variación de la altura en la columna de medida del calcímetro. Los resultados se expresaron en % CaCO₃, respecto a un patrón de CaCO₃ puro previamente determinado.

Capacidad de intercambio catiónico

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) se ha calculado mediante la determinación de la cantidad máxima de sodio que puede ser adsorbido por el complejo de cambio, según el método oficial del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA 1994). Para su determinación, se pesaron 4 g de suelo tamizado y se saturaron con sodio mediante lavados sucesivos con 30 ml de acetato sódico (CH₃COONa) 1N a pH 8.2. En cada lavado, la mezcla se agitó durante 5 minutos en un agitador mecánico modelo SELECTA® Rotabit y se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm en una centrífuga modelo HERAEUS® Megafuge 1.0. Este proceso se repitió tres veces cambiando la solución de acetato sódico y resuspendiendo el suelo cada vez. El exceso de sal se eliminó del suelo con etanol 96% (v/v) mediante agitación, centrifugación y resuspensión, repitiendo el proceso también tres veces. El sodio adsorbido se desplazó con acetato amónico (CH₃COONH₄) 1N a pH 7.0 mediante agitación y centrifugación, repitiendo el proceso varias veces. El líquido sobrenadante obtenido en cada caso se decantó en un matraz aforado de 100 ml sobre el que se dispuso un embudo con un filtro ALBET® 145. Finalmente, los matraces se enrasaron a 100 ml con el mismo acetato amónico utilizado anteriormente y la solución final se conservó en botes de plástico a 4°C hasta su análisis. El sodio se determinó por espectrofotometría de absorción atómica con atomización por llama (EAA-Llama) y la capacidad de intercambio catiónico se expresó en cmol(+)/kg.

Análisis granulométrico

El análisis granulométrico del suelo expresa la proporción relativa de las distintas partículas minerales inferiores a 2 mm, teniendo en cuenta la clasificación del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) (Porta et al. 1986, 2008). Las fracciones consideradas fueron: arena (2000 mm a 50 mm), limo (50 mm a 2 mm) y arcilla (menor a 2 mm). La determinación se realizó por el método de la pipeta de Robinson, llevando a cabo un pretratamiento con agua oxigenada (H₂O₂) al 33% (w/v) en caliente durante varios días, para la eliminación de la materia orgánica. Una vez

eliminada, se recogió todo el suelo y se agitó con 10 ml de hexametáfosfato sódico al 5%, para la destrucción de los agregados y la dispersión de la muestra de suelo. La fracción arena se determinó mediante tamizado en húmedo y las fracciones limo y arcilla se separaron por sedimentación discontinua, siguiendo el método oficial del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA 1994).

Los resultados se expresaron en % arena, % limo y % arcilla para cada una de las muestras y, a partir de estos porcentajes, se determinó la clase textural en el triángulo de textura del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) (Porta et al. 1986, 2008).

Por otro lado, las características y propiedades de los suelos de la región Mediterránea Australiana fueron determinadas siguiendo los métodos oficiales de química del suelo para Australasia (Rayment & Lyons 2010). Dentro de este conjunto de métodos, se encuentran los utilizados y descritos anteriormente para la determinación de las propiedades edáficas, por lo que éstos también fueron los utilizados para el análisis de dichas propiedades. Sólo se introdujeron dos pequeños cambios: el primero correspondió al instrumento de medida utilizado para determinar la CIC, donde el sodio se determinó por Espectrofotometría de Emisión Atómica de Plasma por Microondas (MP-AES, en inglés). Sus principios de funcionamiento son en gran medida muy parecidos a los del espectrofotómetro de absorción atómica de llama, el cual se describe en detalle más adelante, siendo la diferencia principal el hecho que en este caso la pulverización y combustión del analito se realiza mediante un plasma. El segundo de los cambios corresponde al método utilizado para realizar el análisis granulométrico. En este caso, los contenidos en arena, arcilla y limo de los distintos suelos fueron determinados utilizando un espectrómetro V-NIR (*Visible and Near Infrared*, en inglés) y la base de datos espectroscópica de infrarrojo visible y cercano de los suelos de Australia (Viscarra Rossel & Webster 2012). Las muestras fueron escaneadas y las fracciones granulométricas determinadas a partir de los valores de energía obtenidos dentro del rango del espectro del aparato.

4.3 Diseño de los experimentos en condiciones controladas

4.3.1 Diseño experimental

Para el desarrollo de la presente Tesis se llevaron a cabo 3 conjuntos de experimentos, compuesto cada uno por dos ensayos ecotoxicológicos: uno de biomasa y otro de acumulación (detallados posteriormente). De manera más concreta, se llevaron a cabo: un experimento con lechuga en suelos agrícolas mediterráneos españoles; otro también con lechuga en suelos agrícolas mediterráneos australianos, en el que además se investigó el potencial del P-XRF para la determinación de los contenidos de Cu en muestras de diferente naturaleza; y un último con tomate y

suelos agrícolas mediterráneos españoles. En todos ellos, el diseño experimental utilizado fue el mismo, el cual se describe a continuación.

Una vez secados y tamizados, y para cada uno de los ensayos que se llevaron a cabo, los suelos fueron contaminados con 6 dosis diferentes (el control y 5 dosis), las cuales correspondían a 1 (65.9 mg_{Cu}/kg), 10 (659.0 mg_{Cu}/kg), 30 (1977.0 mg_{Cu}/kg), 50 (3295.0 mg_{Cu}/kg) y 100 (6590.0 mg_{Cu}/kg), respectivamente, veces el NGR (Nivel Genérico de Referencia) establecido para suelos hortícolas de la Comunidad Valenciana (65.9 mg/kg) por Sánchez et al. (2004). Estas diferentes dosis se definieron de la manera descrita con la intención de abarcar el rango de concentraciones que establecen un suelo como potencialmente contaminado (dosis 2 a 5) y contaminado (dosis 6), de acuerdo con la legislación española vigente (BOE 2005). Para ello, se añadieron volúmenes adecuados de dos soluciones de CuCl₂, un compuesto presente en algunos fungicidas (Rusjan 2012, NPI 2014) y que ha sido utilizado en otros experimentos de toxicidad (Di Palma et al. 2005), con una concentración de 10g_{Cu}/l y 100 g_{Cu}/l respectivamente y teniendo en cuenta el contenido inicial de Cu de cada uno de los suelos. La adición se realizó mediante un frasco lavador y la solución contaminante se distribuyó en zigzag por toda la muestra de cada bolsa. Esta técnica permitió una distribución homogénea de la solución de Cu en suelo a la vez que mantenía su estructura porosa. Las muestras control fueron tratadas de la misma manera pero utilizando agua destilada únicamente. Una vez se realizó la adición estas soluciones, las bolsas de polietileno se cerraron con un termosellador y se almacenaron durante 7 días a temperatura ambiente (20 °C) en ausencia de luz para su homogeneización y equilibrado antes de ser utilizadas en los ensayos.

Como bien se ha indicado anteriormente, para todos los experimentos incluidos en la presente Tesis, se llevaron a cabo dos ensayos ecotoxicológicos diferentes, ambos basados en el test 208 de la OECD (OECD 2006): uno para evaluar el efecto tóxico del Cu sobre la producción de biomasa (test de biomasa) y otro para la evaluación de la absorción, transferencia y acumulación del metal en las diferentes partes del cultivo (test de acumulación). Para el test de biomasa, las muestras contaminadas de suelos se distribuyeron en macetas de 10-15 cm de diámetro y se sembraron 10 semillas de lechuga a una profundidad de 1 cm en cada maceta. Para el test de acumulación, las muestras contaminadas de suelos también se distribuyeron en macetas, en este caso de 25 cm de diámetro, y también se sembraron 10 semillas de lechuga a una profundidad de 1 cm en cada maceta, aunque para este test sólo una de las semillas germinadas fue elegida para su desarrollo completo. Para ambos tipos de ensayo, cada tratamiento se realizó por triplicado (3 macetas para cada dosis y suelo y 3 para el control).

Es importante señalar que, previo a la siembra de las semillas y durante el período de equilibrado de los suelos, se determinó la viabilidad de las semillas utilizadas a través de un test de germinación/test de viabilidad. En estos tests, se prepararon 2 placas Petri con un papel de filtro del diámetro de dicha placa, el cual fue humectado con agua destilada, y se dispusieron en ellos 100 semillas de manera ordenada. Las placas fueron posteriormente llevadas a una cámara de germinación

con una temperatura constante de 23 °C, donde estuvieron un periodo de entre 3-5 días, transcurridos los cuales se realizó el conteo de las semillas germinadas. Los lotes se consideraron adecuados cuando se obtuvieron unos porcentajes de germinación superiores al 90%, de acuerdo con los criterios establecidos por el ISTA (*International Seed Testing Association*) (ISTA 2015)

Todos los ensayos se llevaron a cabo en un invernadero, manteniendo las condiciones ambientales necesarias dentro de los rangos especificados en el procedimiento del test 208 de la OECD (OECD 2006). La humedad del suelo se mantuvo a un 70% de su capacidad de campo a través de la adición diaria de agua destilada, de manera que el estrés hídrico no fuera un condicionamiento en la germinación y el desarrollo de la planta. Además, se preparó una solución nutritiva en función de las necesidades específicas de cada cultivo y se añadió una vez a la semana a todas las macetas, para que no existieran deficiencias nutritivas que limitasen el crecimiento y correcto desarrollo de los individuos de lechuga y tomate. Por supuesto, ninguna de las soluciones nutritivas contenía ningún elemento metálico. De manera más específica, la solución nutritiva utilizada para el cultivo de la lechuga estaba compuesta por nitrato de calcio 4-hidrato, sulfato de magnesio, nitrato potásico, sulfato potásico y fosfato potásico dihidrogenado; y la utilizada para el tomate por cloruro de calcio 4-hidrato, sulfato de magnesio, nitrato potásico y fosfato amónico dihidrogenado.

La biomasa producida en las tres macetas del test de biomasa fue recolectada después de 28 días, de acuerdo con lo establecido en el procedimiento del test 208. En el caso del test de acumulación, los individuos se dejaron crecer hasta alcanzar el desarrollo maduro adecuado (\approx 4 meses) y posteriormente se recolectaron, separando raíces y tallos y hojas en el caso de la lechuga; y raíces, tallos y hojas, y fruto para el tomate.

Por último, es necesario aclarar que los resultados obtenidos para diferentes suelo sólo pueden ser comparados cuando se llevan a cabo diferentes experimentos en condiciones controladas. Esto permite evitar diferentes problemas derivados de los factores ambientales (p. ej., lluvias) o de la influencia/actividad humana (p.ej., práctica agrícola como es riego o abonado). Además, los valores ecotoxicológicos sólo pueden calcularse siguiendo protocolos estándar, los cuales implican la adición de diferentes concentraciones de contaminante y el control de las condiciones ambientales. Las condiciones creadas en este tipo de experimentos no son completamente reales puesto que, generalmente, la concentración de cobre en suelo no suele ser tan elevada. Sin embargo, y como ya se ha indicado en la sección anterior, si que reflejan aquellas situaciones en las que, debido a una intensa actividad mineras, a accidentes o vertidos, y a prácticas agrícolas inadecuadas, estas concentraciones son alcanzadas

4.3.2 Preparación y conservación de los cultivos.

En el laboratorio, todas las muestras de cultivos se lavaron con agua desionizada y se secaron cuidadosamente, con el fin de eliminar restos de suelo que pudieran incorporar metales pesados a los análisis posteriores.

La determinación de la humedad residual de las muestras vegetales también se llevó a cabo, para posteriormente realizar las correcciones pertinentes en los análisis de contenido de Cu. Esta determinación, al igual que en el caso del suelo, se realizó por gravimetría. Para el test de biomasa, la biomasa producida en 28 días fue depositada en una cápsula de porcelana, previamente tarada, y se introdujo en una estufa de aire forzado a 65°C hasta alcanzar peso constante. Una vez enfriada en un desecador, se pesó y se calculó el porcentaje de humedad, para cada una de las muestras vegetales, mediante la ecuación 2:

$$\% H_{\text{vegetal}} = \frac{(P - P')}{P'} * 100 \quad (2)$$

donde % H_{vegetal} es el porcentaje de humedad residual de la muestra vegetal, P es el peso (g) de muestra vegetal inicial y P' es el peso (g) de muestra vegetal secado a 65°C.

Una vez calculada la humedad, la muestra seca de test de biomasa fue triturada manualmente para su posterior análisis, mediante un mortero de ágata. Dicho mortero se limpió de manera adecuada con cada muestra para evitar problemas de contaminación o transferencia de metal entre muestras. Una vez triturada, la biomasa se colocó en botes de plástico correctamente identificados y cerrados herméticamente con un tapón de rosca, y se introdujeron en un desecador hasta su análisis.

Las muestras del test de acumulación (fruto, tallos y hojas, y raíces para el tomate; y tallos y hojas, y raíces para la lechuga) fueron tratadas de manera similar a las del test de biomasa. Como se ha indicado anteriormente, una vez recogidas, las muestras se limpiaron con agua destilada para eliminar restos de suelo que pudiesen alterar las determinaciones/análisis posteriores. Este proceso fue especialmente complicado para las muestras de raíz y se realizó con especial atención. Una vez limpias, raíces, tallos y hojas, y frutos en el caso del tomate, y tallos y hojas, y raíces en el caso de las lechugas, fueron secadas con papel absorbente e introducidas en bolsas de papel correctamente identificadas. Estas bolsas fueron pesadas y posteriormente introducidas en la estufa de aire forzado SELECTA® P a 65°C durante varios días hasta peso constante. La determinación del contenido de agua, presente en el cultivo fresco, se determinó por diferencia entre el peso del cultivo antes de introducirlo en una estufa de aire a 65°C y el peso de cultivo tras varios días en la estufa, hasta alcanzar peso constante. De esta forma, puede calcularse el contenido de humedad en el cultivo inicial, con el fin de expresar los resultados respecto al cultivo fresco. Esto es especialmente relevante para el caso de aquellas partes comestibles de los cultivos, ya que los estándares sanitarios son expresados en relación al contenido de diferentes elementos en materia fresca. El cálculo del

porcentaje de humedad de la muestra de cultivo se realizó, tanto en el caso de la lechuga como en el del tomate, según la ecuación 3:

$$\% H_{\text{cultivo maduro}} = \frac{(P - P')}{P'} * 100 \quad (3)$$

donde $\% H_{\text{cultivo maduro}}$ es el porcentaje de humedad del cultivo, P es el peso (g) de la muestra de cultivo antes de ponerlo en la estufa y P' es el peso (g) de la muestra de cultivo tras su secado en estufa a 65°C.

Una vez secas, todas la muestras fueron trituradas en un molino de centrifuga Fristch® Planetary Mill Pulverisette 5. La limpieza del molino se realizó cuidadosamente para evitar la posible contaminación entre muestras. Las muestras de cultivo pulverizadas fueron depositadas en botes de plástico identificados y cerrados herméticamente con un tapón de rosca, que fueron conservados en un desecador hasta su análisis.

4.4 Análisis de los datos de biomasa y establecimiento de las concentraciones efectivas

Los pesos de la biomasa recogida para cada suelo y dosis del test de biomasa de cada uno de los ensayos llevados a cabo fueron utilizados para establecer las concentraciones efectivas EC₅₀ y EC₁₀ (concentración efectiva de Cu en suelo que reduce la producción de biomasa en un 50% y en un 10 %, respectivamente). La selección de estos parámetros reside en el hecho de que han sido incluidos en legislaciones para la detección y seguimiento del Cu en suelo (*ecological soil screening levels*) (USEPA 2007b) y a su utilización en numerosos trabajos de toxicidad (p.ej., Hinojosa et al. 2008, Micó et al. 2008, Recatalá et al. 2010, Recatalá et al. 2012, Romero-Freire et al. 2015). Previo a esto y a análisis estadísticos más complejos, se analizó la normalidad de los datos de biomasa y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene, respectivamente. Los datos de biomasa de los diferentes ensayos cumplieron en todos los casos los requisitos estadísticos para la aplicación de los posteriores análisis estadísticos necesarios, por lo que no fue necesario aplicar ninguna transformación.

Los datos dosis-respuesta se ajustaron a un modelo logístico de acuerdo con la ecuación 4 (Doelman & Haanstra 1989) para cada uno de los suelos estudiados utilizando el programa TRAP versión 1.20 (*Toxicity Relationship Analysis Program, United States Environmental Protection Agency*), tal y como se ha aplicado en otros trabajos (p. ej., Hinojosa et al. 2008, Micó et al. 2008, Recatalá et al. 2010, Recatalá et al. 2012, Romero-Freire et al. 2015).

$$y = \frac{y_0}{1 + e^{b(x-M)}} \quad (4)$$

donde y = biomasa producida (g)(peso del tallo de la lechuga/tomate), $x = \log_{10}$ (Cu añadido) (mg/kg), y_0 = biomasa producida sin inhibición (g), y M y b parámetros a ajustar, donde $M = \log_{10}(EC_{50})$, siendo EC_{50} la concentración efectiva de Cu que reduce la producción de biomasa en un 50%, y b la pendiente de la curva, que indica el grado de inhibición. Para poder llevar a cabo un adecuado tratamiento de los datos, la concentración de metal considerada en la dosis 1 (control) no fue de 0 sino que se le adjudicó el valor inicial de Cu de cada uno de los suelos. El nivel de adecuación y ajuste de este modelo se analizó teniendo en cuenta los valores residuales y la relación de éstos con los valores ajustados. También fueron calculados los coeficientes de regresión ajustados (R^2 adj.), los cuales representan la varianza contemplada por el modelo propuesto. La EC_{10} se calculó también de la manera descrita anteriormente.

Además, los valores de biomasa obtenidos para cada dosis y para cada suelo fueron comparados y sus relaciones analizadas a través de la aplicación de ANOVAs de dos factores y de un factor, y de los tests *post hoc* de Tukey y de Ryan, Einot, Gabriel, Welch q test (REGWQ). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa SPSS© versión 17.

4.5 Determinación de los contenidos en Cu en las diferentes muestras y cálculo de los factores de concentración

4.5.1 Análisis del contenido total de metales pesados en suelos.

Existen diferentes métodos para el tratamiento de las muestras de suelo con el fin de determinar el contenido total de metales pesados, entre los que destacan la digestión por vía seca, la digestión por vía húmeda y la fusión con diferentes tipos de fundentes (Cámara et al. 2002, Tüzen 2003). En todos los casos, el objetivo consiste en transformar la muestra sólida en una solución donde se encuentran disueltos los metales pesados (Scott & Thomas 1977). Entre estos métodos, la digestión por vía húmeda es el método más extendido para el estudio de la contaminación del suelo. En este caso, la digestión puede llevarse a cabo mediante diferentes sistemas de calentamiento (Sastre et al. 2002) como, por ejemplo, baño de arena, placa metálica, bloque de aluminio, o digestor y horno microondas que, generalmente, se clasifican en dos grupos:

a) Métodos de digestión en vasos abiertos. Estos métodos han sido utilizados durante las últimas décadas y siguen siendo recomendados por algunas entidades como la Organización Internacional para la Estandarización (ISO, en inglés) (p. ej., ISO 11466) (ISO 1995b). Son métodos que utilizan placas calefactoras, bloques de aluminio o digestores para llevar a cabo el calentamiento y descomposición de las muestras. La digestión se realiza en vasos abiertos o sistemas de reflujo, que se calientan a una determinada temperatura, produciéndose la solubilización de los metales contenidos en la muestra de suelo. Los principales inconvenientes de las digestiones en abierto son la mayor pérdida de componentes debido a procesos de volatilización, la contaminación potencial entre muestras por salpicaduras durante el calentamiento y la necesidad de mayores contenidos de ácidos

para llevar a cabo la digestión debido a su continua evaporación, entre otros (Hewitt & Reynolds 1990, Nieuwenhuize et al. 1991, Smith & Arsenault 1996). Asimismo, estos métodos consumen la mayor parte del tiempo de la fase de análisis, debido a que la digestión debe producirse lentamente para la completa disolución.

b) Métodos de digestión en sistemas cerrados. Se trata de métodos rápidos y fiables (Smith & Arsenault 1996, Bettinelli et al. 2000), ya que el proceso de digestión se realiza en vasos cerrados, de forma limpia y controlada (Sandroni & Smith 2002). La contaminación entre muestras se minimiza, lo cual determina una mayor reproducibilidad del método, y el tiempo requerido para la digestión se reduce desde horas hasta unos pocos minutos (Hewitt & Reynolds 1990, Agazzi & Pirola 2000, Sandroni & Smith 2002). Por otro lado, la utilización de las ondas microondas para la disolución de muestras, introducido por primera vez por Abu-Samra y colaboradores en 1975, mejora el proceso de digestión debido al movimiento de iones y a la rotación de dipolos, de modo que aumenta la producción de calor a la vez que incrementa la superficie de contacto entre la muestra de suelo y los reactivos (Cámara et al. 2002). Por consiguiente, la digestión en microondas requiere una menor cantidad de ácidos, debido a la menor evaporación de los mismos, y permite alcanzar mayores temperaturas sin un aumento considerable de la presión (Link et al. 1998).

Debido al gran número de ventajas que presentan los métodos de sistemas cerrados, la digestión de las muestras de suelos asistida por microondas fue la opción elegida.

Para la digestión de muestras de suelo por vía húmeda se utilizan diferentes tipos de ácidos y agentes oxidantes, tanto en vasos abiertos como en recipientes cerrados. Los principales ácidos empleados para la determinación de metales pesados en muestras de suelo son: el ácido nítrico (HNO_3), el ácido perclórico (HClO_4), el ácido clorhídrico (HCl) y el ácido sulfúrico (H_2SO_4). Dentro de los agentes oxidantes, el más utilizado es el agua oxigenada (H_2O_2). La combinación de varios de estos reactivos permite aumentar la eficacia de la digestión, debido al efecto conjunto de las diferentes propiedades de cada uno de ellos. Estos ácidos son suficientemente fuertes para disolver los elementos que se encuentran asociados a los componentes del suelo y a los minerales secundarios, pero no pueden disolver completamente los metales pesados ocluidos en las redes de los minerales primarios. En consecuencia, los metales que van a ser extraídos mediante estas mezclas no representan realmente el contenido total de metales pesados en el suelo, por lo que se conoce como “análisis pseudo-total” (Alloway 1990, ISO 1995b, Ure 1996, Hördrejäv & Vaarman 1999).

En algunos casos, se utiliza el ácido fluorhídrico (HF) para la determinación del contenido total en muestras de suelo, puesto que es capaz de disolver completamente los silicatos. Sin embargo, debido a la problemática que supone la utilización de HF (p. ej., elevada toxicidad por inhalación, quemaduras en la piel, interferencias durante la cuantificación) y los cuidados especiales que requiere su empleo (p. ej., material de teflón o platino debido a la destrucción del material de vidrio), generalmente se utilizan diferentes mezclas de ácidos fuertes para el análisis de las muestras de suelo. Además, algunos autores han alcanzado resultados similares entre los contenidos de metales pesados

obtenidos mediante digestión con ácidos fuertes y los contenidos obtenidos mediante la utilización de HF, para algunos tipos de suelos y elementos (Scott & Thomas 1977, Merry et al. 1983, Schramel et al. 2000, Facchinelli et al. 2001, Sastre et al. 2002). La utilización de diferentes mezclas de ácidos fuertes se encuentra mucho más extendida y es la opción que fue adoptada en esta Tesis.

Los contenidos de metales pesados que han sido obtenidos en esta Tesis mediante digestión con ácidos fuertes, distintos al HF, se han denominado “contenidos totales” de metales pesados en lugar de “contenidos pseudo-totales”, siguiendo la misma terminología utilizada por numerosos autores (p. ej., Merry et al. 1983, Cala et al. 1985a, Davies 1992, Jopony & Young 1994, Dudka et al. 1996, Sánchez et al. 1998, Sánchez-Camazano et al. 1998, Andrades et al. 2000, Murray et al. 2000, Tambasco et al. 2000, Gallego et al. 2002, Morselli et al. 2002, Micó 2005, Peris 2005).

Selección del método más adecuado

Para la selección del método de digestión en horno microondas se revisaron diferentes trabajos científicos. Diversos autores (p. ej., Wei et al. 1997, Chen & Ma 1998, Link et al. 1998, Agazzi & Pirola 2000) han realizado comparaciones entre varios métodos de digestión propuestos por la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos, que utilizan el horno microondas para el calentamiento de las muestras. Estos métodos son: el método USEPA 3050 (USEPA 1990a) (HNO₃, HCl y H₂O₂), el método USEPA 3051 (USEPA 1990b) (HNO₃), el método USEPA 3051A (USEPA 1998) (HNO₃ y HCl) y el método USEPA 3052 para matrices silíceas (USEPA 1996) (HNO₃, HCl y HF). Los resultados muestran recuperaciones ligeramente superiores en el caso del método USEPA 3052, como consecuencia de la utilización de HF.

Del resto de métodos ensayados, el método USEPA 3051A ofrece mejores recuperaciones y resulta ser, de acuerdo con estos autores (Chen & Ma 1998, Link et al. 1998), un método fácilmente reproducible en otros laboratorios. Estos resultados se deben a la utilización de HCl, respecto al método USEPA 3051, el cual posibilita la complejación y estabilización de determinados elementos debido a la presencia del ión cloruro (Cl⁻), como consecuencia de la reacción general II (Link et al. 1998, Cámara et al. 2002):



Finalmente se seleccionó el método USEPA 3051A (USEPA 1998) para la realización de las digestiones en horno microondas de la presente Tesis, teniendo en cuenta los resultados de los autores citados anteriormente y a los buenos resultados obtenidos en las Tesis Doctorales realizadas en el Centro de Investigaciones sobre Desertificación (CIDE) con la utilización de dicho método para las digestión de suelos agrícolas de la Comunidad Valenciana durante la realización de su Tesis (Micó 2005, Peris 2005).

Reactivos y limpieza de material

Los ácidos utilizados en la fase de análisis fueron de calidad analítica reconocida (J.T.Baker, “Baker Analyzed”): HNO₃ al 65% (v/v), HClO₄ al 70% (v/v) y HCl al 37% (v/v). Por otro lado, para la limpieza de material se utilizó agua desionizada (resistividad eléctrica <12 MW cm) generada por un sistema Milli-Q® (Millipore, MA, USA).

La limpieza del material utilizado en las digestiones se realizó a través de una serie de enjuagues seriados. El material de las digestiones fue mantenido en una solución acuosa de HNO₃ al 20% durante toda la noche (aproximadamente 16 horas). Al día siguiente, el material fue lavado y enjuagado con agua desionizada varias veces y secado al aire sobre papeles de filtro antes de su utilización, con el objetivo de evitar la contaminación del material.

Desarrollo del método

En cada tanda de digestión, se preparó al menos un blanco de método, para evaluar posibles problemas de contaminación durante el proceso de digestión de las muestras. Los blancos de método contienen los reactivos utilizados y no incluyen muestra de suelo, si bien se ven sometidos al proceso completo de digestión. Todos los blancos quedaron cerca o por debajo del límite de detección instrumental, indicando un adecuado proceso de digestión y una contaminación nula entre muestras.

Para realizar la digestión de las muestras de suelo en horno microondas, se pesaron aproximadamente 0.5 g de suelo pulverizado (con una precisión de ± 0.001 g) en vasos de tetrafluorometoxilo (TFM). A cada uno de los vasos se le añadieron 9 ml de HNO₃ 65 % (v/v) y 3 ml de HCl (1:1), cerrando adecuadamente los vasos según las instrucciones de seguridad. Las preparaciones se situaron en el interior del horno microondas modelo MILESTONE® Ethos D, en un rotor HPR 1000/6M con capacidad para 10 vasos, introduciendo la sonda de temperatura en el vaso control. Por cada tanda, se prepararon un blanco y nueve muestras. Los vasos se calentaron durante 5 minutos con una potencia de 700W hasta alcanzar una temperatura de 180°C, y se mantuvieron a la misma temperatura durante 10 minutos con una potencia de 500W. Una vez finalizada la digestión se dejaron enfriar los vasos durante el tiempo necesario y la solución resultante se centrifugó durante 5 minutos a 3500 rpm en una centrifuga HERAEUS® Megafuge 1.0. Finalmente, el sobrenadante se transvasó a un matraz y se enrasó a 25 ml con agua desionizada.

La solución resultante se conservó en botes de plástico, previamente lavados con agua desionizada, y se almacenaron a 4°C hasta su determinación por Espectrometría de Absorción Atómica (EAA). Todas las muestras de suelo fueron analizadas con tres repeticiones y los resultados se expresaron en mg/kg de suelo seco.

Evaluación de la exactitud y precisión de los métodos de digestión

La exactitud y precisión de los métodos de digestión fueron evaluadas mediante la utilización de un material de referencia certificado (CRM) (Quevauviller 1996, Namiesnik & Zygmunt 1999). De entre los diferentes tipos de materiales de referencia existentes, se seleccionó aquél de mayor semejanza a las características de la matriz de los suelos objeto de estudio. Por ello, se utilizó un suelo calcáreo (CRM 141R - Certified Reference Material 141R “Calcareous Loam Soil”) comercializado por el *Community Bureau of Reference Sample* (BCR) (Quevauviller et al. 1996a).

El procedimiento consistió en determinar los contenidos de metales pesados en el CRM 141R mediante la aplicación del método de digestión descrito. Posteriormente, los resultados obtenidos se compararon con los valores certificados, con el fin de estimar la exactitud, expresada como el porcentaje de recuperación, y la precisión, expresada como la desviación estándar relativa.

El porcentaje de recuperación del Cu (% R) se calculó a partir del cociente entre la media de las réplicas de CRM tras la aplicación del método seleccionado en esta Tesis (Xcalculado) y el valor certificado soluble en agua regia (Xcertificado), multiplicado por 100 (ecuación 5). En general, se aceptan como satisfactorios valores entre el 80 y el 120% (Chen & Ma 1998).

$$\% R = \frac{X_{\text{calculado}}}{X_{\text{certificado}}} * 100 \quad (5)$$

Por otro lado, se calculó la desviación estándar relativa (DER) para evaluar la precisión del método. La DER se calculó para las diferentes réplicas realizadas con el material de referencia mediante la ecuación 6, donde DE es la desviación estándar y X es la media aritmética obtenida tras analizar las distintas réplicas. En general, se considera que un método de digestión presenta una adecuada precisión si la DER es menor o igual al 20% (Campos et al. 1998, Chen & Ma 1998).

$$DER (\%) = \frac{DE}{X} * 100 \quad (6)$$

En todos los análisis realizados para la consecución del presente trabajo, los porcentajes de recuperación se situaron siempre entre el 85 y 105% y la DER por debajo del 20%, es decir, dentro de los límites admitidos, por lo que se consideraron adecuadas y precisas todas las tandas de digestión llevadas a cabo en el desarrollo de la presente Tesis.

4.5.2 Análisis del contenido extraíble de metales pesados en suelos.

Los metales pesados, incluido el Cu, están presentes en el suelo bajo diferentes formas químicas o tipos de unión. Algunos autores consideran que la determinación de estas formas ofrece una mayor información acerca de la movilidad de los metales en el suelo, así como su disponibilidad

y toxicidad, en comparación con la información proporcionada por los contenidos totales (Cala 1998, Pueyo et al. 2004). Esto es cierto para los suelos con problemas de contaminación antiguos (*aged soil* en inglés), pero no lo es para aquellos con problemas de contaminación muy recientes. Este último tipo de contaminación se produce en suelos agrícolas donde se ha dado un uso continuado y excesivo de pesticidas y fungicidas con base cúprica, donde se han producido derrames y/o vertidos accidentales (Strawn & Baker 2008) o cercanos a actividades extractivas intensivas (Abreu et al. 2008), haciendo que el Cu sea añadido al suelo de manera artificial y aumentando así su biodisponibilidad de manera considerable. En estos casos, los valores extraíbles y los totales suelen ser muy similares por lo que ambos tipos de determinación son válidos para el análisis y evaluación de los suelos con este tipo de contaminación (Mico 2005, Recatalá et al. 2012).

La determinación del contenido extraíble se puede realizar de acuerdo con dos métodos diferentes:

a) Métodos de Extracción Simple. Este tipo de métodos están orientados a determinar las fracciones de metales pesados disponibles para las plantas, cuyo contenido depende de la forma química del elemento y del tipo de unión con los componentes del suelo (Quevauviller et al. 1996b, Sahuquillo et al. 2003). En este caso, la extracción se lleva a cabo en una etapa y mediante la utilización de un único extractante, que tiene la capacidad de extraer los metales pesados presentes en la solución y asociados a diferentes componentes, según la fuerza de extracción del reactivo. Consecuentemente, estos métodos se basan en la suposición que los iones asociados a algunos componentes del suelo pueden ser desplazados de los puntos de adsorción por la presencia de iones competitivos en la solución extractante (Kennedy et al. 1997). Las extracciones simples son comúnmente aplicadas en estudios de fertilidad, para la predicción de los fenómenos de absorción de elementos esenciales, en la diagnosis de deficiencias o excesos y en estudios de disponibilidad de contaminantes, con el objeto de evaluar su transferencia desde el suelo hasta las plantas o cultivos (Ure et al. 1993, Rauret 1998). El principal inconveniente de estos métodos consiste en la dificultad de encontrar un reactivo efectivo que presente una fuerza de extracción cuantitativamente adecuada, en función del tipo de suelo y la fracción que se desea extraer.

b) Métodos de Extracción Secuencial. Estos métodos están enfocados a distinguir las distintas asociaciones entre los metales pesados y los constituyentes del suelo. Para ello, se utilizan diferentes extractantes, de menor a mayor fuerza de extracción, con el objeto de evaluar las diferentes especies de metales presentes (especiación). El esquema de Tessier et al. (1979), inicialmente aplicado a sedimentos, ha sido ampliamente utilizado para la extracción secuencial de metales pesados en muestras de suelo. En este caso, los constituyentes edáficos pueden ser divididos, de forma conceptual, en fracciones específicas de metales pesados que pueden ser extraídas selectivamente mediante la utilización de distintos extractantes (Cala 1995). Así, por ejemplo, el esquema de Tessier et al. (1979) permite distinguir distintas formas de asociación o “pools” como (FI) los metales solubles y de cambio, (FII) los metales unidos a carbonatos, (FIII) los metales unidos a óxidos de

hierro y manganeso, (FIV) los metales unidos a materia orgánica y (FV) los metales presentes en la fracción residual. Los principales inconvenientes de este tipo de métodos se deben a la falta de selectividad de algunos reactivos, los procesos de readsorción de los elementos extraídos, el mayor tiempo de análisis requerido, la dificultad en la interpretación de los resultados y la propagación de errores entre las diferentes etapas (Rauret 1998, Sahuquillo et al. 1999, Stalikas et al. 1999).

Debido a que el presente trabajo contempla el análisis de la absorción y transporte del Cu desde el suelo hasta la planta y su translocación a los diferentes reservorios de ésta, se optó por una extracción simple mediante la utilización de un único extractante, con el fin de estudiar la fracción extraíble de los metales pesados presentes en los suelos agrícolas y realizar una primera aproximación a la disponibilidad de los mismos.

Método para la extracción de metales pesados en suelos

De acuerdo con la literatura consultada, la determinación de la fracción extraíble de metales pesados en suelos calcáreos se ha realizado, principalmente, mediante la utilización de uno de los siguientes extractantes (Beckett 1989, Quevauviller et al. 1996b): EDTA, DTPA y ácido acético. De todos ellos, la extracción con agentes quelantes, y en concreto con EDTA, ha ofrecido resultados más precisos en comparación con el ácido acético, que presenta una menor fuerza extractante (McGrath 1996, Quevauviller et al. 1996b, Ure 1996, Schramel et al. 2000). Así, por ejemplo, Hooda et al. (1997) y Sahuquillo et al. (2003) comparan diferentes métodos de extracción simple y concluyen que el EDTA es el extractante que mejor correlaciona la fracción extraíble de un metal en el suelo con el contenido en plantas. De hecho, diferentes estudios con trazadores isotópicos muestran que el EDTA y las plantas son capaces de remover la misma cantidad para algunos metales (p. ej., Zn) (Tiller 1992). En este contexto, algunas Comunidades Autónomas (p. ej., Andalucía) proponen la extracción con EDTA para llevar a cabo investigaciones adicionales en aquellos suelos con altos contenidos totales (Junta de Andalucía 1999). Sin embargo, otros autores (p. ej., Maíz et al. 1997, Rauret 1998) prefieren la utilización del DTPA o el cloruro de calcio (CaCl_2) para la extracción simple de metales pesados en suelos calcáreos.

La determinación de la fracción extraíble en el área de estudio se realizó con EDTA 0.05M a pH 7.0, mediante una ligera modificación del método establecido por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de Gran Bretaña (MAFF 1986), siguiendo el procedimiento descrito por Boluda et al. (1993). La modificación introducida hace referencia a la proporción suelo:extractante y al tiempo de agitación de la mezcla, factores críticos en el proceso de extracción (Quevauviller et al. 1996b). Este procedimiento ha sido aplicado en otros estudios realizados en la Comunidad Valenciana (p. ej., Andreu 1991, Errecalde et al. 1991, Gimeno-García 1993, Mico 2005, Peris 2005) y es el que se ha utilizado en el presente trabajo. Según diferentes autores (McBride 1995, Quevauviller et al. 1996b, Kennedy et al. 1997, Stalikas et al. 1999, Sahuquillo et al. 2003), el EDTA es capaz de extraer

los metales pesados solubles e intercambiables, unidos débilmente a materia orgánica y, en menor medida, los metales ocultos en minerales secundarios, por lo que la cantidad extraída podría corresponderse con la cantidad de metales pesados disponibles para los cultivos (Beckett 1989, Soon & Abboud 1990, Tiller 1992, McBride 1995, Andreu & Gimeno-García 1996).

Para llevar a cabo la determinación del contenido extraíble de metales pesados en las muestras de suelo, se pesaron 8 g de suelo pulverizado (con una precisión ± 0.01 g) en tubos de centrifuga y se añadieron 35 ml de EDTA 0.05M a pH 7.0, preparado según MAFF (1986). En cada tanda, se analizaron diecinueve muestras y un blanco de método, con el fin de evaluar posibles problemas de contaminación. Los tubos se situaron en un agitador mecánico modelo SELECTA® Rotabit con una agitación horizontal durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga HERAEUS® Megafuge 1.0. El sobrenadante se transfirió hasta matraces de 50 ml, filtrando la solución mediante filtros ALBET® 145. Finalmente, se enrasó con el mismo EDTA utilizado en el proceso de extracción hasta un volumen de 100 ml. La solución obtenida se transfirió a botes de plástico para su conservación a 4°C y posterior determinación por EAA. Todas las muestras se analizaron con, al menos, dos repeticiones y los resultados se expresaron en mg/kg suelo seco.

Evaluación de la exactitud y precisión del método de extracción simple

La evaluación de la exactitud y precisión del método de extracción se realizó mediante la utilización del CRM 700 (Certified Reference Material 700- Certification of the contents of Cd, Cr, Cu, Ni Pb and Zn in an organic-rich soil following harmonised EDTA and acetic acid extraction procedures). El CRM 700 certifica los contenidos de metales pesados tras una extracción con EDTA y ácido acético (Rauret et al. 2001) y está comercializado por el *Community Bureau of Reference Sample* (BCR).

El contenido de metales pesados se determinó mediante la aplicación del método de extracción simple descrito. Los porcentajes de recuperación (% R) se calcularon como el cociente entre la media de las réplicas de los CRM tras la aplicación del método seleccionado en esta Tesis (Xcalculado) y los valores certificados para la extracción con EDTA (Xcertificado) multiplicado por 100 (véase ecuación 5), con el objeto de evaluar la exactitud del método. Por otro lado, se calculó la desviación estándar relativa (DER) tras medir diferentes réplicas (véase ecuación 6), para evaluar la precisión del método.

En general, las recuperaciones obtenidas para los metales pesados certificados suelen ser muy variables, como consecuencia de diferentes factores: (i) interacciones entre el suelo y la solución extractante, que dificultan el proceso de extracción; (ii) bajas concentraciones de los metales pesados en los extractos, próximos a los límites de detección instrumental; y (iii) problemática asociada al proceso de extracción debido a la influencia de factores como la temperatura y el tiempo de agitación,

entre otros (Kennedy et al. 1997). En este caso, los porcentajes de recuperación de Cu extraíble se situaron entre 71% y el 115% para el CRM 700.

En cuanto a la precisión del método, como en caso del contenido total en Cu, las DER obtenidas oscilaron entre un 2% y un 8%, situándose dentro del límite aceptable de acuerdo con diferentes autores (p. ej., Chen & Ma 1998).

4.5.3 Análisis del contenido de metales pesados en cultivos hortícolas.

Al igual que ocurre con los suelos, las plantas y, en concreto, los cultivos hortícolas pueden acumular metales pesados y actuar como reservorios (Kabata-Pendias & Pendias 1991), si bien esta capacidad de acumulación es limitada debido a la aparición de efectos fitotóxicos en función del tipo de cultivo.

Selección del método de digestión

La destrucción de la materia orgánica y la descomposición de las muestras de cultivo pueden realizarse mediante dos métodos (Jones 1985): digestión por vía húmeda con ácidos fuertes; y combustión en horno o mufla a elevadas temperaturas. En la actualidad, la combustión a elevadas temperaturas se emplea en escasas ocasiones debido a las pérdidas por volatilización, a las mayores cantidades de muestra requerida y al mayor tiempo necesario para la completa descomposición. En consecuencia, la digestión por vía húmeda se utiliza mayoritariamente para el análisis de muestras orgánicas y biológicas, como son los cultivos hortícolas. Además, la utilización del microondas disminuye el tiempo de análisis y mejora la eficacia del proceso de digestión (Smith & Arsenault 1996).

Diferentes mezclas de ácidos fuertes se han propuesto para la digestión de muestras biológicas. Algunas de las mezclas más utilizadas han sido (Jones 1985): $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$, $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3\text{-HCl}$ o HNO_3 sólo. Tras realizar varias pruebas con diferentes ácidos y siguiendo el método descrito en la bibliografía más adecuado para este tipo de matrices (método USEPA 3052 para materiales silíceos y matrices orgánicas) (USEPA 1996), se obtuvieron mejores recuperaciones mediante una digestión con $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ en horno microondas, por lo que se seleccionó esta combinación de ácidos para la descomposición de las muestras de cultivos hortícolas.

Método para la digestión de muestras de cultivos

Según se ha indicado anteriormente, el método seguido para la digestión de los cultivos hortícolas consistió en una digestión con $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ en horno microondas, según el método USEPA 3052 (USEPA 1996). Se pesaron 0.500 g (con una precisión de ± 0.001 g) de una muestra homogénea de cultivo hortícola pulverizado y se añadieron 9 ml de HNO_3 65 % (v/v) y 3 ml de H_2O_2 33% (w/v). La mezcla se digirió en un horno microondas MILESTONE® Ethos D durante 15 minutos hasta

alcanzar 200°C con una potencia de 550W, manteniéndose la misma temperatura otros 15 minutos con una potencia de 500W. Una vez finalizada la digestión, la solución resultante se centrifugó durante 5 minutos a 3500 rpm en una centrifuga HERAEUS® Megafuge 1.0. El sobrenadante, se transvasó a un matraz y se enrasó a 25 ml con agua desionizada, conservando el extracto en botes de plástico a 4°C hasta su determinación por EAA. Este método fue aplicado para la digestión tanto de tallos y hojas para lechugas, como para tallos y hojas, y fruto para el caso del tomate. Sin embargo, tanto para las raíces de lechuga como las de tomate, se tuvieron que variar algunos parámetros para poder garantizar su completa destrucción debido a la mayor complejidad y contenido en tejidos resistentes de este tipo de muestras. Concretamente, se pesaron 0.400 g (con una precisión de ± 0.001 g) y se añadieron 8 ml de HNO₃ 65 % (v/v) y 1 ml de H₂O₂ 33% (w/v). El resto del proceso de digestión es el mismo que el descrito anteriormente.

Todas las muestras de cultivo se analizaron con tres repeticiones, añadiendo un blanco de método por cada tanda, con el objetivo de detectar posibles procesos de contaminación. Los resultados se expresaron respecto al peso de materia seca (mg/kg) y se calcularon los factores de conversión para poder expresar los resultados respecto al peso de materia fresca (mg/kg mf).

Evaluación de la exactitud y precisión del método de digestión de cultivos

Al igual que en el caso de los contenidos totales y extraíbles de Cu de las muestras de suelos, la exactitud y precisión del método seleccionado para la digestión de las muestras de cultivos hortícolas se realizó mediante diferentes materiales de referencia certificados (CRM). El CRM 679 (Certified Reference Material 679) (Herzig et al. 2001) se utilizó para establecer la exactitud y precisión del contenido en Cu de las muestras de lechuga; y el NIST 1573^a (tomato leaves) para el Cu total en las muestras de tomate. El procedimiento consistió en determinar los contenidos de metales pesados en ambos materiales de referencia, mediante la aplicación del método de digestión descrito, y la posterior determinación por EAA. Los resultados obtenidos se compararon con los valores certificados, o en su defecto con los valores indicativos, para calcular los porcentajes de recuperación (% R) (véase ecuación 5). La precisión del método se evaluó mediante el cálculo de la desviación estándar relativa (DER) (véase ecuación 6). Las desviaciones estándar relativas estuvieron siempre por debajo del 20%, y las recuperaciones dentro del rango de porcentajes 80-120, que son valores considerados como adecuados y satisfactorios (Chen & Ma 1998).

4.6 Determinación de metales pesados por espectrofotometría de absorción atómica.

El contenido de metales pesados en todas las soluciones obtenidas (suelos y cultivos) en los ensayos llevados a cabo con suelos agrícolas mediterráneos españoles se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (EAA), mediante un espectrofotómetro modelo VARIAN®

SpectrAA 220FS. El espectrofotómetro está equipado con diferentes lámparas de cátodo hueco, que generan luz a la longitud de onda característica para cada elemento, y un automuestreador, que permite inyectar las muestras de forma automatizada mediante el sistema informático SpectrAA 220 versión 2.0 FS.

El límite de detección instrumental (LD) de un elemento es la mínima cantidad que proporciona una señal significativamente diferente a la señal del blanco o fondo para un método dado. El LD fue definido como tres veces la desviación estándar de los resultados de una solución estándar, que presenta una concentración de analito de tres a cinco veces por encima del límite de detección sugerido por el fabricante del espectrofotómetro (VARIAN 1997). Por otro lado, el límite de cuantificación instrumental (LQ) es la mínima cantidad de analito capaz de ser determinada por un método analítico con una precisión y exactitud aceptable. El LQ fue definido como diez veces la desviación estándar de los resultados de una solución estándar, que presenta una concentración de analito de tres a cinco veces por encima del límite de detección sugerido por el fabricante (VARIAN 1997).

La determinación cuantitativa del Cu se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica con atomización por llama (EAA-Llama).

Determinación por EAA-Llama.

La EAA-Llama se basa en la medida de la absorción atómica de los elementos presentes en los extractos obtenidos durante la fase de análisis, tras la pulverización de la muestra y la mezcla con un gas combustible (acetileno) y un oxidante (aire). Además, se empleó una lámpara de deuterio que efectuó la corrección de fondo en los casos requeridos.

En la Tabla 4.3 se presentan los parámetros instrumentales utilizados para la determinación del Cu mediante EAA-Llama. En dicha tabla se presentan las longitudes de onda y la anchura de la banda espectral utilizada para cada elemento, las proporciones aire:acetileno, la necesidad de corrección de fondo, el LD, el LQ y el rango de trabajo. Este último se determinó a partir de las curvas de calibrado, que presentaron un coeficiente de regresión mayor o igual a 0.999, y siguiendo la norma UNE 77309 (AENOR 2001). Para ello se partió de una solución estándar de 1000 mg/l de Cu y se prepararon diferentes patrones abarcando un rango de concentración adecuado.

Tabla 4.3 Parámetros instrumentales considerados para la determinación de Cu por EAA-Llama.

Metal	Longitud de onda(nm)	Anchura banda espectral (nm)	Aire: Acetileno (l/min)	Corrección de Fondo	LD (mg/l)	LQ (mg/l)	Rango de trabajo (mg/l)
Cu	324.8	0.5	13.5:2.0	No	0.01	0.04	0.04-4.00

Por otro lado, el contenido de metales pesados en todas las soluciones obtenidas (suelos y cultivos) en los ensayos llevados a cabo con suelos agrícolas mediterráneos australianos se determinó por espectrometría de Emisión Atómica (EEA), mediante un espectrofotómetro modelo Agilent® MP-AES 4100. El espectrómetro está equipado con plasma magnético de alta resolución, un monocromador que selecciona las diferentes longitudes de onda características para cada elemento y un detector de alta eficiencia CCD. Además, también incluye un automuestreador, que permite inyectar las muestras de forma automatizada.

El LD fue definido como tres veces la desviación estándar de los resultados de una solución estándar, que presenta una concentración de analito de tres a cinco veces por encima del límite de detección sugerido por el fabricante del espectrofotómetro (Agilent).

La determinación cuantitativa del Cu se realizó mediante espectrometría de emisión atómica con atomización por plasma de microondas (MP-AES, inglés).

Determinación por MP-AES.

El MP-AES se basa en la medida de excitación atómica de los elementos presentes en los extractos obtenidos durante la fase de análisis, tras la pulverización de la muestra y la mezcla con nitrógeno, administrado a través de una bomba periférica, en la linterna de plasma. La luz emitida por los átomos es filtrada por el monocromador y recibida en el detector de alta eficiencia CCD, el cual mide la intensidad y corrige el ruido de fondo de manera simultánea.

Los parámetros instrumentales utilizados para la determinación del Cu mediante MP-AES fueron los siguientes: la longitud de onda seleccionada fue también 324.8 nm, el límite de detección fue de 0.001 mg/l y el rango de trabajo varió entre 0.1-50 mg/l. Nuevamente, este último se determinó a partir de las curvas de calibrado, que presentaron un coeficiente de regresión mayor o igual a 0.999, y siguiendo la norma UNE 77309 (AENOR 2001). Para ello se partió de una solución estándar de 1000 mg/l de Cu y se prepararon diferentes patrones abarcando un rango de concentración adecuado. Algunos de los parámetros indicados en la EAA-Llama ya no son necesarios en este caso ya que el instrumento de análisis presenta avances tecnológicos que no lo hacen necesario. Así por ejemplo, la corrección de fondo se hace de manera automática en el detector y no es necesario indicar la proporción de gases combustibles ya que estos han sido sustituidos por nitrógeno.

4.7. Descripción de métodos estadísticos.

La mayoría de los tratamientos estadísticos fueron aplicados a los valores de biomasa, aunque las correlaciones y las regresiones fueron aplicadas a las concentraciones de Cu determinadas en cada una de las dosis para cada uno de las partes que se diferenciaron en los test de acumulación. El tratamiento estadístico de los datos experimentales se realizó utilizando el SPSS © versión 19.

4.7.1 Estudio de la distribución de las poblaciones.

La distribución de las poblaciones puede evaluarse de diferentes maneras, siendo gráficamente a través de los histogramas de frecuencia una de las más utilizadas. Sin embargo, para una mejor caracterización es necesario utilizar determinados tests estadísticos, que permiten confirmar si la población se ajusta a una distribución normal. El test de Shapiro-Wilkinson se aplica a poblaciones con menos de 50 muestras ($n < 50$), mientras que el test de Kolmogorov-Smirnov se utiliza para poblaciones mayores o iguales a 50 muestras ($n > 50$).

En este caso, para comprobar la normalidad de las muestras se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov. Este test compara los datos de la muestra con otros datos establecidos como distribución normal con la misma media y desviación estándar. Si el resultado del test es no significativo (p -valor > 0.05), señala que la distribución de la muestra no es significativamente diferente de una distribución normal, es decir, es probable que sea normal. Sin embargo, si el resultado del test es significativo ($p \leq 0.05$), entonces la distribución en cuestión es significativamente diferente de una distribución normal y por tanto es no normal (Field 2009).

Seguidamente, para comprobar la homogeneidad de la varianza se aplicó el test de Levene. Este test se utiliza para evaluar la hipótesis de las varianzas iguales (homogeneidad de la varianza). En concreto, examina si hay diferencias significativas entre las varianzas de los grupos, en los que se puede dividir/clasificar la muestra. Cuando se comparan grupos, el test de Levene analiza la hipótesis nula, la cual establece que las varianzas de los diferentes grupos son iguales (es decir, que la diferencia entre las varianzas es cero). Si el resultado del test de Levene es significativo ($p \leq 0,05$), entonces se puede concluir que la hipótesis nula es incorrecta y que las varianzas son significativamente diferentes en diferentes grupos. Sin embargo, si el resultado del test es no significativo ($p > 0,05$), las varianzas pueden considerarse estadísticamente iguales y se puede asumir la homogeneidad de las varianzas.

En función de estos resultados, así como de los tamaños muestrales de los grupos que se comparan, se seleccionaron diferentes pruebas de significación y de contraste.

4.7.2 Pruebas de significación y contraste.

Una vez realizados el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene, se realizaron diferentes pruebas de significación, las cuales son contrastes de hipótesis utilizadas para comparar dos o más poblaciones y determinar si existen diferencias significativas entre ellas.

Los tests del ANOVA se utilizan para la comparación de medias, evaluando la similitud entre tres o más medias, de forma que la hipótesis nula del test supone que todas las medias son iguales.

Para aplicar el test del ANOVA es deseable que la distribución de la muestra sea normal (Kolmogorov-Smirnov, $p > 0,05$) y con varianzas homogéneas (Levene, $p > 0,05$). Sin embargo, el

test del ANOVA es una prueba estadística bastante robusta y se puede aplicar cuando no se cumplen los supuestos anteriores, siempre y cuando el tamaño muestral de los grupos sea igual (Field 2009).

Así, considerando todas estas posibilidades, la biomasa producida para las diferentes dosis y suelos se comparó aplicando, en primer lugar, el test del ANOVA de doble vía para conocer si tanto el suelo como la dosis eran factores relevantes para la producción de biomasa ($p < 0.05$). Una vez aplicado el test del ANOVA de doble vía, en los casos en que las medias eran significativamente diferentes, se aplicó el test del ANOVA de una vía para corroborar los resultados del ANOVA de doble vía, comparando las medias de cada factor.

Los tests de ANOVA son tests colectivos que se utilizan para identificar un efecto experimental general. Sin embargo, no proporcionan información específica acerca de qué grupos se han visto afectados. Es decir, determinan si las medias son o no significativamente diferentes, pero, en caso de serlo, no señalan cuales son las medias estadísticamente diferentes. Por tanto, después de los tests de ANOVA es necesario realizar más análisis para concretar que grupos son diferentes. Así, cuando con los tests de ANOVA de una vía se encontraron diferencias significativas, se aplicaron tests de contraste o *post hoc*.

Las diferentes pruebas de contraste que se pueden elegir se resumen en la siguiente Tabla 4.4.

Tabla 4.4 Tests de contraste utilizados para la prueba ANOVA de un factor.

	Tamaños muestrales iguales ($n_1=n_2...$)	Tamaños muestrales no iguales ($n_1 \neq n_2...$)
Varianzas Equivalentes	Tukey	Hochberg's
Varianzas No Equivalentes	REGWQ	REGWQ

REGWQ: Ryan, Einot, Gabriel, Welch q test

Éstos acompañan a las pruebas de significación y ayudan a diferenciar claramente cuales de las medias comparadas son realmente significativamente diferentes respecto al resto. A partir de los resultados de la prueba de contraste, se puede concluir que existen diferencias significativas entre las dos medias comparadas para los diferentes grupos si el valor de la significación es bajo y en función del nivel de confianza exigido ($P < 0.01$ o $P < 0.05$).

De manera más concreta, la pruebas de contraste seleccionadas fueron Ryan, Einot, Gabriel, Welch q test (REGWQ) y Tukey.

4.7.3 Correlaciones

Los análisis de correlación se utilizaron para evaluar la importancia e influencia de las diferentes propiedades del suelo consideradas, tanto en la producción de biomasa como la cantidad de

Cu en planta. Para ello, se realizaron análisis de correlación entre las concentraciones efectivas calculadas (EC_{50} y EC_{10}) y las propiedades de suelo; entre las propiedades del suelo y las propiedades del suelo; y entre la dosis aplicada y las propiedades del suelo.

Los tests de correlación se basan en el análisis de la covarianza, que es la media del sumatorio de la combinación de las desviaciones. Más concretamente, estos tests se basan en el análisis de correlaciones bivariadas, es decir, entre dos variables. De esta forma, el cálculo de la covarianza sirve para comprobar si dos variables están relacionadas entre sí. Una covarianza positiva indica que a medida que una variable se desvía de la media, la otra variable se desvía en la misma dirección. Los índices de correlación utilizados fueron los tests de Pearson y de Kendall's Tau, en función de la normalidad de los datos.

La correlación de Pearson es la más ampliamente utilizada, pero requiere que la distribución de la muestra sea normal. Por otro lado, la correlación de Kendall's Tau es otro test estadístico de correlación, pero no paramétrico. Por tanto, puede ser utilizado cuando los valores de la muestra han violado los supuestos paramétricos, tales como la distribución no normal de los valores.

Con los tests de correlaciones se produce una estandarización de la varianza que da como resultado un valor que se sitúa entre -1 y +1. Un coeficiente de +1 indica que las dos variables están perfectamente correlacionadas positivamente. Cuando una variable aumenta, la otra aumenta en su parte proporcional. Por otro lado, un coeficiente de -1 indica una relación negativa completa, es decir, si una variable aumenta, la otra disminuye en su parte proporcional. Un coeficiente de cero indica que no hay relación lineal en absoluto (Field 2009).

4.7.4 Regresiones simples.

Las regresiones son una manera de predecir una variable a partir de otra (regresión simple) o a partir de muchas otras (regresión múltiple) (Field 2009). Por tanto, se utilizaron para tratar de definir la relación de transferencia del Cu del suelo a la planta, y del suelo al fruto, aplicando el SPSS®.

Además, se intentó calcular el límite crítico, ya que, como se ha dicho en la introducción, la máxima cantidad de Cu en la parte comestible de la planta, permitida por la legislación identificada, es de 10 mg/kg en peso fresco. Por tanto, si se obtiene la relación de transferencia del suelo al fruto, se puede calcular el límite crítico de Cu en suelo.

Por otro lado, se debe destacar que la medida de la cantidad de Cu en planta y fruto se hizo en peso seco, ya que es necesario para realizar la digestión. Sin embargo, en la legislación identificada la cantidad de Cu se expresa en peso fresco. Por tanto, antes de calcular las regresiones, se realizó la conversión de peso seco a peso fresco. Como las muestras se pesaron antes y después de secarlas en estufa, se calculó la diferencia de estas pesadas y el factor de conversión para cada suelo, a aplicar para poder expresar el contenido en peso fresco. Este factor de conversión se calculó tanto para la planta como para el fruto, ya que el contenido en humedad de ambos tejidos es diferente. Finalmente,

el resultado de cada medición de Cu en planta y en fruto para cada dosis se dividió por su propio factor (individual, de cada uno de los suelos, diferenciando en planta y en fruto).

Las funciones de regresión van acompañadas de dos coeficientes. El coeficiente de regresión (R) muestra la relación existente entre el valor observado y el valor obtenido en la recta de regresión, de tal forma que un mayor valor de R indica una fuerte relación entre variables. Por otro lado, el coeficiente de determinación (R^2) presenta información acerca de la proporción de variación de la variable dependiente que es explicada por el modelo o la recta de regresión, por tanto, a mayor valor de R^2 significa que el modelo se ajusta mejor a los datos, explicando un determinado porcentaje de la variación. Para este trabajo se utilizó el coeficiente de determinación para llevar a cabo de evaluación de adecuación o no de los regresiones calculadas.

4.7.5 Bioacumulación de Cu y Factores de Acumulación

Para analizar y evaluar la distribución y bioacumulación del Cu en las diferentes partes de los cultivos considerados, y establecer así su potencial fitorremediador, se calcularon diferentes factores de concentración (FC), los cuales fueron aplicados en función del tipo de cultivo y los datos disponibles: uno referido a la relación entre el contenido de Cu en suelo y el contenido en raíz; otro referido a la relación entre el contenido de Cu en suelo y el contenido en tallo; otro referido a la relación entre el contenido de Cu en raíz y el contenido en tallo y hojas; y un último referido a la relación entre el contenido de Cu en tallo y hojas y el contenido en fruto.

Los factores de concentración (FC) o factores de bioacumulación (FBA) se pueden definir como “la ratio o relación entre la concentración de un contaminante en un organismo y la concentración del contaminante en el ambiente, donde el organismo puede incorporar dicho contaminante a través de la ingestión de comida contaminada o a través de contacto directo.” (USEPA 2010). Numerosos autores han utilizado este concepto para analizar la bioacumulación de numerosos contaminantes en plantas, explorar la biodisponibilidad de éstos en ciertos ambientes y determinar la capacidad fitorremediadora de las plantas ensayadas (p. ej. McKone & Maddalena 2007, Galfati et al. 2011, Rezvani & Zaefarian 2011), según se ha indicado en el apartado Introducción.

4.8 Análisis con el P-XRF: Obtención de las curvas espectrales y tratamiento de los datos

En los ensayos llevados a cabo con los suelos agrícolas mediterráneos australianos, en los que también se evaluó la idoneidad y adecuación de la fluorescencia de rayos X para la determinación de la concentración Cu en los diferentes tipos de muestras, se llevó a cabo el siguiente proceso, además del descrito anteriormente. Previa a la digestión ácida, y una vez pretratadas (trituradas y tamizadas), todas las muestras pertenecientes al ensayo de acumulación (suelos, raíces y tallos y hojas) fueron

escaneadas con el dispositivo de fluorescencia de rayos-X portátil (P-XRF en inglés). El sistema de fluorescencia de rayos X portátil utilizado consistía de dos unidades independientes: un Amptek Mini-X (fuente) y un espectrómetro Amptek X-123. El Amptek Mini-X contenía un ánodo cerrado, con un voltaje y corriente variable, que era controlado vía Bus Universal en Serie (USB en inglés). La fuente de alimentación era de 50 kV/80 μ A, un objetivo de transmisión de plata y una ventana apical/final de berilio. El espectrómetro Amptek X-123 está formado por un fotodiodo Si-PIN de alta resolución montado sobre un refrigerador termoeléctrico. Este refrigerador reduce el ruido en la señal provocado por el detector y el preamplificador. Además, tenía acoplado una entrada “Field Effect Transistor” (FET) y un preamplificador de carga sensible adaptado. El instrumento completo pesaba menos de 2 kg, por lo que era manejable para el trabajo de campo.

Los tiempos de medida fueron optimizados para cada uno de los tipos de matrices (inorgánicas y orgánicas). Se ensayaron tiempos de escaneo de 30 segundos, 1, 2, 4 y 6 minutos sobre los diferentes materiales de referencia, con la intención de determinar qué tiempo ofrecía la mejor calidad en términos de señal y cantidad de información. Finalmente, los tiempos seleccionados fueron de 2 minutos para las muestras de suelo y de 3 minutos para las muestras orgánicas.

Una vez obtenidas las curvas espectrales, éstas fueron procesadas y pretratadas de manera apropiada para poder llevar a cabo los análisis pertinentes. Las curvas espectrales fueron corregidas con el nivel basal y suavizadas en R[©], utilizando los paquetes hyperSpec y pavo. Una vez procesadas, éstas fueron analizadas considerando sólo las curvas espectrales alrededor de la línea de emisión de 8.05 keV, una de las líneas de emisión características del Cu y la que mayor calidad de señal ofrecía. Una vez hecho esto, se calculó la anchura total a la mitad de la altura (FWHH) y la altura máxima (H_{\max}) para esta línea de emisión, y posteriormente, estos dos parámetros (comunes en el ámbito espectral, y fáciles de calcular) fueron correlacionados con los contenidos en Cu determinados para cada una de las muestras ensayadas, calculándose diferentes funciones lineales. Esto permitió evaluar la idoneidad de estos parámetros para llevar a cabo la cuantificación de este metal a través de esta técnica y analizar su independencia con respecto a los efectos químicos de matriz, uno de los mayores problemas en esta técnica. Se seleccionaron estas dos propiedades debido a la facilidad en el procesado de los datos, ya que la cuantificación llevada a cabo por los instrumentos de FP-XRF ya calibrados realizan dichas estimaciones a través de métodos basados en la radiación primaria dispersa, en el métodos de parámetros fundamentales o en el método de coeficientes empíricos y teóricos influyentes (Markowicz 2011). Todos estos métodos comprenden un complicado procesado de los datos y normalmente se ven afectados por los efectos de matriz (físicos y/o químicos). Los análisis de regresión se llevaron a cabo utilizando Microsoft Excel © 2013.

RESULTS AND DISCUSSION

5. RESULTS AND DISCUSSION

5.1 European Mediterranean agricultural soils cultivated with lettuce (*Lactuca sativa* L.)²

5.1.1 Soil description and properties

Soil properties of the three soils used in the assays are shown in Table 5.1. Soil pH was between 7.8 and 8.5, Electrical Conductivity (EC) in the saturation extract between 1.5 and 17.9 dS/m, Soil Organic Matter (SOM) between 1.6 and 9.7%, Calcium Carbonate Equivalent (CCE) between 36 and 50%, Cation Exchange Capacity (CEC) between 10.1 and 31.0 cmol(+)/kg, clay content between 25 and 41% and sand content between 16 and 31%. The initial Cu content of the soils varied between 8.8 and 44.4 mg/kg.

Table 5.1 Selected properties of the soils used in the assays.¹

Soil	pH _{water}	EC (dS/m)	SOM (%)	CCE (%)	CEC (cmol ₍₊₎ /Kg)	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	Cu (mg/kg)
Rojales	7.8	17.9	1.6	50	10.1	31	44	25	8.8
Sollana	8.5	1.5	3.5	36	19.6	28	37	35	22.1
Nules	8.2	2.2	9.7	37	31.0	16	43	41	44.4

EC: Electrical conductivity, SOM: Soil organic matter content, CCE: Calcium carbonate equivalent content, CEC: Cation exchange capacity.

¹ These results correspond to a sampling carried out in March 2010

5.1.2 Biomass production, dose–response curves and toxicity threshold values for Cu added to soils

The biomass of plant produced for each copper dose and soil is shown in Figure 5.1. The mean biomass of the control treatment (dose 1) ranged from 0.1170 to 0.2280 g. Thus, soils with high SOM and clay content (Sollana and Nules) resulted in higher biomass production. Conversely, high CCE and high salinity (Rojales) resulted in lower biomass production. Slight hormesis (i.e. stimulation of response at low doses followed by inhibition at high doses) was observed for the soil of Nules, although it was not significant ($p < 0.05$) (Figure 5.1). The inhibition of biomass production

² The results presented in this section have been published in the SCI journal *Water, Air and Soil Pollution* with the title ‘Can a single and unique Cu soil quality standard be valid for different Mediterranean agricultural soils under an accumulator crop?’. (Recatala et al. 2012)

caused by the maximum concentration of Cu (dose 6) with respect to the control was 100% for all soils.

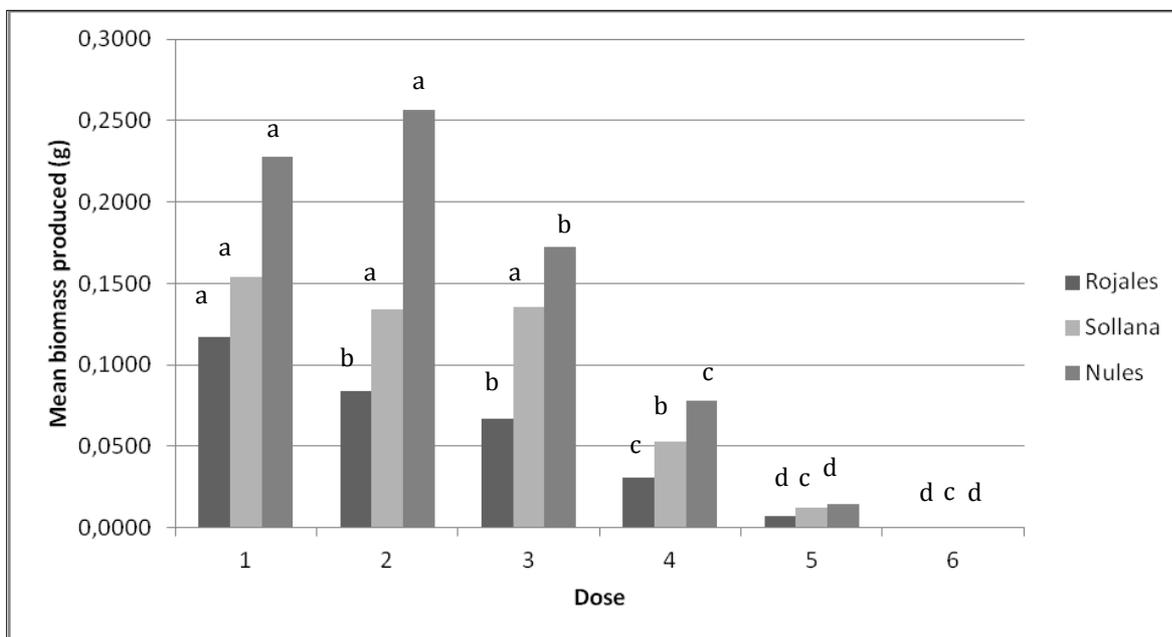


Figure 5.1 Mean biomass produced for each soil and dose. If the letters are equal (a-a, b-b, c-c, d-d) there are no statistical differences between the doses of each soil, whereas if the letters are different (a-b-c-d) there are statistical differences at 0.05 level. Dose 1 was the control. Dose 2 to dose 6 were concentrations representing 1, 5, 25, 50 and 100-times, respectively, the baseline value (65.9 mg_{Cu}/kg) for Cu. Dose 2 = 65.9 mg_{Cu}/kg, dose 3 = 329.5 mg_{Cu}/kg, dose 4 = 1647.5 mg_{Cu}/kg, dose 5 = 3295 mg_{Cu}/kg and dose 6 = 6590 mg_{Cu}/kg.

The application of a two-way ANOVA showed that both soil and dose were relevant factors for the biomass production, since the level of significance was below 0.05 ($p < 0.05$), and that there was an interaction between these two factors (Table 5.2). These results lead to carrying out individual analyses of each factor through one-way ANOVAs (Tables 5.3 and 5.4).

Table 5.2 Two way analysis of variance (ANOVA) for soil and copper doses.

	SS	df	Variance	F	p-value
Dose	0.163	4	0.042	315.743	0.000
Soil	0.081	3	0.027	204.776	0.000
Dose*soil	0.040	12	0.003	25.106	0.000
Total	0.801	60			

SS = Sum of squares.

df = degrees of freedom.

Table 5.3 One way analysis of variance (ANOVA) for each soil.

	Rojales			Sollana			Nules								
	SS	df	F	p-value	SS	df	F	p-value	SS	df	F	p-value			
Factor	0.032	5	0.006	165.013	0.000	0.070	5	0.014	82.420	0.000	0.181	5	0.036	276.776	0.000
Residual	0.001	12	0.000			0.002	12	0.000			0.001	12	0.000		
Total	0.033	17				0.072	17				0.182	17			

SS = Sum of squares.

df = degrees of freedom.

Table 5.4 One way analysis of variance (ANOVA) for each dose ^a.

	Dose 1			Dose 2			Dose 3			Dose 4			Dose 5												
	SS	df	F	p-value	SS	df	F	p-value	SS	df	F	p-value	SS	df	F	p-value									
Factor	0.019	2	0.010	75.201	0.000	0.047	2	0.024	98.889	0.000	0.017	2	0.009	40.558	0.000	0.003	2	0.002	22.155	0.000	0.000	2	0.000	1.730	0.255
Residual	0.001	6	0.000			0.002	6	0.000			0.001	6	0.000			0.001	6	0.000			0.000	6	0.000		
Total	0.020	8				0.049	8				0.018	8				0.004	8				0.000	8			

SS = Sum of squares.

df = degrees of freedom.

^a Dose 6 has not been reported because the one way ANOVA could not be carried out for this dose since no biomass was produced in any of the soils considered.

The results in Table 5.3 showed that there were significant differences in the amount of biomass produced for each dose, analysing each soil separately, since the level of significance for all of them was below 0.05 ($p < 0.05$). The comparison between soils for each dose considered (Table 5.4) also indicated there were significant differences between them ($p < 0.05$). Furthermore, the application of the Tukey test corroborated these significant differences between soils in terms of biomass production for each of the doses under analysis except for the highest dose in which biomass was still produced (Figure 5.1). This meant that, from the 5th dose on, the effect on the biomass production was independent of the type of soil, occurring that for the 6th dose, no biomass was produced in any soil. In fact, the Tukey test grouped both doses for the three soils.

For the soil having both more organic matter and clay content (Nules), biomass production underwent an important change from the third dose on while for the soil having less organic matter content and clay (Rojales) it underwent this change from the second dose on (Figure 5.1). This shows the capacity of organic matter and clay to reduce the toxic effect of Cu on biomass production because both soil components have a high affinity for Cu and can retain it by adsorption reactions (Vega et al. 2010, Mohamed et al. 2010, Soler-Rovira et al. 2010).

In order to know until which concentration such capacity is still effective, dose-response data were fitted to a log-logistic curve according to equation 4 (page 83). For all soils, log-logistic curves could be fitted to the dose-response data ($R^2 \text{ adj.} > 85$) (Table 5.5). All fitted models were judged to be adequate based on distributions of residuals and the relationship between residuals and the fitted values.

Table 5.5 Toxicity threshold values (EC_{10} and EC_{50} , mg / kg) for Cu added to soil derived from the lettuce biomass tests in the three soils studied.

Soil	EC_{10} ^a	95% CI ^b		EC_{50} ^c	95% CI		$R^2 \text{ adj.} (\%)$ ^d
		Lower	Upper		Lower	Upper	
Rojales	8.2	1.1	66.5	177.4	69.3	455.3	89
Sollana	46.1	7.4	300.3	680.1	301.2	1534.1	88
Nules	159.1	83.8	303.5	753.9	548.9	1033.2	97

^a Effective concentrations of added Cu that caused a 10% reduction in the biomass produced.

^b Lower and upper values of the 95% confidence intervals.

^c Effective concentrations of added Cu that caused a 50% reduction in the biomass produced.

^d Percentage of variance accounted for by the log-logistic model.

Toxicity thresholds based on added Cu for all 3 soils are shown in Table 5.5. The EC_{10} and EC_{50} values ranged from 8.2 to 159.1 mg/kg and from 177.4 to 753.9 mg/kg, respectively, indicating that Cu toxicity to biomass production of lettuce was affected by soil properties. Specifically, there was a 19.9 fold variation between soils for the EC_{10} , and a 4.3 fold variation for the EC_{50} . Toxicity threshold values (EC_{10} and EC_{50}) for the soils having high SOM and clay content (Nules and Sollana)

were greater than those obtained for the soil with less content of these components (Rojales), indicating that lettuce biomass production was generally less sensitive to Cu toxicity in soils with high organic matter and clay contents (Nules). In fact, the Pearson's correlation values (chosen due to the normal distribution of the samples) between EC_{10} and EC_{50} and both SOM and clay were positive whereas they were negative for CCE, EC and sand (Table 5.6). Both values were also positively correlated with CEC. This is because SOM and clay are the components responsible for the CEC in soil. In fact, CEC was strongly correlated with clay content and SOM in the soils studied in this work (Table 5.7), i.e. the soils highest in CEC (Nules and Sollana) are also the highest in clay content and in SOM (Table 5.1). According to these results, risk assessment of Cu exposure should be different depending on soil type, and particularly, it should be different depending on soil organic matter and clay contents.

In addition, it must be highlighted that both the EC_{10} and EC_{50} values for all three soils are much lower than 6590 mg/kg, which is the limit (100-times the baseline value, 65.9 mg/kg for Cu) established by the Spanish National legislation (BOE 2005) to declare any soil as contaminated by Cu. More specifically, the EC_{50} values for Rojales, Sollana and Nules correspond to 3, 10 and 11–times, respectively, the baseline value, and the EC_{10} values for these three soils correspond to 0.1, 0.7 and 2.4–times, respectively, such value. This clearly means that the minimum legal concentration used to declare soils as contaminated by copper established by the Spanish legislation seems not valid from the point of view of the effect of such concentration in soil on the crop growth. Taking into account that in this work a soil is considered as contaminated when the concentration of Cu in it reduces the biomass production significantly (between 10 and 50%), the soil quality standard for the soils assayed must correspond to a value between their respective EC_{50} and EC_{10} values. This value will depend on the politicians and/or farmers' compromise with yield production and, therefore, with soil productivity. In any case, for all the soils assayed in this work, the soil quality standard to declare a soil as contaminated by Cu, considering the soil productivity function must be much lower than the present legal quality standard for this metal, being more restrictive for soils having low organic matter and clay contents. Furthermore, it is important to avoid situations in which plants grown in contaminated soils accumulate concentrations of Cu that are non toxic for them but toxic to animals and humans eating these plants. This issue is discussed in the next section.

Table 5.6 Correlation coefficients of EC_{50} and EC_{10} with different relevant soil properties.

	SOM	EC	Sand (%)	CEC	CCE	Clay (%)
EC_{50}	0.762	-0.988	-0.738	0.896	-0.984	0.985
EC_{10}	1	-0.667	-0.999	0.974	-0.647	0.912

Correlation values are significant at 0.05 level.

EC: Electrical conductivity, SOM: Soil organic matter content, CCE: Calcium carbonate equivalent content, CEC: Cation exchange capacity.

Table 5.7 Correlation coefficients between the soil properties analysed.

	SOM	EC	Sand (%)	CEC	CCE
EC	-0.419				
Sand (%)	-0.706	-0.121			
CEC	0.964	-0.456	-0.795		
CCE	-0.691	0.458	0.779	-0.858	
Clay (%)	0.904	-0.914	-0.888	0.981	-0.903

Correlation values are significant at 0.05 level.

EC: Electrical conductivity, SOM: Soil organic matter content, CCE: Calcium carbonate equivalent content, CEC: Cation exchange capacity.

5.1.3 Metal content analysis

Table 5.8 shows the mean Cu concentration determined in plant and in soils. For this latter, two different contents were distinguished: total and extractable.

The analysis of the total concentration of Cu in soil and the extractable fraction indicated that this latter increased as the concentration of Cu in soil also did. It is important to point out that the percentage of total Cu in soil that is bioavailable (extractable) is high for all the doses assayed. This is normal considering soils were spiked with a contaminant solution and, although not realistic for aged contaminated soils, these conditions realistically reflect those that could take place in agricultural soils as a result of an excessive Cu-based pesticide and fungicide application, or due to spills (Strawn & Baker 2008) or intensive extractive activities (Abreu et al. 2008), where Cu is artificially added and is very bioavailable. Therefore, in these cases, extractable and total content tend to be similar, so both of them can be considered when analysing contamination effects in these type of soils (Mico 2005, Recatalá et al. 2012).

Considering the normal concentration of this essential element in plants established by some authors (Alloway 1995, Adriano 2001), which varies from 5 to 20 mg/kg, the concentration of Cu in the crop overcame this range after the second dose for the saline soil (Rojales), while the non-saline soils (Sollana and Nules) overcame this range after the third (Table 5.8). This suggests that copper transfer from soil to plant is affected by different soil properties, being especially relevant salinity, as discussed below. Except for the saline soil, Cu concentration in controls were similar to those achieved by Castro et al. (2009) in a field experiment at the Mediterranean region dealing with the addition of air-dried sewage sludge to soil. Also, for all the controls the concentration achieved in our study was below the phytotoxic level for plants (20 mg_{Cu}/kg), established by several authors (e.g. Alloway & Ayres 1993, McBride 1994, Adriano 2001, Kabata-Pendias & Pendias 2001).

For all soils, Cu content in the edible part of lettuce increases as the dose of Cu increases (Table 5.8). But the concentration factor, which refers to the ratio between the heavy metal concentration in crops (mg / kg dry weight) and in soils, decreases as the metal concentration

increases. This is due to the fact that the accumulation capacity of plant is limited. This has also been observed in field grown crops (Peris et al. 2007). The comparison of the Cu content in the plants grown in the three soils show that, for all the doses, plants grown on Rojasles (saline soil) have a higher metal content than plants grown in the other soils. Moreover, the values of the concentration factor for Rojasles are always above those for Sollana and Nules. This can indicate the effect of salinity on the transfer of Cu from soil to plant. In relation to this, different studies (e.g. Doner 1978, Jiménez 1998, López-Mosquera et al. 2000) have shown that in saline soils the transfer of Cu from soil to plant can be facilitated through the formation of ion chloride complexes. In addition, the substitution of sodium in the exchange positions can produce desorption of some elements such as Cu, increasing their mobility and availability. The Pearson's correlation values (again chosen due to the normal distribution of the samples) between Cu content in plant and salinity is positive and high for all the doses (Table 5.9). Therefore, salinity is a soil property that facilitates the transfer of the metal from soil to plant and its accumulation in this. Taking into account other soil properties, correlation is also positive for CCE and sand, reflecting again the effect of the soil of Rojasles, which has the highest content of these two properties. These correlations show the effect of a coarse texture, which facilitate the transfer of Cu from soil to plant since its capacity for metal sorption is small/low (Adriano 2001).

Regarding the maximum metal content in the edible part established by the identified legislations (Codex 1998, McLaughlin et al. 2000), the critical limit calculated for the different soils show there are important differences between them (Table 5.10). Specifically, the critical limit was below 100 times the baseline value for Cu in the soil with high salinity and low organic matter content (Rojales), whereas in the non-saline soils it was above that value (Sollana and Nules), being higher in the soil with the highest organic matter and clay content (Nules). This means that saline soils cropped with an accumulator crop like lettuce would have to be declared as contaminated soils when the concentration of Cu in soil exceeds their critical limit, which for the case of Rojasles is 1975 mg/kg (that represents 30-times the baseline value for such soil). Therefore it is clear that for saline soils the limit established by the Spanish legislation, that is 6590 mg/kg (100-times the baseline value), seems not to be valid to declare these types of soils as contaminated. For non-saline soils, lettuces could grow even in concentrations of Cu in soils greater than 6590 mg/kg, as the critical limit for these soils is above such a concentration, being greater as the content of organic matter and of clay increase. For instance, for the Sollana soil the critical limit is 8697 mg/kg whereas for the soil Nules is 30817 mg/kg, representing 131 and 467 times, respectively, the baseline value (Table 10). However, it must be highlighted that the values for Sollana and Nules have been extrapolated and that no biomass would be produced if these concentrations were reached, as it has been proved in the assays carried out, were no biomass production was observed when the dose of Cu was 6590mg/kg.

In synthesis, according to the results obtained, it must be pointed out that lettuces cannot grow in soils having a concentration greater than 100 times the baseline value. This is consistent with the toxicity threshold values EC_{50} and EC_{10} obtained for all three soils, which are much lower than 6590

mg/kg, as highlighted in section 5.1.2. In addition, considering the maximum metal concentration allowed in the edible part of the plant established in the identified legislations (Codex 1998, McLaughlin et al. 2000) and the critical limit calculated for each soil, the minimum concentration of Cu in soil for it to be declared as contaminated established by the Spanish legislation seems not to be valid for saline soils (e.g. Salic Fluvisols), since the critical limit will be reached when the concentration is below 100 times the baseline value; while for non-saline soils (e.g. Calcaric Fluvisols and Gleyic Fluvisols), especially when having high organic matter content, this concentration also seems not to be valid since the critical limit is above it. However, as pointed out above, no biomass will be produced in these latter when the concentration was 100 times the baseline value.

Therefore, it can be concluded that for saline soils the soil quality standard to declare a soil as contaminated should be below 100 times the baseline value considering both the effect on the crop growth (biomass production) and the metal accumulation in the edible part of the plant. For non-saline soils such a standard should also be below 100 times the baseline value, in spite the fact the value for the critical limit is above the quality standard established by the Spanish legislation. As mentioned before, in the case of these soils, the toxicity threshold values EC_{50} and EC_{10} are below such quality standard, indicating that Cu toxicity has an important effect on the crop growth. Furthermore, although the critical limit is above the limit established by the Spanish legislation, the assays carried out have shown that no biomass will be produced if these concentrations are reached. Therefore, the quality standard established by the cited legislation is also not valid for these types of soils cropped with lettuce. Hence, the soil quality standard for all the soils considered should correspond to a value between their respective EC_{50} and EC_{10} values, depending on the politicians and/or farmers' compromise with yield production and, therefore, with soil productivity, as commented before. Therefore, in conclusion, it can be stated that a single and unique Cu soil quality standard cannot be valid for different Mediterranean agricultural soils under an accumulator crop.

Finally, it must be highlighted that in order to compare the results obtained for the different soils, the experiment carried out had to be done under controlled conditions. This way differential effects due to environmental factors (e.g. rains) and human influence/activities (soil management practices such as irrigation) are avoided and results can be compared. Furthermore, adding metal to the soil following standard protocols is the only way to calculate different ecotoxicological values for different soils but in the same environmental conditions. It is important to take into account that the conditions created following this procedure are not fully realistic since, generally, soils in natural conditions do not usually have metal concentrations as high as the ones needed in order to conduct the experiment, although they can be reached due to intensive extractive activities, due to accidents and spills or due to inappropriate management of agricultural soils, as commented previously. Therefore, the results obtained can be useful as guidance when establishing adequate soil quality standards for the European Mediterranean Region.

It is important to stand out that these values for guidance could be used for all the European Mediterranean Region since the baseline value used in the assays carried out in this work is similar to those established in other Spanish Mediterranean regions such as the Madrid region (Perez et al. 2000) or Murcia region (Perez et al. 2002) and in other European Mediterranean regions, such as in the Piedmont region of Italy (Facchinelli et al. 2001) or the central region of Greece (Mitsios & Golia 2005) taking into account that the heavy metal concentrations determined in the study area (Micó et al. 2006, Peris et al. 2008) are similar to those analysed in those regions.

Table 5.8 Mean copper content in the edible parts of lettuces (mg / kg in dry weight basis), and total and extractable contents of copper in soils (mg / kg in dry weight basis).

Dose Cu ^a (mg/kg)	Rojales				Sollana					
	Total content of Cu (mg/Kg) in soil	Extractable content of Cu (mg/Kg)	Total content of Cu in crop ^b (mg/Kg)	E/T ^c (%)	CF ^d	Total content of Cu (mg/Kg) in soil	Extractable content of Cu (mg/Kg)	Total content of Cu in crop ^b (mg/Kg)	E/T ^c (%)	CF ^d
1 (control)	8.9 ± 1.0	1.5 ± 0.1	18.0 ± 3.0	16.8	2.03	22.07 ± 3.00	7.5 ± 0.6	10.06 ± 2.00	34.1	0.46
2	77.0 ± 9.0	61.0 ± 4.0	16.5 ± 3.0	79.2	0.21	69.97 ± 8.00	60.1 ± 4.0	12.42 ± 2.00	87.0	0.18
3	365.1 ± 44.0	341.5 ± 25.2	20.1 ± 3.0	93.4	0.06	403.18 ± 49.00	320.1 ± 24.7	14.86 ± 3.00	79.4	0.04
4	1549.7 ± 188.0	1498.9 ± 117.0	50.5 ± 9.0	96.7	0.03	1607.65 ± 195.00	1570.9 ± 115.9	24.01 ± 4.00	97.6	0.01
5	3271.2 ± 397.0	3183.4 ± 249.0	212.5 ± 36.0	97.3	0.06	3382.54 ± 410.00	3311.4 ± 243.6	74.56 ± 13.00	97.8	0.05
6	5831.0 ± 707.0	5302.1 ± 390.0	----	90.9	----	5853.00 ± 710.00	4784.8 ± 352.3	----	81.7	----

Dose Cu ^a (mg/kg)	Nules				
	Total content of Cu (mg/Kg) in soil	Extractable content of Cu (mg/Kg)	Total content of Cu in crop ^b (mg/Kg)	E/T ^c (%)	CF ^d
1 (control)	44.4 ± 5.0	16.3 ± 1.4	12.6 ± 2.0	36.4	0.28
2	83.4 ± 10.0	60.9 ± 4.1	10.5 ± 2.0	73.5	0.13
3	359.4 ± 44.0	329.5 ± 24.2	16.2 ± 3.0	91.6	0.05
4	1622.9 ± 197.0	1519.5 ± 112.3	23.0 ± 4.0	93.6	0.01
5	2738.7 ± 332.0	2742.2 ± 202.6	29.2 ± 5.0	1.0	0.01
6	5850.0 ± 710.0	4508.0 ± 331.2	----	77.1	----

--= no biomass produced.

^a Dose 1 was the control. Dose 2 to dose 6 were concentrations representing 1, 5, 25, 50 and 100-times, respectively, the baseline value (65.9 mg_{Cu}/kg) for Cu.

Dose 2 = 65.9 mg_{Cu}/kg, dose 3 = 329.5 mg_{Cu}/kg, dose 4 = 1647.5 mg_{Cu}/kg, dose 5 = 3295 mg_{Cu}/kg and dose 6 = 6590 mg_{Cu}/kg.

^b The conversion factors that have to be applied in order to calculate the content of metal in crop in fresh weight basis are the following: 11.2 for Rojales, 17.3 for Sollana and 17.6 for Nules.

^c Relation between extractable (E) and total (T) content of Cu in soil.

^d Concentration Factor, between soil and plant.

Table 5.9 Correlation coefficients between the content of Cu in plant for each of the assayed doses and the soil properties considered.

Total content of Cu in crop	SOM	EC	Sand (%)	Clay (%)	CEC	CCE
Dose 2	- 0.875	0.938	0.857	-0.998	- 0.966	0.926
Dose 3	- 0.477	0.977	0.445	-0.806	- 0.676	0.982
Dose 4	-0.705	0.998	0.679	-0.940	-0.856	0.995
Dose 5	-0.836	0.962	0.816	-0.990	-0.944	0.954

All correlation values are significant at 0.05 level.

EC: Electrical conductivity, SOM: Soil organic matter content, CCE: Calcium carbonate equivalent content, CEC: Cation exchange capacity.

Table 5.10 Critical limit for the soils studied.

	Equation	Critical limit (mg/kg)	Times the baseline value	R ² (%)
Rojales	$y = 0.0053x - 0.47$	1975	30	89
Sollana	$y = 0.0011x + 0.43$	8697	131	89
Nules	$y = 0.0003x + 0.75$	30817	467	88

y: Cu concentration in plant (mg/kg in fresh weight basis), x: Cu total concentration in soil (mg/kg)

In order to increase the knowledge for proposing adequate soil quality standards for heavy metals, other agricultural soils of the Mediterranean region and other important type of crops (non-accumulator crop) were also studied. The results obtained are shown in the following sections.

5.2 European Mediterranean agricultural soils cultivated with tomato (*Solanum lycopersicum* L.)³

5.2.1 Characteristics of soils

The properties of the four soils assayed are shown in Table 5.11. Electrical conductivity (EC) varied between 0.90 and 3.26 dS/m, soil organic matter (SOM) from 1.6 to 8.7 % and calcium carbonate equivalent (CCE) from 39 to 53%. Cation exchange capacity (CEC) varied from 14.5 to 37.1 cmol(+)/kg, and sand, silt and clay content varied from 19 to 49%, from 25 to 41%, and from 25 to 48%, respectively. All the soils assayed are basic, as it is usual in the Spanish Mediterranean Region. The initial Cu content of the soils varied between 12.4 and 58.5 mg/kg.

The soils used in this experiment were the same as the ones in the experiment of lettuce, but this time, a new soil was include in order to broaden the amount of agricultural soils assessed. The

³ The results presented in this section have been published online in the SCI journal *Land Degradation & Development*, with the title 'Increasing the knowledge on the management of Cu-contaminated agricultural soils by cropping tomato (*Solanum lycopersicum* L.)'. The authors are still waiting for the journal to assign the paper a specific volume number and pages. (DOI: 10.1002/ldr.2319)

ones that were repeated had slightly different values for some of the properties. This is due to the fact that the sampling was carried out two years later, and some properties can vary slightly due to different agricultural practices carried out in them.

Table 5.11 Properties of the soils assayed¹.

Soil	pH	EC (dS/m)	SOM (%)	CCE (%)	CEC (cmol(+)/kg)	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	Cu (mg/kg)
Rojales	7.66	0.90	1.6	52	14.5	28	38	33	12.4
Sollana	7.48	2.38	3.8	53	27.6	12	41	47	30.9
Nules	7.72	3.26	8.7	39	37.1	19	34	48	58.5
Peníscola	7.72	1.86	2.7	45	16.8	49	25	25	17.4

EC: electrical conductivity, SOM: soil organic matter content, CCE: calcium carbonate equivalent content, CEC: Cation exchange capacity

¹ These results correspond to a sampling carried out in March 2012

5.2.2 Biomass production data analysis and toxicity threshold values

According to the biomass results obtained for all the soils and doses after the 28 days assays (Figure 5.2), generally, plant biomass produced decreased as Cu concentration in soil increased. However, the toxic effect experimented in each soil differed. For the soil Peníscola, mean plant biomass produced underwent an important reduction after the third dose and continued for dose 4 and 5, ending in no biomass production for dose 6. This can be explained considering its coarse texture, as discussed later. For the soil Nules, slight hormesis (i.e. stimulation of response at low doses followed by inhibition at high doses) was identified. Nevertheless, mean plant biomass production also decreased after dose 3 and a small amount of biomass was produced for dose 6. This can be due to the influence of salinity since it can facilitate the transference of Cu from soil to plant, as also discussed later. For the soils Sollana and Rojales plant biomass decreased gradually after the first dose, as Cu concentration in soil increased. Especially relevant are the results for soil Sollana where plant biomass decreased after the dose indicated, in spite of having the second highest content in SOM and clay. Again, it seems salinity is playing an important role in the availability of copper, being more relevant than SOM and clay content after that dose.

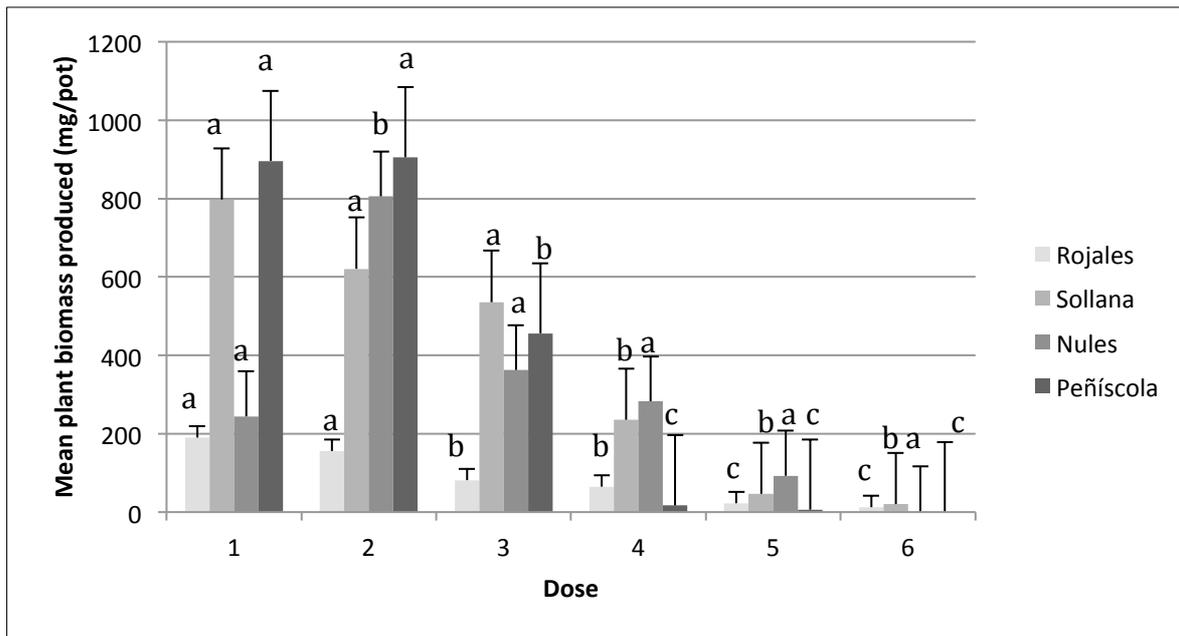


Figure 5.2 Mean biomass produced for each soil and dose. If the letters are equal (a-a, b-b, c-c), there are no statistical differences between the doses of each soil, whereas if the letters are different (a-b-c) there are statistical differences at 0.05 level. Dose 1 was the control. Doses 2 to 6 were concentrations representing 1, 10, 30, 50 and 100 times, respectively, the baseline value ($65.9 \text{ mg}_{\text{Cu}}/\text{kg}$) for Cu. Dose 2= $65.9 \text{ mg}_{\text{Cu}}/\text{kg}$, dose 3= $329.5 \text{ mg}_{\text{Cu}}/\text{kg}$, dose 4= $1647.5 \text{ mg}_{\text{Cu}}/\text{kg}$, dose 5= $3295.0 \text{ mg}_{\text{Cu}}/\text{kg}$ and dose 6= $6590.0 \text{ mg}_{\text{Cu}}/\text{kg}$.

As for the experiment with lettuce, the application of a two-way ANOVA showed that both soil and dose were relevant factors for the biomass production, since the level of significance was below 0.05 ($p < 0.05$), and that there is an interaction between these two factors (Table 5.12). This led to carrying out individual one-way ANOVAs for the independent analysis of these two factors (Tables 5.13 and 5.14).

The results in Table 5.13 showed that there were significant differences in the amount of biomass produced for each dose, analysing each soil separately, since the level of significance for all of them is below 0.05 ($p < 0.05$). The comparison between soils for each dose considered (Table 5.14) indicated there were significant differences between them too ($p < 0.05$). Furthermore, the application of the Tukey test corroborated there were significant differences between soils in terms of biomass production for each of the doses under analysis and corroborated the different toxic effect observed for each soil and described in the previous paragraphs (Figure 5.2).

Table 5.12 Two way analysis of variance (ANOVA) for soil and copper doses.

	SS	df	Variance	F	p-value
Dose	4.004	5	0.801	72.217	0.000
Soil	1.014	3	0.338	30.499	0.000
Dose*soil	1.704	15	0.114	10.244	0.000
Total	13.126	72			

SS = Sum of squares.
df = degrees of freedom.

Table 5.13 One way analysis of variance (ANOVA) for each soil.

	Rojales				Sollana				Nules				Penscola							
	SS	df	Variance	F	p-value	SS	df	Variance	F	p-value	SS	df	Variance	F	p-value	SS	df	Variance	F	p-value
Factor	0.077	5	0.015	44.153	0.000	1.553	5	0.311	13.031	0.000	1.185	5	0.237	16.927	0.000	2.893	5	0.579	93.797	0.000
Residual	0.004	12	0.000			0.286	12	0.024			0.168	12	0.014			0.074	12	0.006		
Total	0.081	17				1.839	17				1.353	17				2.967	17			

SS = Sum of squares.
df = degrees of freedom.

Table 5.14 One way analysis of variance (ANOVA) for each dose.

	Dose 1				Dose 2				Dose 3				Dose 4				Dose 5				Dose 6									
	SS	df	Variance	F	p-value	SS	df	Variance	F	p-value	SS	df	Variance	F	p-value	SS	df	Variance	F	p-value	SS	df	Variance	F	p-value					
Factor	1.207	3	0.402	19.870	0.000	0.996	3	0.332	16.851	0.001	0.353	3	0.118	4.834	0.033	0.149	3	0.050	24.491	0.000	0.013	3	0.004	27.026	0.000	0.0001	3	0.000	4.390	0.042
Residual	0.162	8	0.020			0.158	8	0.020			0.195	8	0.024			0.016	8	0.002			0.001	8	0.000			0.001	8	0.000		
Total	1.369	11				1.153	11				0.547	11				0.165	11				0.014	11				0.001	11			

SS = Sum of squares.
df = degrees of freedom.

Toxicity thresholds based on added Cu for all the soils are shown in Table 5.15. Good adjustment values (R^2 adj. > 80) to the log-logistic equation were achieved for all soils except for Nules. This low value of adjustment can be due to the effect of the hormesis (i.e., stimulation of response at low doses followed by inhibition at high doses) observed in this soil, as indicated by other authors (Schabenberger et al. 1999).

Table 5.15 Toxicity threshold values (EC_{10} and EC_{50} , mg/kg) for Cu added to soil derived from the tomato biomass tests in the four soils assayed.

Soil	EC_{10} ^a	95%CI ^b		EC_{50} ^c	95%CI		R^2 adj. (%) ^d
		Lower	Upper		Lower	Upper	
Rojales	32.9±0.3	7	144	500.7±0.1	263	949	93
Sollana	393.5± 0.2	121	1284	1223.8±0.2	705	2123	81
Nules	491.4±0.6	34	7066	1696.5±0.4	576	4987	50
Peníscola	358.4±0.2	167	766	663.8±0.2	592	774	98

^a Effective concentrations of added Cu that caused a 10% reduction in the biomass produced

^b Lower and upper values of the 95% confidence intervals

^c Effective concentrations of added Cu that caused a 50% reduction in the biomass produced

^d Percentage of variance accounted for by the log-logistic model

The EC_{10} values ranged from 32.9 to 491.4 mg/kg and the EC_{50} values from 500.7 to 1696.5 mg/kg, indicating that the toxicity of Cu over biomass production varied from soil to soil, depending on its properties. More specifically, there was a 14.9 fold variation between soils for the EC_{10} , and a 3.4 fold variation for the EC_{50} . Soils having high SOM and clay content (Sollana and Nules) had higher toxicity threshold values than those having a lower content of these properties (Rojales and Peníscola). These results are logical considering the fact that these two soil properties have high affinity for Cu and can retain it by adsorption reactions (Mohamed et al. 2010, Soler-Rovira et al. 2010).

This influence was corroborated after analysing the Pearson (for normally distributed variables) and the Kendall (for non-normally distributed variables; SOM, CEC and % clay in this study) correlation values between the EC_{10} and EC_{50} values and soil properties (Table 5.16). The effective concentrations obtained for Nules were not considered in this analysis due to its low adjustment to the log-logistic model. As it can be observed, positive values were obtained for SOM, clay content and CEC, while they were negative for sand content. This means that higher toxicity threshold values would be obtained for soils having high SOM and clay content, while low toxicity threshold values would be obtained for soils having high sand content. The high and positive correlation with CEC is due to the fact that SOM and clay are the main components responsible for the CEC in soil, as explained in the results of the previous assay (lettuce and Cu contaminated soils). High positive correlation was also obtained for salinity and EC_{10} and EC_{50} values. This was rather

surprising although it can be explained considering the fact that the soil with the highest SOM and clay content included in this analysis (Sollana) is also the one with the highest salinity.

Table 5.16 Correlation coefficients between soil properties and EC₁₀ and EC₅₀.

		SOM	EC	% Sand	CEC	CCE	% Clay
Pearson	EC ₅₀	0.954	0.890	-0.683	0.999*	0.408	0.833
	EC ₁₀	0.907	0.965	-0.010	0.701	-0.315	0.242
Kendall	EC ₅₀	1.000*	1.000*	-0.333	1.000*	0.333	0.333
	EC ₁₀	1.000*	1.000*	-0.333	1.000*	0.333	0.333

*Correlation is significant at 0.05.

SOM: soil organic matter content, EC: electrical conductivity, CEC: Cation exchange capacity, CCE: calcium carbonate equivalent content

Furthermore, it is important to stand out that both EC₁₀ and EC₅₀ values for the four soils assayed were below the soil quality standard established by the Spanish legislation, which is 6590 mg/kg for Cu (100-times the baseline value 65.9 mg/kg for Cu). More specifically, the EC₅₀ values for Rojales, Sollana, Nules and Peníscola correspond to 7.6, 18.6, 25.7 and 10.1 times, respectively, the baseline value, and the EC₁₀ values to 0.5, 6.0, 7.5 and 5.4 times such value, respectively. This clearly means that the minimum legal concentration used to declare soils as contaminated by Cu established by the Spanish legislation seems not valid from the point of view of the effect of such concentration in soil on crop growth. According to the results obtained, the soil quality standard should be more restrictive for the soils having lower SOM and clay content and coarser textures.

5.2.3 Cu content in soils, plants and fruits and Concentration Factors

Table 5.17 shows the mean Cu concentration determined in fruit, in plant (after 28 days) and in soils. For this latter, two different contents were distinguished: total and extractable.

The analysis of the total concentration of Cu in soil and the extractable fraction indicates that this latter increased as the concentration of Cu in soil also did. However, when analysing the percentage of extractable Cu vs total content of Cu (E/T %), it can be observed that for soils Nules and Sollana it increased at a lower rate than for soils Rojales and Peníscola. This can be explained through the soil properties, and particularly, SOM and clay content, which limit the mobility of Cu, as explained previously (Mohamed et al. 2010, Soler-Rovira et al. 2010). It is also important to point out that the percentage of total Cu in soil that is bioavailable (extractable) is high for all the doses assayed. Again, this is normal considering soils were spiked with a contaminant solution and, although not realistic for aged contaminated soils, these conditions realistically reflect those that could take place in agricultural soils as a result of an excessive Cu-based pesticide and fungicide application and, or due to spills (Strawn & Baker 2008) or intensive extractive activities (Abreu et al. 2008), where Cu is artificially added and is very bioavailable, as it has already been explained.

Table 5.17 Mean copper content in soil (mg/kg in dry weight basis), in plant (mg/kg in dry weight basis), and in the edible part of tomato (ripe fruit) (mg/kg in dry weight basis).

Dose Cu (mg/Kg)	Total Content of Cu (mg/kg)													
	Rojales					Sollana								
	in soil	Extractable	in plant ^a	in fruit ^b	E/T(%) ^c	CF _{s-p}	CF _{p-f}	in soil	Extractable	in plant ^a	in fruit ^b	E/T(%) ^c	CF _{s-p}	CF _{p-f}
control	12.4±1.7	1.5±0.1	23.8±2.5	7.8±1.9	12.1	1.92	0.33	30.9±4.3	12.0±0.6	21.7±2.2	8.2±2.0	38.8	0.70	0.38
65.9	64.1±8.9	45.2±2.4	28.8±3.0	7.3±1.7	70.5	0.45	0.25	79.1±11.0	52.3±2.8	27.6±2.9	8.1±2.0	66.1	0.35	0.29
659.0	612.5±84.9	409.8±22.0	31.9±3.3	-	67.0	0.05	-	673.8±93.4	512.1±27.4	26.3±2.6	8.6±2.0	76.0	0.04	0.33
1977.0	1879.9±260.7	1713.1±91.8	63.5±6.6	-	91.1	0.03	-	2003.7±277.8	1537.0±82.0	27.8±2.8	7.6±1.8	76.7	0.01	0.27
3295.0	3670.0±480.7	3231.5±173.2	242.5±25.1	-	88.0	0.07	-	2915.8±404.3	2388.9±128.0	28.5±2.5	9.1±2.2	81.9	0.01	0.32
6590.0	6404.5±888.1	6224.1±333.6	641.3±66.4	-	97.2	0.10	-	7080.0±922.8	6506.3±348.7	688.5±71.2	-	91.2	0.10	-
Dose Cu ^a (mg/Kg)	Nules					Peníscola								
	in soil	Extractable	in plant ^a	in fruit ^b	E/T(%) ^c	CF _{s-p}	CF _{p-f}	in soil	Extractable	in plant ^a	in fruit ^b	E/T(%) ^c	CF _{s-p}	CF _{p-f}
control	58.1±8.0	19.0±1.0	17.6±1.8	6.6±1.6	32.7	0.30	0.38	17.4±2.4	6.9±0.4	20.4±2.2	7.6±1.8	39.7	1.17	0.37
65.9	108.5±15.0	62.5±3.3	18.9±2.0	8.8±2.1	57.9	0.17	0.46	76.2±10.6	64.0±3.6	23.7±2.4	7.7±1.9	84.0	0.31	0.32
659.0	683.2±94.7	505.9±27.1	22.0±2.3	6.8±1.6	74.3	0.03	0.31	538.3±74.6	423.9±22.7	31.4±2.8	7.4±1.8	79.4	0.06	0.24
1977.0	2023.1±280.5	1648.9±88.4	26.8±2.8	7.8±1.8	81.5	0.01	0.29	1658.2±229.9	1461.2±78.3	394.1±40.8	8.3±2.0	88.1	0.24	0.02
3295.0	2856.6±396.1	2404.2±128.9	44.4±4.6	7.7±1.9	84.1	0.02	0.17	3185.6±441.7	2827.3±151.5	1187.5±122.9	9.9±2.4	88.7	0.37	0.01
6590.0	6077.8±842.7	4978.8±266.9	1229.2±127.2	8.7±2.1	81.9	0.20	0.01	6476.7±897.9	6034.5±323.4	-	-	93.2	-	-

-=no biomass produced

^aThe conversion factors that have to be applied in order to calculate the content of metal in plant in fresh weight basis are the following: 11.6 for Rojales, 10.2 for Sollana, 10.5 for Nules and 9.9 for Peníscola.

^bThe conversion factors that have to be applied in order to calculate the content of metal in fruit in fresh weight basis are the following: 16.7 for Rojales, 15.6 for Sollana, 14.8 for Nules and 18.5 for Peníscola.

^cRelation between Extractable (E) and Total (T) content of Cu in soil

CF_{s-p}: Concentration factor, between soil and plant.

CF_{p-f}: Concentration factor, between plant and fruit.

Regarding the concentration of Cu in plant, firstly, the results obtained show that Cu content in it increased as the concentration of Cu in soil also did. However, the concentration factor (CF) decreased. This is due to the fact that the accumulation capacity of plant is limited, which has also been observed in field grown crops (Peris et al. 2007). Secondly, the maximum concentration of Cu in plant that does not have phytotoxicity symptoms established by several authors (20 mg/kg) (Kabata-Pendias & Pendias 2001) is exceeded in the control dose for soils Rojales, Sollana and Peníscola; while for soil Nules it is not exceeded until the third dose. This again can be due to the high content of SOM and clay in this soil. However, no phytotoxic symptoms (chlorosis) were observed in the plants for the assays carried out until the third and fourth dose for Peníscola and Rojales, respectively, and until the fifth dose for Sollana and Nules. This is due to the fact that the phytotoxic limit was broadly exceeded at these doses. In the previous ones, Cu content in plant, although exceeding it, were very similar to 20 mg/kg.

A more detailed analysis of these results indicated that the rate of transference of Cu from soil to plant was different for the soils assayed. The transference was, for all soils, low at low doses but increased abruptly at high doses. This sudden increase took place at different concentrations for the different soils, which indicated the differential behaviour of Cu in soils depending on their properties. Both Sollana and Nules, that are the soils having the highest SOM and clay content, underwent an important increase after the fifth dose. However, the concentration of Cu reached in the last dose was different, being higher for soil Nules. This is due to the influence of salinity on the transfer of Cu from soil to plant. Some authors (López-Mosquera et al. 2000) have shown that salinity can facilitate the transference of Cu from soil to plant through the formation of ion chloride complexes. On the other hand, soils Rojales and Peníscola underwent an important change after the fourth and the third dose, respectively, and these soils are the ones having the lowest SOM and clay content. The difference in the dose between these two soils can be due to the texture of Peníscola in which, although having a slightly higher content in SOM, the sand content seems to be having a more relevant influence as coarse textures facilitate the transfer of Cu from soil to plant.

The influence of soil properties on the transfer of Cu from soil to plant is corroborated by the results obtained in the correlation analysis shown in Table 5.18.

Table 5.18 Correlation coefficients between the content of Cu in plant for each of the assayed doses and the soil properties considered.

	Cu in Plant									
	Dose 2		Dose 3		Dose 4		Dose 5		Dose 6	
	Pearson	Kendall	Pearson	Kendall	Pearson	Kendall	Pearson	Kendall	Pearson	Kendall
SOM	-0.868	-0.667	-0.946	-1.000*	-0.386	-0.667	-0.432	-0.333	0.972	1.000*
EC	-0.801	-0.667	-0.937	-1.000*	-0.251	-0.667	-0.319	-0.333	0.827	1.000*
Sand (%)	-0.070	0.000	0.672	0.333	0.944	0.667	0.996*	1.000*	-0.144	-0.333
CEC	-0.696	-0.667	-0.999*	-1.000*	-0.536	-0.667	-0.591	-0.333	0.856	1.000*
CCE	0.983*	0.667	0.552	0.333	-0.185	0.000	-0.159	-0.333	-0.991	-0.333
Clay (%)	-0.263	-0.333	-0.884	-0.667	-0.845	-1.000*	-0.886	-0.667	0.609	1.000*

*Correlation is significant at 0.05.

SOM: soil organic matter content, EC: electrical conductivity, CEC: Cation exchange capacity, CCE: calcium carbonate equivalent content

These results indicated that different soil properties are determinant at different Cu concentration levels. At low doses, the transfer of Cu from soil to plant is mainly influenced by SOM content, CEC and EC (this latter due to the influence of Nules). At medium doses, texture seems to be the most relevant property, and at high doses the retention capacity of soils seems to be exceeded, in spite the amount of SOM or clay content, and salinity seems to be influencing positively the transfer of Cu from soil to plant.

Regarding the metal content in tomato, the concentration of Cu kept low and almost constant for all the doses and for all the soils for which tomato fruits were yielded, in spite the fact that, as it has been discussed previously, the concentration of Cu in plant increases as the concentration in soil also did. In addition, the concentration factor referred to plant and fruit concentrations decreased as soil and plant concentrations increased. Especially interesting were the results obtained for soil Sollana where this concentration factor kept relatively constant. These results extend those obtained by other authors (Angelova et al. 2009, Cintra et al. 2004), since low translocation rates of Cu to tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits were not only obtained at low to medium levels of Cu contamination in soils, but also at high-very high levels of Cu contamination in soils since, for most of the soils, low Cu concentrations were determined in fruits yielded at these concentrations (Table 5.16). Furthermore, the concentration of Cu determined in all the fruits did not exceeded the maximum legal concentration (10 mg/kg in fresh weight basis) established by the identified legislation (Codex 1998, McLaughlin et al. 2000) for any of the soils and doses considered. Finally, regarding the soil quality standard established by the Spanish legislation (BOE 2005), no specific values were calculated and compared to this standard due to the fact that the critical limit could not be established, since the regression analysis carried out had no statistical significance. This seemed

logical considering the fact that Cu content in fruit was almost constant for all the soils (as commented before), making it impossible to adjust the data to any model.

In synthesis, considering the results obtained for both the accumulation of Cu in the edible part of the plant and the toxic effect over plant biomass production, it can be concluded that it would be adequate and feasible to crop tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the representative Mediterranean agricultural soils considered when concentrations determined in them rely between their respective EC_{50} and EC_{10} , since adequate production in terms of biomass and quality of the fruit collected, this last understood as Cu in the edible part of the fruit, would be obtained. For the soils assayed, these values would range between 32.9 to 1696.5 mg/kg, depending on soil properties. Considering the influence of these in Cu soil dynamics, higher effective concentrations would be obtained for soils with high SOM and clay content and low salinity. The low translocation rates observed for all the soils and doses also point out that, even when highly contaminated with Cu (concentrations > 1700 mg/kg), agricultural soils presenting these favourable properties could still be cultivated with tomato, since biomass will still be produced and small concentrations of Cu will be found in tomato fruits.

Moreover, it can also be concluded that the soil quality standard established by the Spanish legislation is not adequate neither from the point of view of the effect of Cu over plant growth nor from the point of view of the accumulation of Cu in the edible part of the plant. According to the results obtained, the soil quality standard for all the soils considered should correspond to a value between their respective EC_{50} and EC_{10} due to what it has already been discussed. Therefore, in conclusion, it can be stated that a single and unique Cu soil quality standard cannot be valid for different Mediterranean agricultural soils under a non-accumulator crop. This broadens the results obtained in accumulator crops like lettuce in which it was also demonstrated that a single and unique Cu soil quality standard cannot be valid for different Mediterranean agricultural soils (Recatalá et al., 2012).

The results obtained can lead to an important progress in land use planning and phytoremediation, since fruit crops could even be cultivated in highly Cu contaminated soils. These agricultural practices would improve the quality of soils through the extraction and accumulation of Cu in the shoots of plants, and at the same time would give them economic value through the production of tomato fruits with a Cu concentration below the maximum limit established by the identified legislation. This is a relevant aspect considering the fact that agricultural soils are increasingly being abandoned as a consequence of heavy metal contamination processes in the European Mediterranean Region (Puga et al. 2006) and other regions of the world (Wang & Björn 2014); and thus, it prevents one of the main land degradation causes to take place. However, field experiments should be carried out in order to assess the influence of other environmental factors (e.g. climate, irrigation practices) in the crop growth and accumulation of Cu.

As for the experiment with lettuce, since the baseline value considered in the assays is similar to those established in other Spanish Mediterranean regions (Pérez et al. 2000, 2002) and in other European Mediterranean regions (Facchinelli et al. 2001, Mitsios & Golia 2005), it is important to highlight that the results obtained could be used as guidance for all the European Mediterranean Region in order to propose adequate and valuable phytoremediation strategies that could be applied to Cu contaminated soils of this region.

Further research in other agricultural areas of the region (Mediterranean), including other soils and crops, would improve the basis for the application of appropriate phytoremediation strategies and for proposing adequate soil quality standards for heavy metals.

5.3 Further investigation in other agricultural soils of the Mediterranean Region: Australia.⁴

5.3.1 Soil characteristics

The soils selected covered a wide range of different soil properties (Table 5.19).

Table 5.19 Properties of the soils assayed.¹

Soil	pH	EC (dS/m)	SOM (%)	CEC (cmol(+)/kg)	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	Cu (mg/kg)
Soil 1	5.36	1.10	3.68	4.16	9.80	10.03	80.17	7.6
Soil 2	5.67	1.34	4.61	13.07	26.20	36.47	37.33	17.6
Soil 3	7.41	2.05	3.54	36.51	42.40	43.40	14.20	15.5

EC: electrical conductivity, SOM: Soil organic matter, CEC: Cation exchange capacity.

¹ sampling carried out on July 2013.

These soils had a pH that varied from 5.36 to 7.41. EC varied from 1.10 to 2.05 dS/m and SOM between 3.54 and 4.61%. CEC ranged between 4.16 and 36.51 cmol₍₊₎/kg, and sand and clay content between 14.20 and 80.17%, and 9.80 and 42.40%, respectively. The initial Cu concentration of the soils varied from 7.6 to 17.6 mg/kg.

5.3.2 Biomass data and toxicity threshold values

According to the biomass results (Figure 5.3), plant biomass production decreased as Cu concentration in soil increased, resulting in no biomass production after a dose of between 65.9-1977.0 mg/kg for all the soils assayed. The dose after which no biomass was produced differed

⁴ The results presented in this section have been sent in paper format to the SCI journal *Scientia Horticulturae*, with the title 'Toxicity and bioaccumulation of Cu in an accumulator crop (*Lactuca sativa* L.) in different Australian agricultural soils'. This paper has been accepted with minor changes to be made.

significantly between soils, being after the second dose (65.9 mg/kg) for Soil 1, after the third dose (6590 mg/kg) for soil 2 and after the fourth dose (1977.0 mg/kg) for Soil 3.

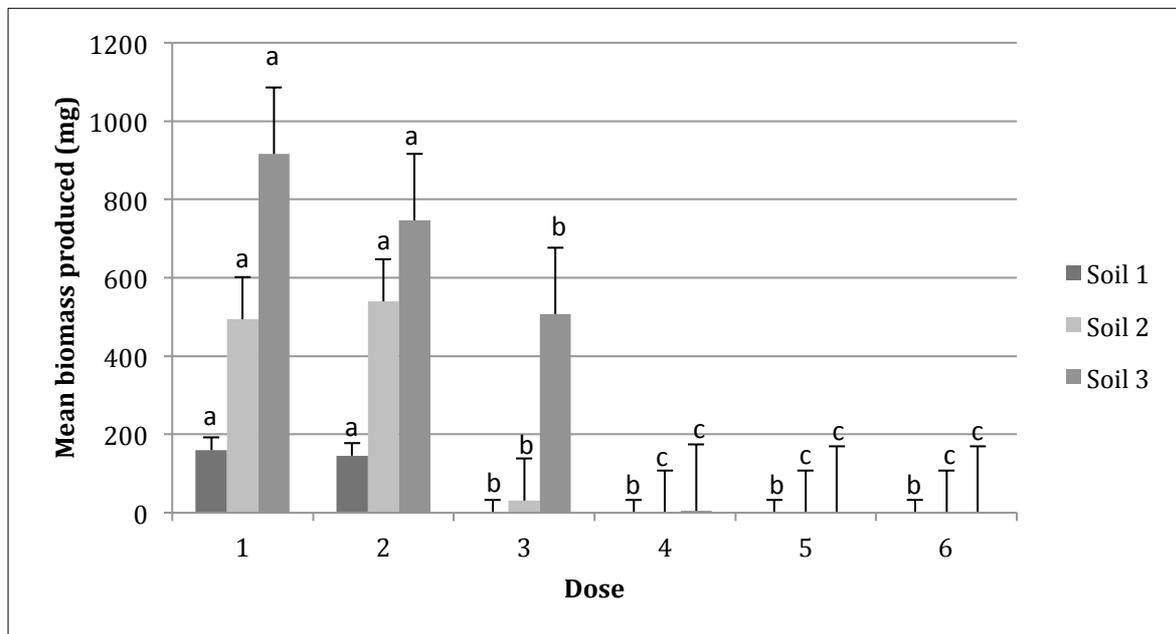


Figure 5.3 Mean biomass produced for each soil and dose. If the letters are equal (a-a, b-b, c-c), there are no statistical differences between the doses of each soil, whereas if the letters are different (a-b-c) there are statistical differences at 0.05 level. Dose 1 was the control, dose 2= 65.9 mg_{Cu}/kg, dose 3=659.0 mg_{Cu}/kg, dose 4=1977.0 mg_{Cu}/ kg, dose 5=3295.0 mg_{Cu}/kg and dose 6590.0 mg_{Cu}/kg.

These results indicated the intense effect of Cu on biomass production of an accumulator plant in these soils since no biomass was produced after a specific dose. This dose differed significantly between soils as commented before, clearly showing the influence of the different soils properties on Cu toxicity. The more acidic soil with the least amount of clay (Soil 1) had no biomass production at a smaller dose compared to the other soils. Therefore, pH and clay content affect the availability of Cu in soil and its toxicity, as discussed later.

The application of a two-way ANOVA showed that both soil and dose are relevant factors for the biomass production, since the level of significance was below 0.05 ($p < 0.05$), and that there was an interaction between these two factors (Table 5.20). This lead again to carrying out independent one-way ANOVAs for each of these two factors (Tables 5.21 and 5.22).

The results in Table 5.21 showed that there were significant differences in the amount of biomass produced for each dose, analysing each soil separately, since the level of significance for all of them is below 0.05 ($p < 0.05$). The comparison between soils for each dose considered (Table 5.22) indicated there were significant differences between them ($p < 0.05$). Furthermore, the application of the Tukey test corroborated there were significant differences between soils in terms of biomass

production for each of the doses under analysis and it clearly indicated where the intense toxic effect of Cu takes place (Figure 5.3).

Table 5.20 Two way analysis of variance (ANOVA) for soil and copper doses.

	SS	df	Variance	F	p-value
Dose	3.615	5	0.723	114.020	0.000
Soil	1.178	2	0.589	92.879	0.000
Dose*soil	1.365	10	0.136	21.521	0.000
Total	9.291	72			

SS = Sum of squares.
df = degrees of freedom.

Table 5.21 One way analysis of variance (ANOVA) for each soil.

	Soil 1				Soil 2				Soil 3						
	SS	df	Variance	F	p-value	SS	df	Variance	F	p-value	SS	df	Variance	F	p-value
Factor	0.123	5	0.025	20.972	0.000	1.383	5	0.277	36.669	0.000	3.460	5	0.692	67.189	0.000
Residual	0.021	18	0.001			0.136	18	0.008			0.185	18	0.010		
Total	0.145	23				1.519	23				3.646	23			

SS = Sum of squares.
df = degrees of freedom.

Table 5.22 One way analysis of variance (ANOVA) for each dose ^a.

	Dose 1					Dose 2					Dose 3					Dose 4				
	SS	df	Variance	F	p-value	SS	df	Variance	F	p-value	SS	df	Variance	F	p-value	SS	df	Variance	F	p-value
Factor	1.150	2	0.575	31.618	0.000	0.745	2	0.372	78.368	0.000	0.648	2	0.324	21.439	0.000	0.000	2	0.000	5.647	0.026
Residual	0.164	9	0.018			0.043	9	0.005			0.136	9	0.015			0.000	9	0.000		
Total	1.314	11				0.788	11				0.784	11				0.000	11			

SS = Sum of squares.
df = degrees of freedom.

^a Dose 5 and 6 have not been reported because the one way ANOVA could not be carried out for these doses since no biomass was produced in any of the soils considered.

Data could be adjusted to the log-logistic equation (R^2 adj. > 80) for all soils and toxicity thresholds established (Table 5.23). The EC_{10} values ranged from 49.03 to 443.10 mg/kg and the EC_{50} values from 103.96 to 728.88 mg/kg, also indicating that the toxicity of Cu over biomass production varied from soil to soil. More specifically, there was a 9.0 fold variation between soils for the EC_{10} , and a 7.0 fold variation for the EC_{50} .

Table 5.23 Toxicity threshold values (EC_{10} and EC_{50} , mg/kg) for Cu added to soil derived from the lettuce biomass tests in the three soils assayed.

Soil	EC_{10} ^a	95%CI ^b		EC_{50} ^c	95%CI		R^2 adj. (%) ^d
		Lower	Upper		Lower	Upper	
Soil 1	49.03±1.69	13.31	180.67	103.96±2.03	14.57	788.08	90
Soil 2	106.87±2.02	14.66	779.18	236.41±2.37	68.81	812.28	94
Soil 3	443.10±2.64	174.52	1125.03	728.88±2.86	559.53	949.50	93

^a Effective concentrations of added Cu that caused a 10% reduction in the biomass produced

^b Lower and upper values of the 95% confidence intervals

^c Effective concentrations of added Cu that caused a 50% reduction in the biomass produced

^d Percentage of variance accounted for by the log-logistic model

The results discussed previously were also observed in the toxicity threshold concentrations calculated. The soil with a higher pH value and containing more clay (Soil 3) had higher toxicity values than those with more acidic pH and more sand (Soil 1 and Soil 2). These results seem logical since it is well known that these soil properties affect Cu availability. Several authors (e.g. Adriano 2001, Rooney et al. 2006) have shown that pH affects the mobility of Cu in soil and its availability. According to Sherameti and Varma (2010), the effect of pH on metal solubility and uptake depends on the metal species, but for most metals their mobility and availability are generally enhanced in acidic soil conditions. On the other hand, clay content has high affinity for Cu and can retain it by adsorption reactions (Mohamed et al. 2010, Soler-Rovira et al. 2010). Furthermore, it is also well known that high sand contents increase the availability of heavy metals since its capacity for metal sorption is low (Adriano 2001).

The influence of the soil properties on the mobility and availability of Cu, and therefore over plant biomass production, was supported by the Pearson's correlation coefficients between the EC_{10} and EC_{50} values and the soil properties (Table 5.24). These correlation results mean that higher toxicity threshold values would be obtained for soils having high pH and clay content, while low toxicity threshold values would be obtained for soils having low pH and high sand content. The high and positive correlation with CEC is due to the fact that clay is the main soil component responsible for the CEC in soil, as explained previously, and therefore, a high correlation with clay will also mean

a high correlation with CEC. High positive correlation values were also obtained for EC, although this is associated to the fact that the soil having the highest EC₁₀ and EC₅₀ is also the one with the highest EC. However, it is important to point out that the salinity values obtained for all the soils are low and that they do not affect significantly the normal growth/development of the plant.

Table 5.24 Correlation coefficients between soil properties and EC₁₀ and EC₅₀.

	pH	SOM	EC	CEC	% Sand	% Clay
EC ₅₀	0.998*	-0.431	0.999*	0.985*	-0.880	0.946*
EC ₁₀	0.999*	-0.486	0.994*	0.981*	-0.848	0.925*

*Correlation is significant at 0.05.

SOM: soil organic matter content, EC: electrical conductivity, CEC: Cation exchange capacity,

Our results broaden the knowledge on Cu toxicity in agricultural soils achieved by other studies (Rooney et al. 2006, Recatalá et al. 2012), highlighting the importance and relevance of pH over the availability of Cu in soils and its effect over biomass production, even in soils with medium contents of clay and SOM. This can be explained through the fact that in soils with an acidic pH these two properties are less reactive due to their charge. Both SOM and clay exchange sites are occupied by protons (H⁺), which have a higher affinity than other cations (including metals) and, therefore, these latter cannot be retained by sorption reactions. As a consequence, their concentrations in the soil solution are higher and, therefore, more bioavailable.

5.3.3 Cu accumulation in plant tissues and influence of soil properties in metal transference

The Cu concentrations determined in soils, roots and shoots are shown in Table 5.25. For all the doses in which lettuce was harvested, the concentration of Cu in plant (both in roots and in shoots) increased as the concentration of Cu in soil also did. However, the increase of Cu in roots and shoots from one dose to the following one was not proportional to the increase of Cu concentration in soils. This was also observed in the concentration factors calculated. This is due to the fact that the accumulation capacity of plant is limited, which has also been observed in field grown crops (Peris *et al.* 2007) and to the influence of the different soil properties, as explained later on.

Regarding the metal concentration in roots, for all the soils, the concentration of Cu determined was higher than the one determined in the edible part of the plant. This is can be adequate considering the fact that roots are in direct contact with the soil and the soil solution, and they are the first plant tissue the metal enters (Sherameti & Varma 2010). Furthermore, when comparing the concentrations of Cu in roots between soils, it can be observed that it varied from soil to soil. The concentrations of Cu in roots of plants grown in Soil 3, that is the one having a higher pH and greater

clay content, and the concentrations factors calculated were lower than the ones obtained for the other two soils, indicating that these two properties are also influencing the transference of Cu from soil to roots.

Regarding the Cu concentration in shoots, firstly, it is important to point out that the maximum concentration of Cu in plant that does not have phytotoxicity symptoms established by several authors (20 mg/kg) (e.g. Kabata-Pendias & Pendias 2001) is not exceeded in any of the dose for which lettuce was collected in soils 1 and 2, but it is exceeded in the fourth dose for Soil 3 (the last dose for which biomass was produced). No phytotoxicity symptoms (chlorosis) were observed in any of the plants collected for any of the assayed soils and doses. Secondly, Cu concentration in shoots increased as Cu content in soils and roots also did. However, for the soils and doses assayed, the maximum Cu content in foodstuffs (10 mg/kg in fresh weight basis-FW) established by Australian legislation (ANZFA 1997) was not exceeded in any of the doses for which lettuces were collected. The same pattern observed in roots was also identified for the Cu concentrations in shoots, were smaller concentrations were determined for Soil 3. This is logical considering the fact that the roots of the plants grown in this soil were the ones that had the lowest concentrations, and therefore, less Cu can be translocated to the aerial parts of the plant.

The influence of soil properties on the transfer of Cu from soil to plant (roots and shoots) was corroborated by the results obtained in the correlation analysis shown in Table 5.26. This analysis was done using the Pearson's correlation index due to the normality of the sample's distribution. For all the doses assayed, large negative correlations between Cu in plant and pH, EC, clay content and CEC, while positive correlations were obtained for SOM and sand content (Table 5.26). Correlation for dose 4 could not be performed since for this dose Cu content could only be determined for one soil. The positive correlation between Cu and SOM is rather surprising since soil organic matter is a soil property that can retain this metal through sorption reactions. However, this effect can be explained through the fact that the soil having the highest sand content and lowest clay content was also the second highest in SOM content. These results show that sand content has a more important influence over Cu availability than SOM in these soils. Therefore, lettuce grown in soils that are acidic and have a large amount of sand will accumulate more Cu in their tissues while those grown in soils with higher pH and clay contents will not accumulate as much.

Table 5.25 Mean copper content in soils, roots and the edible part of lettuce (all the results are expressed in mg/kg in dry weight basis).

Dose Cu ^a (mg/kg)	Soil 1				Soil 2				Soil 3						
	Total content of Cu (mg/kg) in soil	Total content of Cu (mg/kg) in root	Total content of Cu (mg/kg) in leaves ^b	CF ^{s-r} CF ^{r-l}	Total content of Cu (mg/kg) in soil	Total content of Cu (mg/kg) in root	Total content of Cu (mg/kg) in leaves ^b	CF ^{s-r} CF ^{r-l}	Total content of Cu (mg/kg) in soil	Total content of Cu (mg/kg) in root	Total content of Cu (mg/kg) in leaves ^b	CF ^{s-r} CF ^{r-l}			
1 (control)	7.6±4.5	10.6±5.0	1.8±1.0	1.3	0.2	17.6±4.4	8.6±2.4	1.4±0.9	0.5	0.2	15.5±1.0	7.9±6.5	1.5±0.2	0.5	0.2
2	53.7±15.0	53.6±17.9	3.0±0.1	0.9	0.1	74.5±20.7	96.3±9.2	1.6±0.2	1.2	0.1	39.6±12.7	14.0±6.9	3.5±0.6	0.4	0.3
3	658.0±72.0	-----	-----	-----	-----	670.6±48.1	199.9±21.3	10.1±0.8	0.3	0.1	434.9±57.5	60.5±9.3	9.2±0.1	0.1	0.2
4	2281.7±58.1	-----	-----	-----	-----	1808.5±136.2	-----	-----	-----	-----	1985.0±143.9	183.2±15.9	35.5±5.5	0.1	0.2
5	3197.7±498.2	-----	-----	-----	-----	3096.2±540.0	-----	-----	-----	-----	3064.1±146.5	-----	-----	-----	-----
6	7227.8±995.2	-----	-----	-----	-----	5338.0±900.9	-----	-----	-----	-----	5604.5±167.4	-----	-----	-----	-----

-----=no biomass produced

^a Dose 1 was the control, dose 2=65.9 mg_{Cu}/kg, dose 3=659.0 mg_{Cu}/kg, dose 4=1977.0 mg_{Cu}/kg, dose 5=3295.0 mg_{Cu}/kg and dose 6=6590.0 mg_{Cu}/kg

^b The conversion factors that have to be applied in order to calculate the content of metal in plant in fresh weight basis are the following: 8.2 for Soil 1, 8.8 for Soil 2, 9.9 for Soil 3.

CF^{s-r}: Concentration Factor, between soil and root

CF^{r-lp}: Concentration Factor, between root and leaf

Table 5.26 Correlation coefficients between the content of Cu in plant for each of the assayed doses and the soil properties considered.

	Cu in Plant			
	Dose 2		Dose 3	
	roots	shoots	roots	shoots
pH	-0.774	0.597	-1.000**	-0.916
SOM	0.995*	-0.991	1.000**	0.990*
EC	-0.703	0.510	-1.000**	-0.953
CEC	-0.731	0.544	-1.000**	-0.940
Sand (%)	0.325	-0.086	1.000**	0.990
Clay (%)	-0.478	0.250	-1.000**	-1.000*

** Correlation is significant at 0.01

*Correlation is significant at 0.05.

SOM: soil organic matter content, EC: electrical conductivity, CEC: Cation exchange capacity

In conclusion it can be said that this study showed that medium-high concentrations (> 659 mg/kg) of Cu in agricultural soil affect biomass production and bioaccumulation in an accumulator crop like lettuce (*Lactuca sativa* L.). The degree of toxicity and bioaccumulation is influenced by the soil's properties, particularly pH and texture. Neutral to basic pH soils with large clay contents reduced the toxic effect of Cu and the accumulation of Cu in the different parts of the plant. We note, however, that in our experiments the concentration of Cu in the edible part of the plant never exceeded the maximum legal concentration established by Australian legislation (ANZFA 1997). Therefore, we could obtain adequate yields when Cu concentrations in soils were between their respective EC_{50} and EC_{10} values, which varied between 49.03 to 728.88 mg/kg. At these levels, biomass production would not be significantly compromised or could be considered acceptable and the Cu concentration achieved in the edible part of the plant in them would not exceed the maximum legal concentration established by the Australian legislation (ANZFA 1997).

Further research is needed to support and improve the results obtained. Field experiments should be carried out in order to confirm the results obtained on the toxic effect and on the accumulation tendency observed for lettuce. Moreover, other agricultural areas of the region with other types of soils must also be considered. This would also help to improve the basis for proposing adequate soil quality standards for heavy metals in Australia.

5.4 Application of P-XRF for the analysis of Cu contents in soils and plants⁵

5.4.1 Soil properties

The soils used in this assay are the same as the ones used in the previous experiment and therefore, their properties have already been described in Table 5.19. These soils had a pH that varied from 5.36 to 7.41. EC varied from 1.10 to 2.05 dS/m and SOM between 3.54 and 4.61. CEC ranged between 4.16 and 36.51 cmol₍₊₎/kg, and sand and clay content between 14.20 and 80.17%, and 9.80 and 42.40%, respectively. The initial Cu concentration of the soils varied from 7.6 to 17.6 mg/kg.

5.4.2 Spectra processing and analysis

Figure 5.4 shows the spectra obtained after scanning all of the soils, roots and stems/leaves and the subset of the baselined and smoothed emission lines around 8.05 keV for every matrix. As it can be observed, different soil spectra, representing the different Cu concentrations, could be easily differentiated, while it was more difficult for the spectra obtained for roots and even more for those of stems/leaves. This seemed consistent considering that, as it can be observed in Table 2, the range of Cu concentrations determined in soils was bigger than the one for roots and stems/leaves. Although significantly different concentrations were achieved in soils, copper concentrations in roots and stems/leaves were more similar within each group and, therefore, spectra were expected to be closer.

⁵ The results presented in this section have been sent in paper format to the SCI journal *Geoderma*, with the title 'Increasing the knowledge on the rapid assessment of Cu concentrations in agricultural soils and lettuce (*Lactuca sativa* L.) via Portable X-Ray Fluorescence (P-XRF) spectrometry'. This potential paper is still under review.

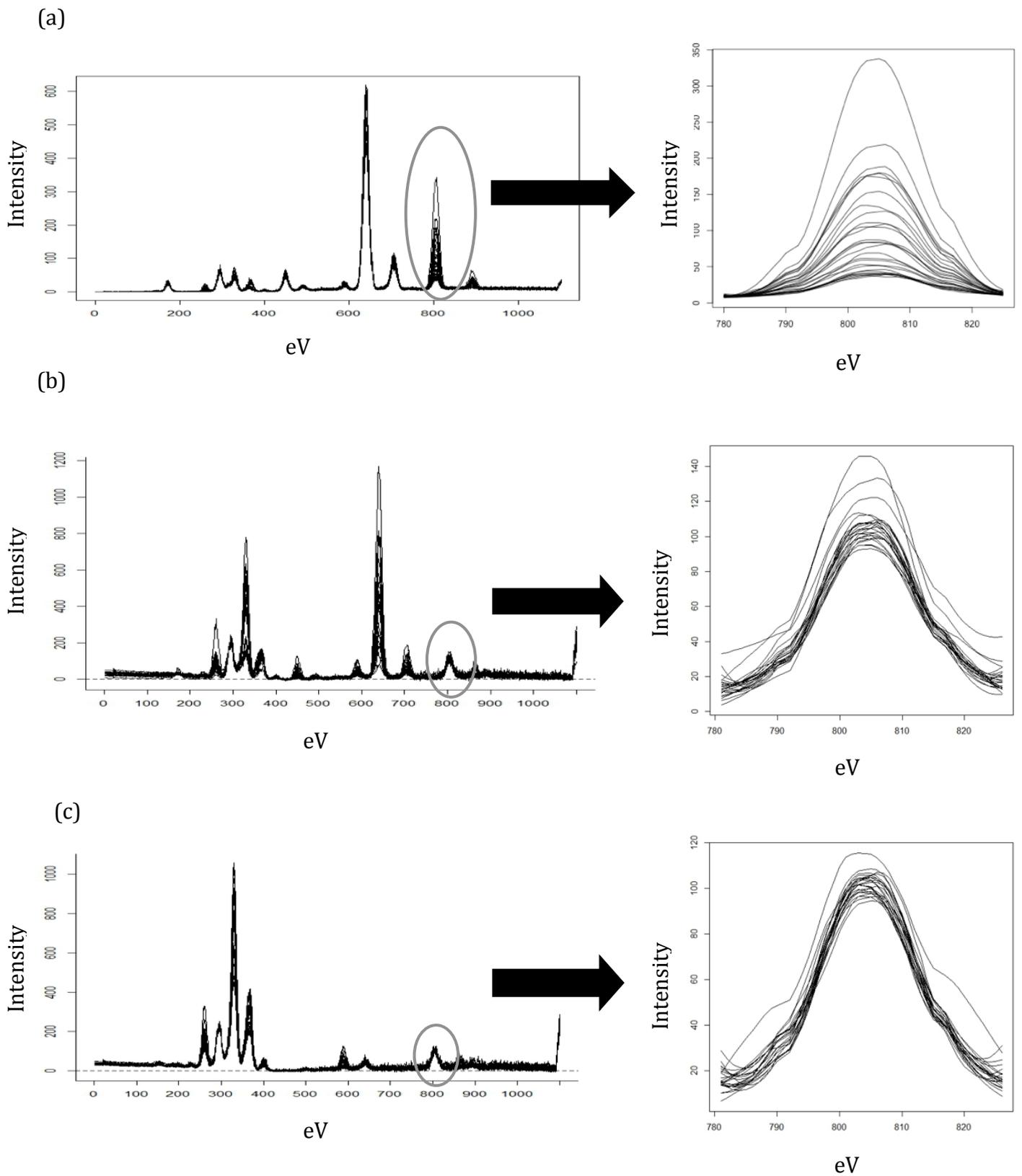


Figure 5.4 Complete XRF spectra and 8.05 (KeV) emission line subset for (a) soils, (b) roots and (c) stems/leaves

The results obtained for the maximum height (H_{max}) and the FWHH calculated for all of the individual spectral lines are shown in Tables 5.27 and 5.28. These were calculated once the spectra were pre-processed and subsetted, as commented in the Material and Methods section.

Table 5.27 Cu content (mg/kg in dry weight basis) for each of the soil samples analysed and the maximum height (H_{max}) and Full Width at Half Height (FWHH) determined after processing each spectrum.

Dose ^a	Soil		
	Cu content (mg/kg) in dry weight basis	H_{max}	FWHH
1.1	7.60	39.06	18
1.2A	19.80	39.58	19
1.2B	53.70	46.05	16
1.3A	658.00	59.13	18
1.3B	914.50	61.44	18
1.4	2281.70	87.06	17
1.5A	3197.70	126.84	17
1.5B	4774.10	134.78	17
1.6	7227.80	180.03	17
2.1	17.60	38.46	19
2.2	74.50	40.21	17
2.3	670.60	51.66	18
2.4A	2692.00	84.41	17
2.4B	1808.50	83.46	18
2.5A	6055.00	188.50	17
2.5B	3096.20	109.27	16
2.6A	19581.00	337.62	17
2.6B	5338.00	175.19	17
3.1	15.50	40.24	19
3.2A	242.10	43.73	17
3.2B	39.60	40.93	17
3.3A	1740.00	69.11	16
3.3B	434.90	53.05	18
3.4A	4974.00	110.90	17
3.4B	1985.00	81.28	17
3.5A	5604.50	154.34	17
3.5B	3064.10	105.23	17
3.6A	12177.00	218.98	17
3.6B	8560.00	179.15	17

^a Dose assayed are noted with soil, dose and replicate. Therefore, 1.2A stands for Soil 1, dose 2 and replicate 1 (A). In the case of soils, only those randomly selected were replicated.

Table 5.28 Cu content (mg/kg in dry weight basis) for each of the roots and stems/leaves samples analysed and the maximum height (H_{\max}) and Full Width at Half Height (FWHH) determined after processing each spectrum.

Dose ^a	Roots			Stems/leaves		
	Cu content (mg/kg) in dry weight basis	H_{\max}	FWHH	Cu content (mg/kg) in dry weight basis	H_{\max}	FWHH
1.1A	9.38	101.81	19	0.80	142.04	17
1.1B	2.33	98.99	19	2.40	152.82	18
1.1C	20.00	107.90	18	1.18	145.21	19
1.2A	38.89	107.83	17	1.79	147.97	17
1.2B	73.58	112.20	17	1.67	146.23	18
1.2C	48.33	107.99	17	5.60	154.86	17
2.1A	6.67	99.01	19	1.54	156.08	18
2.1B	7.89	104.62	17	1.35	151.95	18
2.1C	11.25	105.36	17	1.32	147.34	17
2.2A	71.64	102.78	17	1.85	159.17	18
2.2B	169.57	107.53	17	1.49	152.23	18
2.2C	47.76	102.15	17	1.49	154.36	17
2.3A	305.13	122.19	18	6.20	162.68	17
3.1A	15.19	100.35	18	1.35	138.42	19
3.1B	2.63	94.86	18	1.49	139.27	19
3.1C	6.00	99.54	17	1.52	139.39	18
3.2A	9.41	95.16	18	5.36	149.76	18
3.2B	7.94	92.91	20	42.86	171.89	20
3.2C	24.76	108.02	17	1.61	139.90	19
3.3A	59.32	109.65	18	3.03	146.75	18
3.3B	22.18	108.86	17	2.41	141.57	18
3.3C	100.00	113.40	17	2.90	143.62	18
3.4A	194.44	145.98	17	5.30	150.73	16
3.4B	172.00	133.28	19	7.55	153.51	18

^aDose assayed are noted with soil, dose and replicate. Therefore, 1.2A stands for Soil 1, dose 2 and replicate 1(A).

Again, the results obtained for H_{\max} and FWHH for the different matrices analysed followed the same pattern as the spectra. Better results were obtained for H_{\max} , showing greater variability between samples and doses, and better quality results. Therefore, this was the parameter used to carry out the further analysis. In the case of soils, the heights calculated varied between doses, increasing as the concentration of Cu also did, and covered a broad range of values (between 38.6 and 337.62). For roots and stems/leaves, the height calculated for the different doses also increased as the dose also did. However, the range of values obtained for roots and stems/leaves was not as broad as for soils

(between 92.91 and 145.98, and between 138.42 and 171.89, respectively). This is logical since, as commented before, Cu concentrations determined in them did not vary as much as in soils.

Maximum height (H_{\max}) values were correlated with the Cu concentration determined in each dose and linear regressions were calculated. These regressions were the type of regressions selected for two reasons: firstly, linear functions are simple and robust; and secondly, better adjustment values (R^2) were obtained for this type of regressions. The results obtained are shown in Figure 5.5 and Table 5.29.

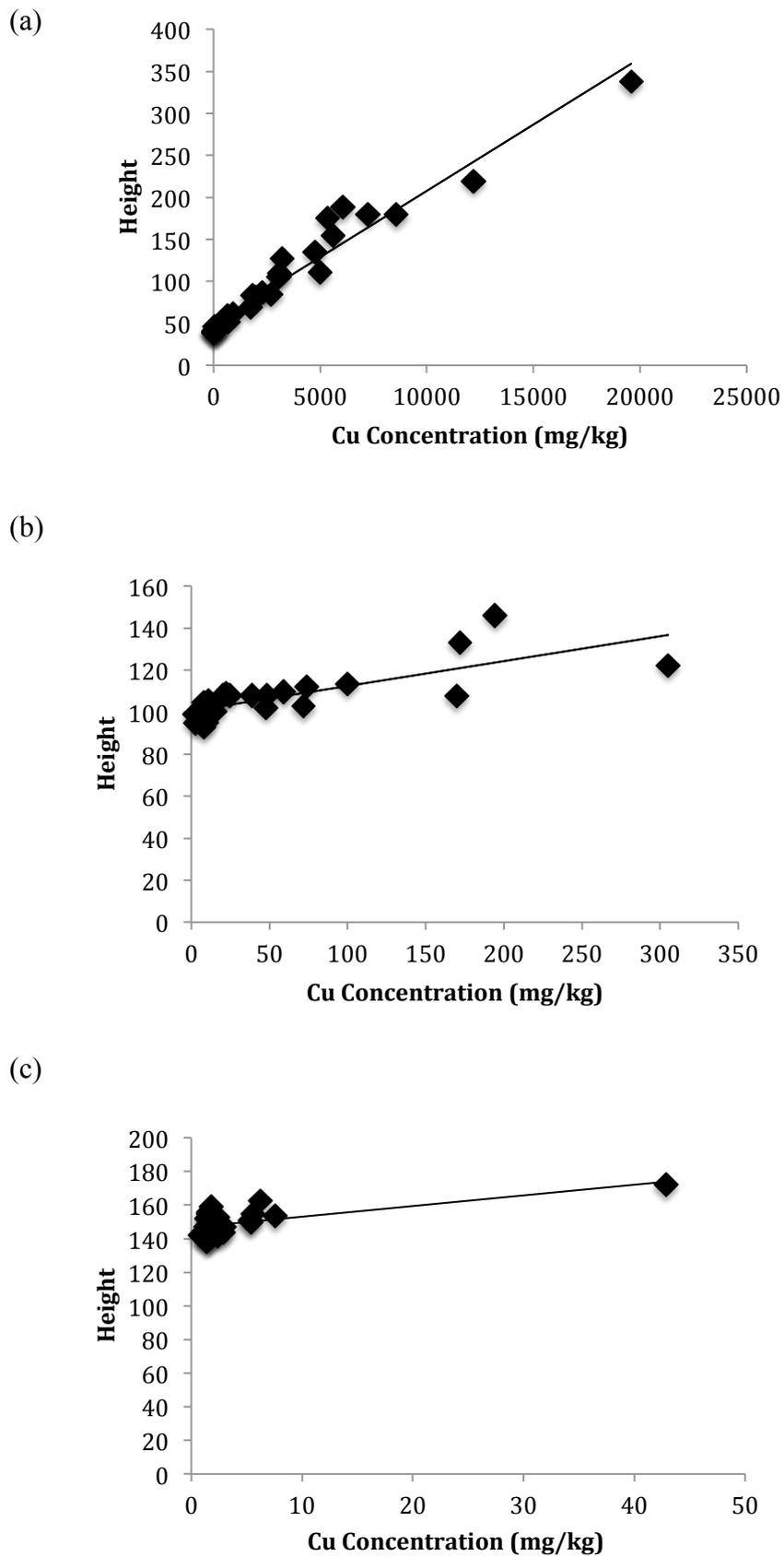


Figure 5.5 Linear regression analysis for (a) soils, (b) roots and (c) stems/leaves.

Table 5.29 Linear regressions for Cu content and maximum height (H_{\max}) for soils, roots and stems/leaves.

Matrix	Equation	R^2 (%)
Soils	$y = 0.0158x - 49.76$	95
Roots	$y = 0.1185x - 100.56$	58
Stems/leaves	$y = 0.6344x + 146.74$	43

y = Cu Concentration; x = H_{\max}

The best correlation results between Cu concentration and H_{\max} were obtained for soils ($R^2=95\%$), followed by roots ($R^2=58\%$) and stems/leaves ($R^2= 43\%$). Concerning the results for soil, these clearly show the adequacy of using this parameter (H_{\max}) for the quantification/estimation of Cu concentration in soils, offering a simpler and quicker quantification approach. Furthermore, it increases the knowledge on the use of P-XRF for the determination of Cu content in contaminated agricultural soils. Other authors (e.g. Radu and Diamond 2009; Weindorf et al. 2012) also obtained good results for the assessment of heavy metals in soils using P-XRF but quantification was carried out using the traditional methods described previously (fundamental parameters methods and scattered primary radiation, respectively). Therefore, it is important to point out that the approach followed in this work enables to carry out a suitable and adequate determination of Cu content in soils, due to the high quality data generated and the high correlation between the Cu content and the information extracted from the spectra, in a quicker and simpler way, minimising costs and time. Moreover, possible matrix effects linked to the sample also seem to be minimised, since different soils with different properties were considered and significant correlation values were obtained, as already explained.

Concerning the results of roots and stems/leaves, the correlation values obtained were low (roots 58% and stems/leaves 43%) and, therefore, not as relevant as those for soils. However, several aspects have to be pointed out before extracting any conclusion. The low adjustment obtained for this type of matrix could be due to several reasons. Firstly, as commented previously, it is important to notice that many of the samples analysed had very similar Cu content, and therefore, this limited the adjustment to a very narrow Cu content range, especially for stem and leaves. And secondly, it is also important to take into account that this could also be associated to the fact that Cu concentrations in some of the root and most of the shoot samples analysed were near the detection limit of this instrument ($\cong 3 \text{ mg}_{\text{Cu}}/\text{kg}$), increasing the standard error of measurements and, consequently, affecting and limiting the adjustment and correlation of these spectra to specific Cu concentrations.

Therefore, despite their low correlation and considering the limitations expressed, the results obtained for organic samples are encouraging and enabled showing the potential of this method and technique for Cu screening purposes in plant tissues. For roots, where Cu concentration determined

varied significantly enough and P-XRF allowed identifying these different levels present in the organic matrix, the correlation results with the parameters extracted from the processing of the spectra (58%) showed the potential adequacy of this method and technique to address semi-quantitative analysis of Cu in this type of samples. Furthermore, the results obtained for stem and leaves (43%) showed that, even though the range of Cu concentrations was not as broad as in the case of roots, it was possible to establish a correlation between these concentrations and the parameter calculated, suggesting that P-XRF and the quantification method used can be potentially adequate for the screening of different Cu concentrations in this type of samples too. Therefore, P-XRF and the quantification approach followed could potentially be adequate to screen and evaluate the absorption and translocation rates of Cu and other metals, in order to do a quick evaluation of possible toxic effects over the plant and to make sure that the different plants consumed by humans comply with the health standards established.

In conclusion, the results obtained for the different matrices analysed point out the potential of this technique and the quantification approach used to carry out the analysis of Cu contaminated samples, both inorganic (mineral) and organic, for screening purposes, and show that matrix effects are limited if this approach is followed. On one hand, the results obtained for the regression analysis carried out with inorganic samples (soils) improve the knowledge acquired by previous studies to this respect, as explained previously, and support and reinforce the adequacy of this technique to carry out screening analysis or even accurate Cu determinations. On the other hand, the regression results obtained for organic samples seem to point out the potentiality of this technique to carry out a screening analysis of them. Their low correlation values show that accurate Cu determinations cannot be yet carried out with this technique and approach but that it can be potentially adequate for initial screening purposes.

Therefore, the results obtained show the potential of this technique and quantification approach to carry out, at least, a comprehensive screening of Cu contaminated agricultural areas, being suitable and adequate for the analyses of both inorganic (soils) and organic samples provided that the concentrations of the metal in these samples are variable enough. This is an important aspect in the identification of possible hazardous agricultural areas and crops due to Cu contamination. Therefore, these results should be extended and improved by carrying out other experiments with a more adequate range of Cu soil doses, in order to minimise the toxic effect and to obtain a broader range of Cu concentrations in plant tissues.

5.5 Comparison of the results obtained for the different Mediterranean Regions and crops.

5.5.1 European vs Australian agricultural soils cropped with lettuce

As explained previously, agricultural soils from two different Mediterranean areas of the world were considered in this work. Different biomass assays having the same experimental design and considering the same crop were carried out in these areas, enabling to compare the results obtained and to draw different conclusion.

The analysis of the toxicity threshold values obtained for the Spanish and Australian agricultural soils and lettuce show that biomass production is greatly influence by Cu and that similar soil properties are relevant when analysing the effect of Cu and its mobility and bioavailability. In both Mediterranean areas, the range of toxicity thresholds established covered similar ranges, being of 8 to 753 mg/kg_{Cu} in the Spanish Region, and of 49 to 728 mg/kg_{Cu} in the Australian Region. In both cases, the maximum threshold value was obtained for the soil having the highest pH and clay content, independently of the soil type. Therefore, these two soil properties seem to be very relevant when analysing Cu mobility and availability in soils. The difference between the maximum thresholds obtained in each region can be linked to the fact that the soil of the Spanish region had a higher SOM content and a basic pH, which increases the retention capacity of soil.

The comparison of the results obtained in both areas also pointed out the relevance of pH when analysing the mobility and availability of Cu in agricultural soils, even in soils with medium clay contents. For the all soils assayed in the Spanish Mediterranean Region, whose pH values varied slightly and were all between 7-8, no biomass was produced after the fifth dose; while no biomass was produced after the second, third and fourth dose in the different soils of the Australian Region, increasing the toxic effect of Cu as pH decreased. In these latter soils, pH values varied among 5-7.5. Especially relevant were the results obtained for the soils of the Australian region, were an important toxic effect was observed for one of the soils assayed that had a low pH value (5.6) but a medium content of clay (27%).

Therefore, according to the results obtained, two different approaches have to be made when assessing Cu contaminated soils, depending on the pH of agricultural soils. In acidic soils (pH below 7), pH is the most relevant soil property and strongly influences the bioavailability of Cu, in spite the contents and values obtained for other soils properties. Toxic effect of Cu increases as pH values decreased, and soil properties that we would expect to have some retention capacity are ineffective or have very little effect due to the influence of pH on their reactivity. In fact, at acid pH the reactivity of SOM and clay is low or even null. Conversely, for basic soils (pH values exceeding 7), other properties have a more relevant effect, being clay/sand content, SOM and salinity the most relevant ones. Clay and SOM retain Cu by adsorption reactions while salinity and sand content make Cu more bioavailable and increase the toxic effect.

Analysis of the transfer of Cu from soil to plant showed that it varied between these two areas. However, it is important to point out that comparison of results was difficult due to the important toxic effect observed in the Australian agricultural soils. No biomass was produced after earlier doses in the case of these soils, which made it complicated to compare absorption values and rates. In both areas, Cu content in the edible part of the plant increased as Cu concentration in soils also did but no clear absorption pattern could be identified due to the limited data obtained in the Australian assays. However, the correlation analyses carried out between Cu contents and soils properties showed similarities between them and with the results obtained for biomass production. In this case, pH, salinity and sand content are the most determinant soil properties which enhance Cu transference from soil to lettuce, while SOM and clay content reduce this metals' transference to lettuce.

5.5.2 Lettuce and tomato cropped in different European Mediterranean

Within the same region, two different crops in different agricultural soils were assayed in order to analyse their different responses and behaviours to Cu in soil, in terms of biomass production and Cu absorption, and to evaluate the influence of soil properties on the mobility and availability of this metal to plants.

Toxicity threshold values obtained varied significantly between crops for the different soils assayed. For lettuce, as commented previously, effective concentration calculated varied between 8 to 753 mg/kg_{Cu}, while for tomato these concentrations varied between 33 to 1697 mg/kg_{Cu}. A more detailed analysis of these results indicate that, for EC₁₀, the values obtained for tomato are nearly twice the maximum value obtained for lettuce, except for one soil; and for EC₅₀, the lowest value obtained for tomato is very similar to the maximum concentration obtained for lettuce. This clearly indicates the different response of these two crops to the different Cu concentrations in soils, showing that tomato is more tolerant than lettuce to Cu contaminated soils. In fact, according to Ross (1994c) lettuce can be considered an accumulator crop, while tomato can be considered a non-accumulator crop. The analysis of the influence of soil properties on the effect of Cu on plant biomass production led to similar results/conclusions in both assays. SOM, clay content and CEC are the most relevant properties affecting Cu soils dynamic.

Regarding the metal accumulation in the plant, the concentrations determined both in tomato and lettuce shoots were also very similar, although this latter tends to accumulate slightly higher concentrations. The most important conclusion drawn is that in the case of tomato, low translocation rates to the edible part of the plant are observed, even in soils with high Cu concentrations, while Cu translocation and accumulation in the edible part of lettuce increases as soil Cu concentration increases. The results observed for tomato were particularly interesting, since Cu concentration in fruits kept low and constant, independently of the Cu concentration in soils and shoots. This indicates

that these plants tend to accumulate Cu in shoots and roots, with very low translocation of it to fruit, pointing out its phytoremediation potential. In both cases (lettuce and tomato), the increase of Cu concentration determined in plant was not proportional to the increase in Cu concentrations in soil, due to the fact that Cu accumulation in plant is limited, as it has been explained previous. Since Cu concentration in tomato fruits kept constant, the critical limit of contaminant in soil for this crop could not be calculated and therefore, cannot be compared with the critical limits calculated for lettuce.

The analysis of the influence of soil properties on the transfer and bioaccumulation in these crops also led to similar results/conclusions. Both salinity and sand content arise as soil characteristics that enhance the transfer of Cu from soil to plant; while SOM and clay content have the opposite effect.

Furthermore, it is important to point out that the maximum metal content in the edible part of the plant established by the identified legislations (Codex 1998, McLaughlin et al. 2000) was not exceeded in any of the dose and soils assayed for tomato and by only one soil in the case of lettuce. This soil was the one having the highest salinity content, and therefore, it seems logical to observe this, due to the fact that, as explained previously, this soil property facilitates the transfer of Cu from soil to plant.

Finally, it is important to highlight that for both tomato and lettuce, and considering the results obtained for the effect of Cu and its interaction with soil properties on plant biomass production and metal bioaccumulation in plant, the soil quality standard established by the Spanish legislation is not valid from either approach. Toxicity threshold values calculated for both crops showed that this soils quality standard was too indulgent, and it indicated this approach as the most restrictive when establishing soil quality standards. Conversely, the critical limit calculated for lettuce and the results obtained for the accumulation of Cu in the edible part of the plant show that the soil quality standard established by the Spanish legislation was too restrictive, since this content would not be exceeded in any of the soils assayed. Only one critical limit established showed that this soil quality standard was too permissive and corresponded to the one calculated for the saline soil.

Therefore, the results obtained show that soil quality standards should be established considering the influence of the different soil properties and should be particular for each case and scenario.

Since the baseline value considered in the assays is similar to those established in other Spanish Mediterranean regions (Pérez et al. 2000, 2002) and in other European Mediterranean regions (Facchinelli et al., 2001, Mitsios & Golia 2005), it is important to highlight that the results obtained in this work could be used as guidance for all the European Mediterranean Region in order to propose adequate soil quality standards; and adequate and valuable phytoremediation strategies that could be applied to Cu contaminated soils of this region.

CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

6. CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

The main conclusions of the Thesis presented are:

1. The toxicity values established for the different Mediterranean agricultural regions and soils considered cropped with lettuce covered similar ranges, being of 8 to 753 mg_{Cu}/kg in the Spanish Region, and of 49 to 728 mg_{Cu}/kg in the Australian Region. In both cases, the maximum threshold value was obtained for the soil having the highest pH and clay content, independently of the soil type. Therefore, these two soil properties seem to be very relevant when analysing Cu mobility and availability in soils. The difference between the maximum thresholds obtained in each region can be linked to the fact that the soil of the Spanish region had a basic pH, a higher SOM content, which increases the retention capacity of soil.
2. The toxicity values established for the Spanish Mediterranean soils but considering the two different crops assayed showed there is a significant difference between crops, in terms of tolerance and response. For lettuce, as commented previously, effective concentration calculated varied between 8 to 753 mg_{Cu}/kg, while for tomato these concentrations varied between 33 to 1697 mg_{Cu}/kg. A more detailed analysis of these results indicate that, for EC₁₀, the values obtained for tomato are nearly twice the maximum value obtained for lettuce, except for one soil; and for EC₅₀, the lowest value obtained for tomato is very similar to the maximum concentration obtained for lettuce. This clearly indicates the different response of these two crops to the different Cu concentrations in soils, showing that tomato is more tolerant than lettuce to Cu contaminated soils. However, the analysis of the influence of soil properties on the effect of Cu on plant biomass production led to similar results/conclusions in both assays. SOM, clay content and CEC are the most relevant properties affecting Cu soils dynamic.
3. The analysis of Cu bioaccumulation in lettuce showed significant difference between the Mediterranean regions considered. However, comparison of results was difficult due to the important toxic effect observed in the Australian agricultural soils. No biomass was produced after earlier doses in the case of these soils, which made it complicated to compare absorption values and rates. In both areas, Cu content in the edible part of the plant increased as Cu concentration in soils also did but no clear absorption pattern could be identified due to the limited data obtained in the Australian assays. Correlation analyses carried out between Cu contents and soils properties showed similarities between them and with the results obtained for biomass production. In this case, pH, salinity and sand content are the most determinant soil

properties which enhance Cu transference from soil to lettuce, while SOM and clay content reduce this metals' transference to lettuce.

4. Significant differences were observed between crops when comparing the bioaccumulation rates and quantities established for each of them when cultivated in the Spanish Mediterranean Region. Stem and leaves of both crops accumulated similar amounts of Cu although the amount accumulated by lettuce was always above that of tomato. However, the most important result is related to the Cu accumulated in the edible part of the plant. While the concentration of Cu in this part of the plant increased as the concentration in soil also did for lettuce, it was not so for tomato, where the concentration kept constant for all doses and soils assayed.
5. The results obtained for the bioaccumulation of Cu in the edible part of the plant for lettuce and tomato, both in the Spanish and Australian regions, only enabled to calculate the critical limit for lettuce grown in the Spanish Mediterranean agricultural soils. These critical limits (1975 mg_{Cu}/kg for Rojas, 8697 mg_{Cu}/kg for Sollana, and 30817 mg_{Cu}/kg for Nules) showed that the soil quality standard established by the Spanish legislation was too indulgent for the non-saline soils while it was too permissive for the saline ones.
6. The maximum metal concentration established in the identified legislation (Codex 1998; McLaughlin et al. 2000) was only exceeded by lettuce grown in the saline soil of the Spanish Mediterranean Region, and only after the fourth dose. Therefore, special attention must be paid to soil with high Cu concentrations (>1647.5 mg_{Cu}/kg), since certain crops must not be cultivated in them due the potential accumulation of Cu in the edible parts of them.
7. Soil properties influence significantly copper mobility and bioavailability in soil. The influence of the different soil properties depends mainly on the pH of soils. In basic soils (pH>7), soil organic matter content and clay content reduce the mobility and bioavailability of Cu through adsorption processes, while salinity and sand content enhance the absorption of this metal by plants. In acidic soils (pH<7), the effect of low pH, increasing the mobility of Cu, is stronger and more significant than any other soil property.
8. The analysis of the effect of Cu and its interaction with the soil properties on plant biomass production and on the bioaccumulation of Cu in the different parts of both lettuce and tomato showed that the Spanish soil quality standard established is not valid from both points of view for all the agricultural soils assayed. Therefore, soil quality standards for heavy metal contaminated soils should be defined/established considering the soil properties and the interaction of these with the heavy metal under analysis. In the case of Cu, the soil properties that should be considered when establishing these standards are: pH, soil organic matter, clay content, sand content and salinity.
9. For the type of crops considered in this Thesis, the effect of Cu on plant biomass production was the most relevant of those analysed, since it was the one that underwent a more severe

impact. Therefore, this effect is one that should be considered when establishing adequate soil quality standards.

10. Tomato showed an important phytoremediation potential, extracting Cu from not only low-medium but also from highly (>1700 mg/kg) Cu contaminated basic agricultural soils, and having low translocation rates to fruits. However, soils with high Cu concentration underwent a noticeable reduction in terms of plant biomass production. Therefore, it is important to find an adequate balance between these two aspects, in order to propose this crop as a phytoremediation alternative in the appropriate soils conditions.
11. Portable X-ray fluorescence has proved to be a potentially adequate technique to carry out the screening of Cu contaminated areas. The application of this technology seems to be more adequate for inorganic matrices, due to the better adjustment of the regression models calculated, although it showed a good potential for organic matrices.
12. The use of P-XRF for the determination of Cu in organic matrices should include an adequate pre-treatment of samples in order to reduce matrix effects and method limitations.

Future perspectives:

Further research should be carried out in this area in order to improve the results obtained in this Thesis and increase the knowledge on the management of Cu contaminated sites. Future research should focus in the following areas:

- Other agricultural soils of the Mediterranean Region should be assayed, including agricultural soils of other countries of the Mediterranean basin (e.g. Morocco, Tunisia, etc.) and North (e.g. California) and South America (e.g. Chile), in order to cover the majority of the agricultural soils present in the Mediterranean regions of the world and to propose adequate soil quality standards. Considering these other Mediterranean areas would also improve the conclusions drawn in terms of the effect and influence of the different soil properties on Cu soils' mobility and bioavailability.
- The bioassays presented in this Thesis should be repeated using other leaf and fruits crops in order to corroborate the results obtained in terms of plant response for both of the types of crops considered and extract important conclusions that could be useful for the management and phytoremediation of Cu contaminated agricultural soils.
- Other widespread crops, including cereals and inflorescence and tuber crops, should be assayed in order to identify differences and/or similarities in terms of plant biomass production and bioaccumulation of Cu patterns between the main types of crops cultivated in the world. This will enable to increase the knowledge in this area and improve the basis for proposing adequate soil quality standards and for the adequate management and phytoremediation of Cu contaminated areas.

- Extending the research carried out in this Thesis to other agricultural soils, including those classified as acidic, should corroborate the phytoremediation potential of tomato. This will enable to analyse the behaviour and response of this crops to this new acidic conditions and, at the same time, compare it with the results obtained for lettuce, reinforcing the conclusion extracted from the experiment carried out with tomato.
- XRF results should be further improved by carrying out other experiments, including more soils and crops. New experiments should include better-adjusted Cu doses when assaying acidic soils; and this technique should also be extended and tested in basic agricultural soils. In both sets of experiments, method and matrix limitations should be further minimised, improving the pre-treatment of organic matrices. Results obtained should also be corroborated through field experiments.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu MM, Matias MJ, Magalhães MCF, Basto MJ (2008).** Impacts on water, soil and plants from the abandoned Miguel Vacas copper mine, Portugal. *Journal of Geochemical Exploration* 96, 161–170.
- Adriano DC (2001).** Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals. 2nd Edition, Springer-Verlag, New York, USA.
- AENOR (1997).** UNE 77303. Calidad del Suelo. Pretratamiento de muestras para análisis físico-químico. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid, Spain.
- AENOR (2001).** UNE 77309. Calidad del Suelo. Determinación de Cadmio, Cromo, Cobalto, Cobre, Plomo, Manganeso, Níquel y Zinc en Extractos del Suelo en Agua Regia. Métodos Espectrométricos de Absorción Atómica con Llama y Atomización Electrotérmica. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid, Spain.
- Agazzi A, Pirola C (2000).** Fundamentals, methods and future trends of environmental microwave sample preparation. *Microchemical Journal* 67, 337-341.
- Alcalá L (1995).** Métodos de obtención y preparación de muestras en el estudio de la contaminación de los suelos. In: Contaminación y Depuración de Suelos. Instituto Tecnológico y Geominero de España (ITGE), Madrid, Spain, pp. 103-112.
- Alloway BJ (1990).** Heavy Metals in Soils. Blackie & Son Ltd., London, UK.
- Alloway BJ (1995).** Heavy metals in soils (2nd ed.). Blackie & Son Ltd., Glasgow, Scotland.
- Alloway BJ (2013).** Heavy metals in Soils: Trace metals and metalloids in soil and their bioavailability (3rd edition). Springer Science & Business Media. Dordrecht, Holland.
- Alloway BJ, Ayres DC (1993).** Chemical Principles of Environmental Pollution. Blackie Academic & Professional, London, UK.

- Álvarez AM (1985).** Revisión bibliográfica sobre la adsorción de metales pesados a superficies coloidales. *Anales de Edafología y Agrobiología* 44, 1583-1593.
- Andrades M, Carral P, Martínez E, Álvarez A, Alonso JI (2000).** Contenido de metales pesados y calidad de suelos en cultivos frutales de la Rioja (España). *Edafología* 7 (3), 313-318.
- Andreu V (1991).** Contenido y Evolución de Cd, Co, Cr, Cu, Pb, Ni y Zn en Suelos de la Comarcas de l'Horta y la Ribera Baixa (Valencia). PhD Thesis. Universitat de València. Valencia, Spain.
- Andreu V, Gimeno-García E (1996).** Total Content and extractable fraction of cadmium, cobalt, nickel, lead and copper in calcareous orchard soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 27, 2633-2648.
- Angelova VR, Babrikov TD, Ivanov KI (2009).** Bioaccumulation and distribution of lead, copper, and cadmium in crops of Solanaceae family. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 40, 2248–2263.
- ANZFA (1997).** Food standards code, Amendment 35. Australia and New Zealand Food Authority, Canberra, ACT, Australia.
- Ariyakanon N, Winaipanich B (2006).** Phytoremediation of Copper Contaminated Soil by *Brassica juncea* (L.) Czern and *Bidens alba* (L.) DC. var. *radiata*. *Journal of Science Research of Chulalongkorn University* 31(1), 49-56.
- Baker AJM, Walker PL (1990).** Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects, Shaw AJ (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp.155-177.
- Barahona E, Iriarte A (2001).** An overview of the present state of standardization of soil sampling in Spain. *Science of the Total Environment* 264, 169-174.
- Beckett PHT (1989).** The use of extractants in studies on trace metals in soils, sewage sludge, and sludge-treated soils. *Advances in Soil Science* 9, 143-176.

- Belmonte Serrato F, Romero Díaz A, Alonso Sarría F, Moreno Brotóns J, Rojo López S (2010).** Effects of heavy metals in agricultural soils adjacent to mining areas in southeastern Spain. *Papeles de Geografía* 51-52, 45-54.
- Bettinelli M, Beone GM, Spezia S, Baffi C (2000).** Determination of heavy metals in soils and sediments by microwave-assisted digestion and inductively coupled plasma optical emission spectrometry analysis. *Analytica Chimica Acta* 424, 289-296.
- Blum WEH (1990).** The challenge of soil protection in Europe. *Environmental Conservation* 17, 72-74.
- BOE (1990).** Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los Lodos de Depuración en el Sector Agrario. BOE nº 262 de 1 de noviembre de 1990, Madrid, Spain.
- BOE (1995).** Resolución de 28 de abril de 1995, de la Secretaría de Estado de Medio Ambiente y Vivienda, por la que se dispone la publicación del acuerdo del Consejo de Ministros de 17 de febrero de 1995, por el que se aprueba el Plan Nacional de Recuperación de Suelos Contaminados. BOE nº 114 de 13 de mayo de 1995, Madrid, Spain.
- BOE (1998).** Ley 10/1998, de 21 de abril, de Residuos. BOE nº 96 de 22 de abril de 1998, Madrid, Spain.
- BOE (2005).** Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. BOE nº 15 de 18 de enero de 2005, Madrid, Spain.
- BOE (2011).** Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. BOE nº 181 de 29 de Julio de 2011, Madrid, Spain.
- BOE (2013).** Ley 5/2013, de 11 de junio, por la que se modifican la Ley 16/2002, de 1 de julio, de prevención y control integrados de la contaminación y la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. BOE nº 140 de 12 de junio de 2013, Madrid, Spain.
- Boluda R, Errectable MF, Farré R, Lagarda MJ (1993).** Determination of the total content and extractable fraction of cadmium, copper, cobalt, copper, nickel and lead in soils by atomic absorption spectrometry. Study of a method. Actas del XII Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo: El Estudio del Suelo y su Degradación en Relación con la Desertificación. Tomo I. Sociedad Española de la Ciencia del Suelo (SECS), Salamanca, Spain, pp. 179–189.

- Brun LA, Maillet J, Richarte J, Herrmann P, Remy JC (1998).** Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environmental Pollution* 102, 151–161.
- Cala V (1995).** Metodología analítica en el estudio de metales pesados en suelo. In: Contaminación y Depuración de Suelos. Instituto Tecnológico y Geominero de España (ITGE), Madrid, pp. 171-174.
- Cala V (1998).** Comportamiento de metales pesados en suelos. In: Terceras Jornadas de Suelos Contaminados. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, pp. 57-72.
- Cala V, Rodríguez-Sanchidrián J, Guerra A (1985).** Contaminación por metales pesados en suelos de la Vega de Aranjuez. (I). Pb, Cd, Cu, Zn, Ni y Cr. *Anales de Edafología y Agrobiología* 44, 1595-1608.
- Callaba A (1998).** Criterios para la selección de técnicas de recuperación de suelos contaminados. In: Terceras Jornadas de Suelos Contaminados. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, pp. 157-176.
- Callaba A, Chacón E (2002).** Análisis probabilístico de la eficiencia de los niveles de referencia para la evaluación de la contaminación de suelos. *Revista de Salud Ambiental* 2(2), 57-62.
- Cámara C, Fernández P, Martín-Esteban A, Pérez-Conde C, Vidal M (2002).** Toma y Tratamiento de Muestras. Ed. Síntesis S.A, Madrid, Spain.
- Campos E, Barahona E, Lachica M, Mingorance MD (1998).** A study of the analytical parameters important for the sequential extraction procedure using microwave heating for Pb, Zn and Cu in calcareous soils. *Analytica Chimica Acta* 369, 235–243.
- Carrillo-González R, Simunek J, Sauvé S, Adriano D (2006).** Mechanisms and pathways of trace element mobility in soils. *Advances in Agronomy* 91, 111–178.
- Castro E, Mañas P, De las Heras J (2009).** A comparison of the application of different waste products to a lettuce crop: Effects on plant and soil properties. *Scientia Horticulturae* 123, 148–155.

- CCE (2002).** Comunicación de la Comisión al Consejo, el Parlamento Europeo, el Comité Económico y Social y el Comité de las Regiones: Hacia una Estrategia Temática para la Protección del Suelo. Consejo de las Comunidades Europeas (CCE), Bruselas, Bélgica.
- CCE (2006).** Comunicación de la Comisión al Consejo, el Parlamento Europeo, el Comité Económico y Social y el Comité de las Regiones: Estrategia Temática para la Protección del Suelo. Consejo de las Comunidades Europeas (CCE), Bruselas, Bélgica.
- Chaney RL, Oliver DP (1996).** Sources, potential adverse effects and remediation of agricultural soil contaminants. In: Contaminants and the soil environment in the Australasia-Pacific region. Naidu R et al. (Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holland, pp. 323-359.
- Chen M, Ma LQ (1998).** Comparison of four USEPA digestion methods for trace metal analysis using certified and Florida soils. *Journal of Environmental Quality* 27, 1294–1300.
- Cintra AAD, Revoredo MD, Melo WJ, Braz LT (2004).** Non-nutrient heavy metals in tomato plants cultivated in soil amended with biosolid and sugar-cane bagasse compost. *Acta Horticulturae* 638, 259–265.
- Clemente R, Walker DJ, Bernal MP (2005).** Uptake of heavy metals and As by Brassica juncea grown in a contaminated soil in Aznalcollar (Spain): The effect of soil amendments. *Environmental Pollution* 138, 46-58.
- Cline MG (1944).** Principles of soil sampling. *Soil Science* 58, 275-288.
- CNA (2014).** <http://acdc.sav.us.es/cna/index.php/tandem3mv/tecnicas/68-fluorescencia-de-rayos-x-xrf-> (29/05/2014)
- Coccosis HN (1991).** Historical land use changes: Mediterranean regions in Europe. In: Land use changes in Europe: Processes of change, environmental transformations and future patterns, Brower FW, Thomas A, Chadwick MJ (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 441–461.
- Codex (1998).** Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO General Standard for Contaminants and Toxins in Foods. Rome, Italy.

- Colomer JC, Sánchez J (2001).** Agricultura y procesos de degradación del suelo. In: Agricultura y Desertificación, Martín de Santa Olalla F (Ed.). Mundi Prensa S.A., Madrid, Spain, pp. 109-131.
- Conesa HM, Schulin R (2010).** The Cartagena–La Unión mining district (SE Spain): a review of environmental problems and emerging phytoremediation solutions after fifteen years research. *Journal of Environmental Monitoring* 12, 1225–1233.
- Cozzolino D, Morón A (2004).** Exploring the use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to predict trace minerals in legumes. *Animal Feed Science and Technology* 111,161–173.
- Cuadrado, C., Kumpulainen, J Moreiras O (1995).** Contaminants and nutrients in total diets in Spain. *European Journal of Clinical Nutrition* 49, 767–778.
- Davies BE (1980).** Trace element pollution. In: Applied Soil Trace Elements, Davies BE (Ed.). John Wiley & Sons Ltd., Chichester, pp. 287-351.
- Davies BE (1992).** Inter-relationships between soil properties and the uptake of cadmium, copper, lead, and zinc from contaminated soils by radish (*Raphanus sativus* L.). *Water, Air and Soil Pollution* 63, 331-342.
- DFAT STARS (2013).** Database, based on ABS Cat No 5368.0, February 2013 data; ABS Special Data Service.
- Di Palma L, Ferrantelli P, Medici F (2005).** Heavy metals extraction from contaminated soil: Recovery of the flushing solution. *Journal of Environmental Management* 77, 205-211.
- Díaz-Fierros F (1992).** Contaminación de suelos. In: IV Simposio Nacional sobre Nutrición Mineral de las Plantas. Contaminación: Efectos Fisiológicos y Mecanismos de Actuación de Contaminantes, Mataix-Beneyto J, Alcaraz C, Gómez I, Navarro J, García-Villalba MM, Moral R, García F (Eds.). Sociedad Española de Fisiología Vegetal, Alicante, Spain, pp. 1-30.
- Dick RP, Thomas DR, Halvorson JJ (1996).** Standardized methods, sampling and sample pretreatment. In: Methods for Assessing Soil Quality, Doran JW, Jones AJ(Eds.). Soil Science Society of America (SSSA), Madison, Wisconsin, USA, pp. 107-121.
- DOCE (1986).** Directiva 86/278/CEE, de 12 de junio de 1986, relativa a la Protección del Medio Ambiente, y en particular, de los Suelos, en la Utilización de los Lodos de Depuradora en

Agricultura. Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) N° L181 de 4 de julio de 1986. Consejo de las Comunidades Europeas, Bruselas, Bélgica.

DOCE (1991). Directiva 91/156/CEE, del Consejo de 18 de marzo de 1991, por el que se modifica la Directiva 75/442/CEE relativa a los Residuos. Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) N° L078 de 26 de marzo de 1991. Consejo de las Comunidades Europeas, Bruselas, Bélgica.

Doelman P, Haanstra L (1989). Short-term and long-term effects of heavy-metals on phosphatase-activity in soils—an ecological dose–response model approach. *Biology and Fertility of Soils* 8, 235–41.

DOUE (2006). Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea L 364/5. Comisión de las Comunidades Europeas, Bruselas, Bélgica.

Doner HE (1978). Chloride as a factor in mobilities of Ni (II), Cu (II), and Cd (II) in soil. *Soil Science Society of American Journal* 42, 882-885.

Dudka S, Ponce-Hernández R, Tate G, Hutchinson TC (1996). Forms of Cu, Ni and Zn in soils of Sudbury, Ontario and the metal concentrations in plants. *Water, Air and Soil Pollution* 90, 531-542.

Dufault RJ, Ward B, Hassell RL (2009). Dynamic relationships between field temperatures and romaine lettuce yield and head quality. *Scientia Horticulturae* 120, 45–459.

Duffus JH (2002). Heavy metals. A meaningless term?. *Pure Applied Chemist* 74, 793-807.

Errecalde MF, Boluda R, Lagarda MJ, Farré R (1991). Índices de contaminación por metales pesados en suelos de cultivo intensivo: aplicación en la comarca de l’Horta (Valencia). *Suelo y Planta* 1, 483-494.

Facchinelli A, Sacchi E, Mallen L (2001). Multivariate statistical and GIS-based approach to identify heavy metal sources in soils. *Environmental Pollution* 114, 313-324.

- Fadda GS (2012).** Introducción a la Edafología. Cátedra de Edafología. Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina.
- FAO 1992.** FAO Soil map of Australia. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome, Italy.
- Favas PJC, Pratas J, Varun M, D'Souza R, Paul SM (2014).** Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids at mining areas: potential of native flora. In: Environmental Risk Assessment of Soil Contamination, Hernandez-Soriano MC (Ed). Intech: online publishing.
- Felipó MT, Garau MA (1987).** La Contaminació del Sòl. Procés de Degradació del Medi Edàfic i de l'Entorn. Quaderns d'Ecologia Aplicada, Servei del Medi Ambient, Diputació de Barcelona, Barcelona, Spain.
- Ferguson CC (1999).** Assessing risks from contaminated sites: policy and practice in 16 european countries. *Land Contamination and Reclamation* 7, 33-54.
- Field A (2009).** Discovering Statistics using SPSS (3rd ed.). SAGE Publications Inc, Los Angeles, London, New Delhi, Singapore, Washington DC.
- Fluk L, Hooker B, Pfeil J (1994).** In situ X-ray fluorescence analysis at a mine site. In: Proceedings of the First International Conference on Tailings and Mine Waste. AA Balkema Publishers, Brookfield, VT, pp. 119-125.
- Freedman B, Hutchinson TC (1981).** Sources of metal and elemental contamination of terrestrial environments. In: Effect of Heavy Metal Pollution on Plants. Volume 2. Metals in the Environment, Lepp NW (Ed.). Applied Science Publishers Ltd., Essex, UK, pp. 35-93.
- Galfati I, Bilal E, Sassi AB, Abdallah H, Zaier A (2011).** Accumulation of heavy metals in native plants growing near the phosphate treatment industry, Tunisia. *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences* 6(2), 85 – 100.
- Gallego JLR, Ordóñez A, Loredó J (2002).** Investigation of trace elements sources from an industrialized area (Avilés, Northern Spain) using multivariate statistical methods. *Environment International* 27, 589-596.

- Ge Y, Murray P, Hendershot W (2000).** Trace metal speciation and bioavailability in urban soils. *Environmental Pollution* 107, 137-144.
- Gimeno-García E (1993).** Impacto de la actividad agrícola y especiación química de metales pesados en un suelo de arrozal del Parque Natural de la Albufera (Valencia). Degree Project. Universitat de València. Valencia, Spain
- Giuffréde López Carnelo L, Ratto de Miguez S, Marbán L (1997).** Heavy metals input with phosphate fertilizers used in Argentina. *Science of the Total Environment* 204(3), 245–250.
- Gómez Garcia A, Magaña Garns P (2004).** Papel del cromo y del cinc en el metabolismo de la insulina. *Revista Medica IMSS* 42 (2), 347-352.
- Gräber I, Hansen JF, Olesen SE, Petersen J, Ostergaard HS, Krogh L (2005).** Accumulation of copper and zinc in Danish agricultural soils in intensive pig production areas. *Danish Journal of Geography* 105(2), 15-22.
- Groom C, Parker J, Teller A (1995).** Agriculture. In: Europe's environment. The Dobris Assessment, Stanners D, Bourdeau P (Eds.). European Environmental Agency (EEA), Copenhagen, Denmark, pp. 447–463.
- Gutiérrez-Ginés MJ, Pastor J, Hernández AJ (2013).** Assessment of field portable X-ray fluorescence spectrometry for the in situ determination of heavy metals in soils and plants. *Environmental Science: Processes & Impacts* 15, 1545-1552.
- Hart BT (1982).** Australian Water Quality Criteria for Heavy Metals. Australian Water Resources Council Tech. Paper No. 77, Aust. Govt. Publishing Service. Canberra, Australia.
- Harter RD, Naidu R (2001).** An assessment of environmental and solution parameter impact on trace-metal sorption by soils. *Soil Science Society of American Journal* 65, 597-612.
- Hauptkorn S, Pavel J, Seltner H (2001).** Determination of silicon in biological samples by ICP-OES after non-oxidative decomposition under alkaline conditions. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 370, 246-250.

- Hernández AJ, Pastor J (2008).** Validated approaches to restoring the health of ecosystems affected by soil pollution. In: Soil contamination Research Trend, Domínguez JB (Ed.). Nova Science Publishers, New York, USA, pp. 51–72 .
- Herzig R, Korhammer S, Kumpulainen J, Muntau H, Quevauviller PH (2001).** The certification of the contents (mass fractions) of As, B, Ba, Cd, Cu, Fe, Hg, Mo, Ni, Sb, Sr, Tl and Zn in white cabbage (BCR-679). EUR 19777 EN. European Commission, Reference materials, BCR Information Luxembourg.
- Hewitt A, Reynolds CM (1990).** Dissolution of metals from soils and sediments with microwave-nitric digestion technique. *Atomic Spectroscopy* 11, 187-192.
- Hinojosa MB, Carreira JA, Rodriguez-Maroto JM, Garcia-Ruiz R (2008).** Effects of pyrite sludge pollution on soil enzyme activities: Ecological dose–response model. *Science of the Total Environment* 396, 89–99.
- Hlavay J, Prohaska T, Weisz M, Wenzel WW, Stingeder GJ (2004).** Determination of trace elements bound to soils and sediment fractions. *Pure Applied Chemist* 76, 415-442.
- Holmgren GGS, Meyer MW, Chaney RL, Daniels RB (1993).** Cadmium, lead, zinc, copper and nickel in agricultural soils of the United States of America. *Journal of Environmental Quality* 22, 335–348.
- Hooda PS, McNulty D, Alloway BJ, Aitken MN (1997).** Plant availability of heavy metals in soils previously amended with heavy applications of sewage sludge. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73, 446-454.
- Hödrejärvi H, Vaarmann A (1999).** Pseudo-total analysis for metallic elements in siliceous soil by acid digestion and flame atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 396, 293-301.
- Huang SW, Jin JY (2008).** Status of heavy metals in agricultural soils as affected by different patterns of land use. *Environmental Monitoring and Assessment* 139, 317–327.
- IHOBE (1994).** Manual Práctico para la Investigación de la Contaminación del Suelo. Sociedad Pública de Gestión Ambiental (IHOBE), Departamento de Urbanismo, Vivienda y Medio Ambiente, País Vasco, Spain .

- ISO (1995a).** Soil quality—determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 2: Effects of chemicals on the emergence of higher plants. International Standard Organization, Geneva, Switzerland.
- ISO (1995b).** ISO 11466. Soil Quality: Extraction of trace elements soluble in Aqua Regia. International Standard Organisation (ISO), Geneva, Switzerland.
- ISO/DIS 19258 (2005).** Soil quality. Guidance on the determination of background values. International Standard Organisation (ISO). Geneva, Switzerland.
- ISTA (2015).** International Rules for Seed Testing, Vol. 2015, Chapter 7, i-7-6 (10).
- Jadia CD, Fulekar MH (2008).** Phytoremediation: the application of vermicompost to remove zinc, cadmium, copper, nickel and lead by sunflower plant. *Environmental Engineering and Management Journal* 7 (5), 547-558.
- Jenkins DA, Gareth R (1980).** Trace elements in rocks, soils, plants and animals: Introduction. In: Applied Soil Trace Elements, Davies BE (Ed.). John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, pp. 1-20.
- Jiménez R (1998).** Comportamiento del suelo ante procesos de contaminación. In Terceras Jornadas de Suelos Contaminados (pp. 41-56). Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, Spain.
- John R, Ahmad P, Gadgil K, Sharma S (2009).** Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by Brassica juncea L. *International Journal of Plant Production* 3 (3), 65-75.
- Jones JB (1985).** Soil testing and plant analysis: guides to fertilization of horticultural crops. *Horticultural Reviews* 7, 1-68.
- Jopony M, Young SD (1994).** The solid-solution equilibria of lead and cadmium in polluted soils. *European Journal of Soil Science* 45, 59-70.
- Junta de Andalucía (1999).** Criterios y Estándares para Declarar un Suelo Contaminado en Andalucía. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla, Spain.

- Kabata-Pendias A (1995).** Agricultural problems related to excessive trace metal contents of soils. In: Heavy Metals Problems and Solutions, Salomons W, Förstner U, Mader P (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 3-18.
- Kabata-Pendias A (2004).** Soil-plant transfer of trace elements. An environmental issue. *Geoderma* 122, 143-149.
- Kabata-Pendias A (2011).** Trace Elements in Soils and Plants. 4th edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Kabata-Pendias A, Pendias H (1984).** Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Kabata-Pendias A, Pendias H (2001).** Trace Elements in Soils and Plants. 3rd Edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Kabata-Pendias A, Mukherjee AB (2007).** Trace Elements for Soil to Humans. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Kachenko AG, Singh B (2006).** Heavy metals contamination in vegetables grown in urban and metal smelter contaminated sites in Australia. *Water Air and Soil Pollution* 169, 101-123.
- Kalnicky DJ, Singhvi R (2001).** Field portable XRF analysis of environmental samples. *Journal of Hazardous Materials* 83, 93-122.
- Kean JS (1993)** Reference materials. American Laboratory, USA.
- Kennedy VH, Sánchez AL, Oughton DH, Rowland AP (1997).** Use of single and sequential chemical extractants to assess radionuclide and heavy metal availability from soils for root uptake. *Analyst* 122, 89-100.
- Kim HJ, Fonseca JM, Choi JH, Kubota K, Kwon YK (2008).** Salt in irrigation water affects the nutritional and visual properties of Romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 3772–3776.

- Komárek M, Cadková E, Chrastny V, Bordas F, Bollinger JC (2010).** Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects. *Environment International* 36, 138–151
- Konstantopoulou E, Kapotis G, Petroulos SA, Karapanos IC, Passam HC (2010).** Nutritional quality of greenhouse lettuce at harvest and after storage in relation to N application and cultivation season. *Scientia Horticulturae* 125, 93.e1–93.e5.
- Krebs R, Gupta SK, Furrer G, Shulin R (1998).** Solubility and plant uptake of metals with and without liming of sludge-amended soils. *Journal of Environmental Quality* 27, 18-23.
- Li X, Coles BJ, Ramsey MH, Thornton I (1995).** Sequential extraction of soils for multielement analysis by ICP-AES. *Chemical Geology* 124, 109-123.
- Li X, Poon C, Liu PS (2001).** Heavy metal contamination of urban soils and street dusts in Hong Kong. *Applied Geochemistry* 16, 1361–1368.
- Link DD, Walter PJ, Kingston HM (1998).** Development and validation of the new EPA microwave-assisted leach Methods 3051A. *Environmental Science and Technology* 32, 3628-3632.
- Liu RL, Li ST, Wang XB, Wang M (2005).** Contents of heavy metal in commercial organic fertilizers and organic wastes (In Chinese). *Journal of Agro-Environment Science* 24(2), 392–397.
- López de Velasco J (1996).** El plan nacional de recuperación de suelos contaminados. In: Suelos Contaminados. Instituto Tecnológico y Geominero de España (ITGE), Madrid, Spain. pp. 7-10.
- López-Mosquera ME, Moirón C, Carral E (2000).** Use of dairy-industry sludge as fertiliser for grasslands in northwest Spain: Heavy metal levels in the soil and plants. *Resources, Conservation and Recycling* 30, 95–109.
- Luo L, Ma Y, Zhang S, Wei D, Zhu YG (2009).** An inventory of trace elements inputs to agricultural soils in China. *Journal of Environmental Management* 90, 2524–2530.
- Macías F (1993).** Contaminación de suelos: algunos hechos y perspectivas. In: V Reunión Nacional de Geología Ambiental y Ordenación del Territorio. Murcia, pp. 53-74.

- MAFF (1986).** The Analysis of Agricultural Materials. 3rd Edition, Reference Book 427, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF), London,UK.
- MAGRAMA (2009).** Cuestiones relevantes, referidas al sector hortícola, para la definición de la política de seguros agrarios: situación actual y tendencias a corto y medio plazo. Centro de Estudios e Investigación para la Gestión de Riesgos Agrarios y Medioambientales. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain.
- MAGRAMA (2012a).** Ficha de Agricultura: Consumo de Productos Fitosanitarios. Banco Público de Indicadores Ambientales. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid, Spain.
- MAGRAMA (2012b).** Ficha de Agricultura: Consumo de Fertilizantes. Banco Público de Indicadores Ambientales. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid, Spain.
- Mahmud R, Inoue N, Kasajima SY, Shaheen R (2008).** Assessment of potential indigenous plant species for the phytoremediation of arsenic-contaminated areas of Bangladesh. *International Journal of Phytoremediation* 10(2),117-30.
- Maíz I, Esnaola MV, Millán E (1997).** Evaluation of heavy metal availability in contaminated soils by a short sequential extraction procedure. *Science of the Total Environment* 206, 107-115.
- MAPA (1994).** Métodos oficiales de análisis de suelos y aguas para riegos. Tomo III. Servicio de publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, Spain.
- Mapanda F, Mangwayana EN, Nyamangara J, Giller KE (2005).** The effect of long-term irrigation using wastewater on heavy metal contents of soils under vegetables in Harare, Zimbabwe. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 107, 151–165
- Marguí E, Queralt I, Hidalgo M (2008).** Application of X –ray fluorescence spectrometry to determination and quantification of metals in vegetal material. *Trends in Analytical Chemistry* 28(3), 362-372.
- Markowicz A (2011).** An overview of quantification methods in energy-dispersive X-ray fluorescence analysis. *PRAMANA- Journal of Physics* 76(2), 321-329.

- Martínez CE, Motto HL (2000).** Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environmental Pollution* 107, 153-158.
- Masson P, Dauthieu M, Trolard F, Denaix L (2007).** Application of direct solid analysis of plant samples by electrothermal vaporization-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: determination of Cd and Si for environmental purposes. *Spectrochimica Acta Part b* 62, 224-230.
- McBride MB (1989).** Reactions controlling heavy metals solubility in soils. *Advances in Soil Science* 10, 1-56.
- McBride MB (1994).** Environmental chemistry of soils. Oxford University Press, New York, USA.
- McBride MB (1995).** Toxic metals accumulation from agricultural use of sludge: are USEPA regulations protective? *Journal of Environmental Quality* 24, 5-18.
- McBride M, Sauvé S, Hendershot W (1997).** Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *Journal of Soil Science* 48, 337-346.
- McBride MB, Spiers G (2001).** Trace element content of selected fertilizers and dairy manures as determined by ICP-MS. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 32(1-2), 139-156.
- McCutcheon SC, Schnoor JL (2004).** Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants. John Wiley & Sons, New Jersey, USA.
- McGrath D, Fleming GA, McCormack RF, Poole DBR (1982).** Effects of applying copper-rich pig slurry to grassland. 2. Land-spreading trial. *Irish Journal of Agricultural Research* 21, 49-60.
- McGrath D (1996).** Application of single and sequential extraction procedures to polluted and unpolluted soils. *Science of the Total Environment* 178, 37-44.
- McKone TE, Maddalena RL (2007).** Plant uptake of organic pollutants from soil: bioconcentration estimates based on models and experiments. *Environmental Toxicology & Chemistry* 26 (12), 2494-2504.
- McLaughlin MJ, Parker DR, Clarke JM (1999).** Metals and micronutrients—food safety issues. *Field Crops Research* 60, 143-163.

- McLaughlin MJ, Hamon RE, McLaren RG, Speir TW, Rogers SL (2000).** Review: A bioavailability-based rationale for controlling metal and metalloid contamination of agricultural land in Australia and New Zealand. *Australian Journal of Soil Research* 38(6), 1037–1086.
- McLean JE, Bledsoe BE (1992).** Behaviour of Metals in Soils. EPA/540/S-92/018. United States Environmental Protection Agency (USEPA), Washington DC, USA.
- Merry RH, Tiller KG, Alston AM (1983).** Accumulation of copper, lead and arsenic in some Australian orchard soils. *Australian Journal of Soil Research* 21, 549-561.
- Micó C (2005).** Estudio de metales pesados en suelos con cultivos hortícolas de la provincia de Alicante. PhD Thesis. Universitat de València. Valencia, Spain.
- Micó C, Recatalá L, Peris M, Sánchez J (2006).** Assessing heavy metal sources in agricultural soils of an European Mediterranean area by multivariate analysis. *Chemosphere* 65, 863-872.
- Micó C, Peris M, Recatalá L, Sánchez J (2007).** Baseline values for heavy metals in agricultural soils in an European Mediterranean Region. *Science of the Total Environment* 378, 13-17.
- Micó C, Li HF, Zhao FJ, McGrath SP (2008).** Use of Co speciation and soil properties to explain variation in Co toxicity to root growth of barley (*Hordeum vulgare L.*) in different soils. *Environmental Pollution* 156, 883–890.
- Mitsios IK, Golia EE (2005).** Heavy metal concentrations in soils and irrigation waters in Thessaly region, Central Greece. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 36, 487-501.
- Mkumbo S, Mwegoha W, Renman G (2012).** Assessment of the phytoremediation potential for Pb, Zn and Cu of indigenous plants growing in a gold mining area in Tanzania. *International Journal of Environmental Sciences* 2(4), 2425-2434.
- Mohamed I, Ahamadou B, Li M, Gong CX, Cai P, Liang W et al. (2010).** Fractionation of copper and cadmium and their binding with soil organic matter in a contaminated soil amended with organic materials. *Journal of Soils and Sediments* 10, 973–982.
- Moolenaar SW, Beltrami P (1998).** Heavy metal balances of an Italian soil as affected by sewage sludge and Bordeaux mixture applications. *Journal of Environmental Quality* 27, 828-835.

- Moor C, Lymberopoulou T, Dietrich VJ (2001).** Determination of heavy metals in soils, sediments and geological materials by ICP-AES and ICP-MS. *Mikrochimica Acta* 136, 123-128.
- Moral R, Navarro J, Moreno-Caselles J, Gómez I, Mataix-Solera J (1998).** Nutrients in a calcareous soil affected by cadmium. *Journal of Plant Nutrition* 21(9), 1933-1941
- Moral R, Cortés A, Gómez I, Mataix-Beneyto J (2002).** Assessing changes in Cd phytoavailability to tomato in amended calcareous soils. *Bioresource Technology* 85, 63-68.
- Morselli L, Passarini F, Bartoli M (2002).** The environmental fate of heavy metals arising from a MSW (municipal solid waste) incineration plant. *Waste Management* 22, 875-881.
- Mortvedt JJ (2000).** Bioavailability of micronutrients. In: Handbook of Soil Science, M.E. Sumner (Ed.). CRC Press, Boca Raton, USA pp. 71-88.
- Mulero A (1999).** Introducción al Medio Ambiente en España. Ed. Ariel S.A., Barcelona, Spain.
- Murray P, Ge Y, Hendershot W (2000).** Evaluating three trace metal contaminated sites: a field and laboratory investigation. *Environmental Pollution* 107, 127-135.
- Namiesnik J, Zygmunt B (1999).** Role of reference materials in analysis of environmental pollutants. *Science of the Total Environment* 228, 243-257.
- Nemati K, Abu Bakar NK, Bin Abas MR, Sobhazadeh E, Low KH (2010).** Comparative study on open system digestion and microwave assisted digestion methods for metal determination in shrimp sludge compost. *Journal of Hazardous Materials* 182, 453-459.
- Nicholson FA, Smith SR, Alloway BJ, Carlton-Smith C, Chambers BJ (2003).** An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Science of the Total Environment* 311, 205-219.
- Nieuwenhuize J, Poley-Vos CH, Van den Akker AH, Van Delft W (1991).** Comparison of microwave and conventional extraction techniques for the determination of metals in soil, sediment and sludge samples by atomic spectrometry. *Analyst* 116, 347-351.

- NPI (2014).** Copper and compounds. National Pollutant Inventory. Department of the Environment, Australian Government. Canberra, ACT, Australia.
- Nóvoa-Muñoz JC, Queijeiro JMG, Blanco-Ward D, Álvarez-Olleros C, Martínez-Cortizas A, García-Rodeja E (2007).** Total copper content and its distribution in acid vineyards soils developed from granitic rocks. *Science of the Total Environment* 378, 23–27.
- Nriagu JO (1990).** Global metal pollution. Poisoning the biosphere? *Environment* 32, 28-33.
- NSW EPA (1997).** Environmental guidelines: Use and disposal of biosolids products. New South Wales Environmental Protection Authority, Sydney, NSW, Australia.
- OECD (2006).** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 2: Effects on Biotic Systems Test No. 208: Terrestrial Plant Test. OECD, Paris, France.
- Oliver MA (1997).** Soil and human health: a review. *European Journal of Soil Science* 48, 573-592.
- Page GW (1997).** Contaminated sites and Environmental Clean up: International approaches to Prevention, Remediation and Reuse. Academic Press. San Diego, California, USA.
- Pérez L, Moreno AM, González J (2000).** Valoración de la calidad de un suelo en función del contenido y disponibilidad de metales pesados. *Edafología* 7(3), 113–120.
- Pérez C, Martínez MJ, Vidal J, Navarro C (2002).** Proposed reference values for heavy metals in Calcaric Fluvisols of the Huera de Murcia (SE Spain). In: Proceedings of the International Symposium on Sustainable Use and Management of Soils in Arid and Semiarid Regions, A. Faz, R. Ortiz and A.R. Mermut (Eds.), Cartagena, Spain, pp. 495-496.
- Peris M (2005).** Estudio de metales pesados en suelos bajo cultivos hortícolas de la provincia de Castellón. PhD Thesis. Universitat de València, Valencia, Spain.
- Peris M, Micó C, Recatalá L, Sánchez R, Sánchez J (2007).** Heavy metal contents in horticultural crops of a representative area of the European Mediterranean region. *Science of the Total Environment* 378, 42–48.
- Pietrzak U, Uren NC (2011).** Remedial options for copper-contaminated vineyard soils. *Soil Research* 49, 44–55.

- Pinamonti F, Stringari G, Gasperi F, Zorzi G (1997).** The use of compost: its effects on heavy metal levels in soil and plants. *Resources, Conservation and Recycling* 21, 129-143.
- Planquart P, Bonin G, Prone A, Massiani C (1999).** Distribution, movement and plant availability of trace metals in soils amended with sewage sludge composts: application to low metal loadings. *Science of the Total Environment* 241, 161-179.
- Porta J, López-Acevedo M, Rodríguez R (1986).** Técnicas y Experimentos en Edafología. 2ª Edición. Col.legi Oficial d'Enginyers Agrònoms de Catalunya, Barcelona, Spain.
- Porta J, López-Acevedo M, Poch R (2008).** Introducción a la Edafología. Uso y Protección del Suelo, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Spain.
- Pueyo M, López-Sánchez FJ, Rauret G (2004).** Assessment of CaCl_2 , NaNO_3 and NH_4NO_3 extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soils. *Analytica Chimica Acta* 504, 217-226.
- Puga S, Sosa M, Lebgue T, Quintana C, Campos A (2006).** Heavy metals pollution in soils damaged by mining industry. *Ecología Aplicada* 5, 149–155.
- Quevauviller PH (1996).** Certified reference materials for the quality control of total and extractable trace element determinations in soils and sludges. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 27, 403-418.
- Quevauviller PH, Muntau H, Fortunati U, Vercoutere K (1996a).** The certification of the total content (mass fractions) of Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb and Zn and the aqua regia soluble contents (mass fractions) of Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Ni, Pb and Zn in a calcareous loam soil (BCR-141R) EUR 16890 EN. European Commission, Reference Materials, BCR Information, Luxembourg.
- Quevauviller PH, Lachica M, Barahona E, Rauret G, Ure AM, Gomez A, Muntau H (1996b).** Interlaboratory comparison of EDTA and DTPA procedures prior to certification of extractable trace elements in calcareous soil. *The Science of the Total Environment* 178, 127-132.
- Radu T, Diamond D (2009).** Comparison of soil pollution concentrations determined using AAS and portable XRF techniques. *Journal of Hazardous Materials* 171, 1168-1171.

- Rahman MM, Azirun SM, AN Boyce (2013).** Enhanced Accumulation of Copper and Lead in Amaranth (*Amaranthus paniculatus*), Indian Mustard (*Brassica juncea*) and Sunflower (*Helianthus annuus*). *PLoS ONE* 8(5): e62941.
- Rauret G (1998).** Extraction procedures for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment. *Talanta* 46, 449-455.
- Rauret G, López-Sánchez JF, Bacon J, Gomez A, Muntau H, Quevauviller PH (2001).** Certification of the contents (mass fraction) of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Cu in an organic-rich soil following harmonized EDTA and acetic acid extraction procedures (BCR-700). EUR 19774 EN. European Commission, Reference Materials, BCR Information, Luxembourg.
- Rayment GE, Lyons DJ (2010).** Soil Chemical Methods – Australasia. CSIRO Publishing, Queensland, Australia.
- Recatalá L, Micó C, Sánchez J, Boluda R (2001).** Approaches for characterising contaminated sites: an analysis considering the role of soil. In: *Ecosystems and Sustainable Development III, Third International Conference on Ecosystems and Sustainable Development*. Villacama Y, Brebbia CA and Usó JL (Eds). Wessex Institute of Technology, Wessex, UK, pp. 347-356 .
- Recatalá L, Segura M, Pastor A, Murillo R, Sánchez J (2009).** Cambios de usos del suelo, procesos de desertificación, impactos ambientales e implicaciones en la calidad ambiental a nivel municipal. Capítulo 6. In: *Indicadores e Índices Integrados en la Agenda 21 Local para la Evaluación de la Calidad Ambiental en Áreas Afectadas por Desertificación del Ámbito Mediterráneo*, Recatalá (Dir.). CIDE-Centro de Investigaciones sobre Desertificación, Universitat de València, Fundación Biodiversidad, Valencia, Spain.
- Recatalá L, Sánchez J, Arbelo C, Sacristán D (2010).** Testing the validity of a Cd soil quality standard in representative Mediterranean agricultural soils under an accumulator crop. *Science of the Total Environment* 409, 9–18.
- Recatalá L, Sacristán D, Arbelo C, Sánchez J (2012).** Can a single and unique Cu soil quality standard be valid for different Mediterranean agricultural soils under an accumulator crop? *Water, Air and Soil Pollution* 223, 1503-1517.

- Reeves RD, Baker AJM (2000).** Metal-accumulating plants. In: *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*, Raskin I, Ensley BD (Eds.). John Wiley and Sons, New York, USA, pp. 193-229.
- Reidinger S, Ramsey MH, Hartley SE (2012).** Rapid and accurate analyses of silicon and phosphorus in plants using a portable X-ray fluorescence spectrometer. *New Phytologist* 195, 699-706.
- Rezvani M, Zaefarian F (2011).** Bioaccumulation and translocation factors of cadmium and lead in *Aeluropus littoralis*. *Australian Journal of Agricultural Engineering* 2(4), 114-119.
- Rieuwerts JS, Ashmore MR, Farago ME, Thornton I (2006).** The influence of soil characteristics on the extractability of Cd, Pb, and Zn in upland and moorland soils. *Science of the Total Environment* 366, 864–875.
- Rigney JA, Fielding J (1956).** Some factors affecting the accuracy of soil sampling. *Soil Science Society of America Proceedings* 10, 257-258.
- Ritchie GSP, Sposito G (1995).** Speciation in soils. In: *Chemical Speciation in the Environment*, Ure AM, Davidson CM (Eds.). Blackie Academic & Professional, Glasgow, Scotland, pp. 201-233.
- Rooney CP, Zhao FJ, McGrath SP (2006).** Soil factors controlling the expression of copper toxicity to plants in a wide range of European soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 726–732.
- Romero-Freire A, Martin peinado FJ, van Gestel CAM (2015).** Effect of soil properties on the toxicity of Pb: Assessment of the appropriateness of guideline values. *Journal of Hazardous Material* 289, 46–53.
- Romic M, Romic D (2003).** Heavy metals distribution in agricultural topsoils in urban area. *Environmental Geology* 43, 795–805
- Rosen GD, Roberts PA (1996).** Comprehensive survey of the response of growing pigs to supplementary copper in feed. Field Investigations and Nutrition Service, Ltd, London, UK.
- Ross SM (1994a).** Toxic metals in soil–plant systems. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Ross SM (1994b).** Retention, transformation and mobility of toxic metals in soils. In: *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*, Ross SM (Ed.). John Wiley & Sons, Chichester, UK.

- Ross SM (1994c).** Sources and forms of potentially toxic metals in soil-plant systems. In: Toxic Metals in Soil-Plant Systems, Ross SM (Ed.). John Wiley & Sons, Chichester.
- Ross SM, Kaye KJ (1994).** The meaning of metal toxicity in soil-plant systems. In: Toxic Metals in Soil-Plant Systems, Ross SM (Ed.). John Wiley & Sons Inc., Chichester, UK pp. 27-61.
- Ruyters S, Salaets P, Oorts K, Smoldres E (2013).** Copper toxicity in soils under established vineyards in Europe: A survey. *Science of the Total Environment* 443, 470 - 477.
- Rusjan D (2012).** Copper in Horticulture. In D. Dhanasekaran, N. Thajuddin and A. Panneerselvam (Eds.), Fungicides for Plant and Animal Diseases (pp 257-278). (InTech). ISBN: 978-953-307-804-5, Available from: <http://www.intechopen.com/books/fungicides-for-plant-and-animal-diseases/copper-in-horticulture>
- SA EPA (1996).** South Australian biosolids guidelines for the safe handling, reuse or disposal of biosolids. Department of Environment and Natural Resources, South Australian Environment Protection Authority, Adelaide, SA, Australia.
- Sacristán D, Peñarroya B, Recatalá L (2014).** Increasing the knowledge on the management of Cu-contaminated agricultural soils by cropping tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Land Degradation & Development* (in press).
- Safari Sinegani AA, Khalilikhah F (2008).** Phytoextraction of lead by *Helianthus annuus*: effect of mobilising agent application time. *Plant Soil and Environment* 54(10), 434–440.
- Sahuquillo A, López-Sánchez FJ, Rubio R, Rauret G, Thomas RP, Davidson CM, Ure AM (1999).** Use of a certified reference material for extractable trace metals to assess sources of uncertainty in the BCR three-stage sequential extraction procedure. *Analytica Chimica Acta* 182, 317-327.
- Sahuquillo A, Rigol A, Rauret G (2003).** Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. *Trends in Analytical Chemistry* 22, 152-159.
- Sánchez J, Marino N, Vaquero MC, Ansorena J, Legórburu I (1998).** Metal pollution by old lead-zinc mines in Urumea River Valley (Basque Country, Spain). Soil, biota and sediment. *Water, Air and Soil Pollution* 107, 303-319.

- Sánchez J, Recatalá L, Micó C, Peris M (2004).** Contenido de metales pesados en suelos agrícolas y su influencia en cultivos hortícolas. Valencia: Informe Anual de Proyecto. CIDE-Centro de Investigaciones sobre Desertificación (CSIC, Universitat de València, Generalitat Valenciana), Valencia, Spain.
- Sánchez-Camazano M, Sánchez-Martín-MJ, Lorenzo LF (1998).** Significance of soil properties for content and distribution of cadmium and lead in natural calcareous soils. *Science of the Total Environment* 218, 217-226.
- Sandroni V, Smith CMM (2002).** Microwave digestion of sludge, soil and sediment samples for metal analysis by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 468, 335-344.
- Sastre J, Sahuquillo A, Vidal M, Rauret G (2002).** Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction. *Analytical Chimica Acta*, 462 (1), 59-72.
- Schabenberger O, Tharp B, Kells JJ, Penner D (1999).** Statistical tests for hormesis and effective dosages in herbicide dose response. *Agronomy Journal* 91, 713-721.
- Schäfer KW (1996).** International Experience and Expertise in Registration, Investigation, Assessment, and Clean-up of Contaminated Military sites, R&D Project 10340102/01, Umweltdaten (German Ministry of Environment), Berlin, Germany.
- Schleuß U, Müller F (2001).** Requirements for soil sampling in the context of ecosystems research. *Science of the Total Environment* 264, 193-197.
- Schramel O, Michalke B, Kettrup A (2000).** Study of the copper distribution in contaminated soils of hop fields by single and sequential extraction procedures. *Science of the Total Environment* 263, 11-22.
- Scott D, Thomas JH (1977).** Comparative efficiencies of various methods for extracting trace heavy metals from soils. *Soil Science* 124, 319-322.
- Shaw J (1990).** Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.

- Sherameti I, Varma A (2010).** Soil heavy metals. Springer, Germany.
- Shuman LM (1991).** Chemical forms of micronutrients in soils. In: Micronutrients in agriculture, Mortvedt JJ (Ed.). Soil Science Society of America, Book Series 4, Soil Science Society of America Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 113-144.
- Singh B (2001).** Heavy metals in soils: Sources, chemical reactions and forms. In: D. Smith, S. Fityus, & M. Allman (Eds.), Proceedings of the 2nd Australia and New Zealand. Conference on Environment Geotechnics Newcastle, NSW, Australia, pp. 77–93.
- Smith FE, Arsenault EA (1996).** Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. *Talanta* 43, 1207-1268.
- Soler-Rovira P, Madejon E, Madejon P, Plaza C (2010).** In situ remediation of metal-contaminated soils with organic amendments: Role of humic acids in copper bioavailability. *Chemosphere* 79, 844–849.
- Soon YK, Abboud S (1990).** Trace elements in agricultural soils of Northwestern Alberta. *Canadian Journal of Soil Science* 70, 277-288.
- Stalikas CD, Pilidis GA, Tzouwara-Karayanni SM (1999).** Use of a sequential extraction scheme with data normalisation to assess the metal distribution in agricultural irrigated by lake water. *Science of the Total Environment* 236, 7-18.
- Strawn DG, Baker LL (2008).** Speciation of Cu in a contaminated agricultural soil measured by XAFS, micro-XAFS, and micro-XRF. *Environmental Science & Technology* 42, 37–42.
- Sultan K (2007).** Distribution of Metals and Arsenic in Soils of Central Victoria (Creswick-Ballarat), Australia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 339–346.
- Swift RP (1995).** Evaluation of field portable X-ray fluorescence spectrometry method for use in remedial activities. *Spectrometry Eugene* 10(6), 31-35.
- Szczygłowska M, Piekarska A, Konieczka P, Namiesnik J (2011).** Use of Brassica Plants in the Phytoremediation and Biofumigation Processes. *International Journal of Molecular Science* 12, 7760-7771.

- Tambasco G, Sauvé S, Cook N, McBride M, Hendershot W (2000).** Phytoavailability of Cu and Zn to lettuce (*Lactuca sativa*) in contaminated urban soils. *Canadian Journal of Soil Science* 80(2), 309-317
- Tan KH (1994).** Soil and pollution. In: Environmental Soil Science, Tan KH(Ed.). Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Tessier A, Campbell PGC, Bisson M (1979).** Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry* 51, 844-851.
- Theocharopoulos S, Wagner G, Sprengart J, Mohr ME, Desales A, Muntau H, Christou M, Quevauviller PH (2001).** European soil sampling guidelines for soil pollution studies. *Science of the Total Environment* 264, 51-62.
- Tiller KG (1989).** Heavy metals in soils and their environmental significance. *Advances in Soil Science* 9, 113-142.
- Tiller KG (1992).** Urban soil contamination in Australia. *Australian Journal of Soil Research* 30, 937-957.
- Tóth G, Montanarella L, Stoloboy V, Máté F, Bódis K, Jones A et al. (2008).** Soils of the European Union. European Commission. Joint Research Centre. Institute for Environment and Sustainability. Office for Official Publications of the European Communities. Luxembourg.
- Tüzen M (2003).** Determination of heavy metals in soil, mushroom and plant samples by atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal* 74, 289-297.
- UIS (2014).** <http://www.uis-as.co.za/index.php/news/2-news/50-x-ray-fluorescence-spectroscopy-history-development-and-application> (29/05/2014).
- Umweltdaten (1999).** Federal Soil Protection and Contaminated Sites Ordinance (BBodschV), Umweltdaten (German Ministry of Environment). Berlin, Germany.
- Ure AM (1996).** Single extraction schemes for soil analysis and related applications. *Science of the Total Environment* 178, 3-10.

- Ure AM, Quevauviller PH, Muntau H, Griepink B (1993).** Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. *International Journal of Analytical Chemistry* 51, 135-151.
- USEPA (1989).** Risk assessment guidance for superfund. Volume I. Human Health Evaluation manual (Part A). United States Environmental Protection Agency (USEPA), Washington DC, USA.
- USEPA (1990a).** Method 3050. Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Soils. United States Environmental Protection Agency (USEPA), Washington DC, USA.
- USEPA (1990b).** Method 3051. Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, Soils, and Oils. United States Environmental Protection Agency (USEPA), Washington DC, USA.
- USEPA (1996).** Method 3052. Microwave Assisted Acid Digestion of Siliceous and Organically Based Matrices. Revision 0. United States Environmental Protection Agency (USEPA), Washington DC, USA.
- USEPA (1998).** Method 3051A. Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, Soils and Oils. Revision 1. United States Environmental Protection Agency (USEPA), Washington DC, USA.
- USEPA (2007a).** Method 6200. Field portable X-ray Fluorescence Spectrometry for the determination of elemental concentrations in soil and sediment. United States Environmental Protection Agency (USEPA), Washington DC, USA.
- USEPA (2007b).** Ecological soil screening levels for copper. Interim Final. United States Environmental Protection Agency (USEPA), Washington DC, USA.
- USEPA (2010).** Solid waste and emergency response glossary--Bioaccumulation: United States Environmental Protection Agency (USEPA), access date June 29, 2013.
- Van Camp L, Bujarrabal B, Gentile AR, Jones RJA, Montanarella L, Olazabal C, Selvaradjou SK (2004).** Reports of the Technical Working Groups Established Under the Thematic Strategy for Soil Protection. Volume IV. Contamination and Land Management. EUR 21319 EN/4, Luxembourg.

- VARIAN (1997).** Atomic Spectroscopy. VARIAN Inc., Varian Australia Pty Ltd., Australia.
- Vega FA, Andrade ML, Covelo EF (2010).** Influence of soil properties on the sorption and retention of cadmium, copper and lead, separately and together, by 20 soil horizons: Comparison of linear regression and tree regression analyses. *Journal of Hazardous Materials* 174, 522–533.
- Vegter JJ (1995).** Soil protection in the Netherlands. In: Heavy Metals Problems and Solutions, Salomons W, Förstner U, Mader P (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 79-100.
- Victorian EPA (1997).** Environmental guidelines for the management of biosolids (Draft). Environment Protection Authority, Melbourne, Victoria, Australia.
- Viscarra Rossel RA, Webster, R (2012).** Predicting soil properties from the Australian soil visible–near infrared spectroscopic database. *European Journal of Soil Science* 63(6), 848-860.
- Wang Y, Björn LO (2014).** Heavy metal pollution in Guangdong Province, China, and the strategies to manage the situation. *Frontiers in Environmental Science* 2, 1–12.
- Wei YL, Shyu HM, Joehuang KL (1997).** Comparison of microwave vs. hot-plate digestion for nine real-world river sediments. *Journal of Environmental Quality* 26, 764-768.
- Wei B, Yang L (2010).** A review of heavy metal contaminations in urban soils, urban road dusts and agricultural soils from China. *Microchemical Journal* 94, 99–107.
- Weindorf DC, Zhu Y, Chakraborty S, Bakr N, Huang B (2012).** Use of portable X-ray fluorescence spectrometry for environmental quality assessment of peri-urban agriculture. *Environmental Monitoring and Assessment* 184, 217-227.
- Welch CD, Fitts JW (1956).** Some factors affecting soil sampling. *Soil Science Society of America Proceedings* 20, 54-56.
- Wightwick AM, Mollah MR, Partington DL, Allinson G (2008).** Copper fungicides residues in Australian vineyards soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 2457–2464.
- Wong SC, LI XD, Zhang G, Qi SH, Min YS (2002).** Heavy metals in agricultural soils of the Pearl River Delta, South China. *Environmental Pollution* 119, 33–44.

WRB (2006). World reference base for soil resources. A framework for international classification, correlation and communication. World soil resources report 103. Second edition. IUSS Working Group WRB. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome

Yang Y, Zhang FS, Li HF, Jiang RF (2009). Accumulation of cadmium in the edible parts of six vegetable species grown in Cd-contaminated soils. *Journal of Environmental Management* 90, 1117–1122.

Yoon J, Cao X, Zhou Q, Ma LQ (2006). Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment* 368, 456–464

Yrulea I (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17(1), 145-156.