



Ecosistemas

ISSN: 1132-6344

revistaecosistemas@aeet.org

Asociación Española de Ecología Terrestre  
España

Bernal, M.P.; Clemente, R.; Vazquez, S.; Walker, D.J.  
Aplicación de la fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar  
Ecosistemas, vol. 16, núm. 2, 2007, pp. 1-14  
Asociación Española de Ecología Terrestre  
Alicante, España

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54016208>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica  
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



## Monográfico

### Investigación

Bernal M.P., Clemente R., Vazquez S., Walker D.J. 2007. Aplicación de la fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar. *Ecosistemas*. 2007/2 68-82

(URL: [http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?id=483&Id\\_Categoria=2&tipo=portada](http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?id=483&Id_Categoria=2&tipo=portada))

## Aplicación de la fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar

M.P. Bernal, R. Clemente<sup>(1)</sup>, S. Vazquez<sup>(2)</sup>, D.J. Walker<sup>(3)</sup>

(1) Dpto. Conservación de Suelos y Agua y Manejo de Residuos Orgánicos, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CSIC, Apartado 164, 30100 Murcia. ([pbernal@cebas.csic.es](mailto:pbernal@cebas.csic.es))

(2) Dpto. Química Agrícola. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Madrid ([saul.vazquez@uam.es](mailto:saul.vazquez@uam.es))

(3) Dpto. Recursos Naturales, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario. Calle Mayor s/n, La Alberca, 30150 Murcia. ([davidj.walker@carm.es](mailto:davidj.walker@carm.es))

*Aplicación de la fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar. El vertido de lodo pirítico procedente de la mina de Aznalcóllar en 1998 afectó a 4286 ha de suelo de los que el 59,7 % eran suelos agrícolas. Los principales elementos responsables de la contaminación fueron As, Cd, Cu, Pb, y Zn, junto con la acidificación de los suelos causada por la oxidación de los sulfuros metálicos. Este caso dramático de contaminación supuso un extraordinario movimiento de la comunidad científica española y extranjera, que permitió poner en práctica técnicas biológicas de recuperación basadas en el uso de plantas (fitorremediación), que permitiera el desarrollo del plan del Corredor Verde del Guadiamar por la Junta de Andalucía. La dificultad del caso estriba en la contaminación múltiple, la escasa estabilidad química de los contaminantes y su carácter acidificante. Este trabajo muestra brevemente algunos trabajos de fitorremediación realizados *in situ* en parcelas de experimentación. Se ha evaluado la utilidad de diversas técnicas: la fitoextracción mediante mostaza india, una planta agrícola de alta biomasa capaz de acumular los metales en su parte aérea, junto con la mejora de los suelos mediante enmiendas orgánicas y calizas; y la fitoimmobilización mediante el altramuz, que es una leguminosa tolerante a los metales por exclusión en sus raíces y a ciertas condiciones de acidez del suelo.*

*Palabras clave: metales pesados, lodo pirítico, suelos contaminados, fitoextracción, fitoimmobilización.*

*The application of phytoremediation technologies to metal-contaminated soils in Aznalcóllar. The spill of pyrite sludge from the Aznalcóllar mine in 1998, affected 4286 ha of land, 59.7 % of which was agricultural. The main contaminants were As, Cd, Cu, Pb and Zn, their effects being exacerbated by the soil acidification caused by the oxidation of metallic sulphides. This dramatic case of soil pollution mobilised the Spanish and international scientific communities, with the aim of applying biological techniques for soil remediation based on the use of plants (phytoremediation). These were fundamental in the development of the "Green Corridor of Guadiamar" land recuperation plan by the Andalusian regional government. Difficulties arose from the multi-element contamination, the chemical instability of the contaminants and the acidic nature of the contamination. This article briefly describes some phytoremediation experiments carried out *in situ* in experimental plots. The feasibility of certain phytoremediation techniques has been evaluated: phytoextraction by Indian mustard, a high-biomass crop able to accumulate metals in its aerial parts, in combination with the improvement of soil properties by the application of organic and calcareous amendments, and phytoimmobilisation using white lupin, a leguminous species tolerant of heavy metals due to their immobilisation in the roots and, to a certain degree, tolerant of soil acidity.*

*Key words: heavy metals, pyritic sludge, soil contamination, phytoextraction, phytoimmobilisation.*

### Introducción

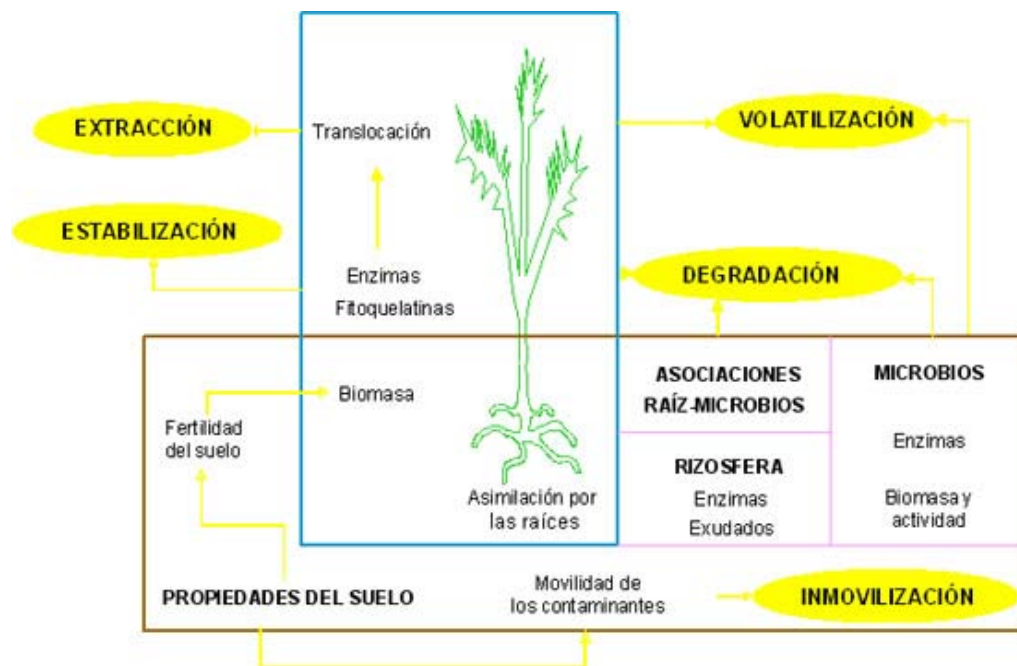
La contaminación antrópica del suelo aparece cuando una sustancia está presente a concentración superior a sus niveles naturales, y tiene un impacto negativo en alguno o todos los constituyentes del mismo. Los niveles normales de metales

contaminado dependen del elemento en cuestión, uso del suelo y la legislación de cada país. La Agencia Europea del Medio Ambiente estimó en 1999 entre 300.000 y 1,500.000 el número de zonas contaminadas en Europa Occidental. Según el Inventario Nacional de Suelos Contaminados, se estiman 4.532 emplazamientos potencialmente contaminados en España, excluyendo los lugares contaminados con residuos radiactivos, mineros y efluentes cuyo vertido se encuentra regulado. Las principales actividades humanas responsables de la contaminación son: la agricultura, el transporte, la generación de energía, la minería y otras actividades industriales.

La recuperación de suelos contaminados mediante métodos físicos o químicos “tradicionales” es generalmente rápida pero cara. Esta puede realizarse “*in situ*” (tratando el suelo en su lugar) o “*ex situ*” (tratamiento tras transporte del suelo). Las técnicas biológicas, o biorremediación, tienen como objetivo básico promover los procesos naturales y desarrollar técnicas para acelerar estos procesos en la recuperación de suelos y sedimentos contaminados. Dentro de las técnicas biológicas o ecológicas, el uso de plantas (fitorremediación; “fito”, del griego “phyto”, que significa “planta”) se considera potencialmente capaz de dar soluciones *in situ*, con un gasto financiero y tecnológico relativamente bajo. Además, el resultado, una cobertura “verde”, es más agradable estéticamente y, hoy en día, más aceptable para el público, siendo más “ecológico”. La fitorremediación se puede definir como el uso combinado de plantas, enmiendas del suelo (abonos, etc.) y prácticas agronómicas (cultivo del suelo) para eliminar contaminantes del medio ambiente o reducir su toxicidad.

Las enmiendas orgánicas se utilizan tradicionalmente para mejorar su fertilidad de suelos agrícolas, ya que la materia orgánica mejora propiedades físicas de los suelos como son la capacidad de retención hídrica, la capacidad de infiltración de agua, la porosidad y la aireación del suelo, promoviendo la formación de agregados estables. Estas enmiendas también son fuente de nutrientes esenciales para las plantas, y favorecen la actividad y desarrollo de los microorganismos del suelo, mejorando su fertilidad química y biológica. Estas propiedades de la materia orgánica son todavía más importantes en la recuperación de los suelos contaminados, ya que, con frecuencia, estos suelos muestran una escasa fertilidad, estructura deficiente y limitada actividad biológica.

La fitorremediación contempla seis procesos básicos a través de los cuales las plantas pueden contribuir a la recuperación de suelos, sedimentos y aguas contaminadas (**Fig. 1**). Dependiendo de la estrategia de recuperación, estos procesos darán lugar a la contención o a la eliminación de los contaminantes del suelo. La fitoestabilización y la fitoinmovilización corresponden a la primera de las dos estrategias, mientras que la fitoextracción, fitodegradación, fitovolatilización y rizofiltración representan procesos de eliminación.



**Figura 1.** Procesos implicados en la fitorremediación de suelos contaminados (adaptado de Wenzel *et al.*, 1999).

## El accidente minero: Consecuencias para los suelos y origen de la contaminación

### Descripción del accidente

El yacimiento minero de Aznalcóllar se encuentra situado en la Franja Pirítica Ibérica, que se extiende desde el centro sur de España hasta Portugal. Algunas de las minas han estado en explotación desde la época romana para la extracción de plata, plomo, cinc, y cobre. En Aznalcóllar se abrió un nuevo corte en 1996, llamado 'Los Frailes', con una reserva estimada del mineral de 75 Mt, de una riqueza media de 3,87% de Zn, 2,21% de Pb, 0,35% de Cu y  $63 \mu\text{g g}^{-1}$  de Ag (López-Pamo *et al.*, 1999), y una producción anual de 400.000 toneladas de concentrado. En este tipo de mina, el mineral se muele, lava y los sulfuros metálicos se separan por flotación. En el proceso se generan cantidades enormes de estériles y de aguas ácidas. Los estériles se almacenan como lodos, generalmente en un depósito construido. El depósito de estériles en Aznalcóllar se situó en el margen derecho del río Agro, 2 kilómetros aguas arriba de la confluencia con el río Guadiamar, del que es afluente. El depósito de estériles fue ampliado varias veces y, en el momento del accidente, la superficie total era de 150 ha, divididas en dos partes de 110 y 40 ha. La presa tenía aproximadamente 25 m de alto.

El 25 de abril de 1998 se abrió una brecha de unos 50 m de ancho en la presa de la balsa de acumulación de estériles de Aznalcóllar. Aproximadamente  $4 \cdot 10^6 \text{ m}^3$  de agua ácida y  $2 \cdot 10^6 \text{ m}^3$  de lodo minero fueron vertidos al río Agro (Grimalt *et al.*, 1999) y cerca de  $25 \cdot 10^6 \text{ m}^3$  de lodo permanecieron en la balsa. Este vertido repentino de agua y lodo cubrió una media de 400 m a ambos márgenes de los ríos Agro y Guadiamar, afectando a la vegetación y los cultivos. El lodo cubrió 2.616 ha de suelo a lo largo de 40 kilómetros. La zona más afectada, localizada en los 2 km más próximos a la mina, quedó cubierta por una capa de lodo superior a 10 cm de espesor. El agua contaminada alcanzó otros 20 kilómetros río abajo del Guadiamar, donde fue embalsada mediante la construcción urgente de varios muros de contención, evitando su entrada en el Parque Nacional de Doñana, Patrimonio de la Humanidad y Reserva de la Biosfera. El tratamiento químico de las aguas consistió en la adición de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y de NaOH para neutralizar el pH altamente ácido y precipitar metales en forma de hidróxidos y carbonatos.

La Junta de Andalucía estableció la prohibición de cualquier actividad agrícola, caza, o pesca en los ríos afectados, y en el río Guadalquivir, incluyendo su desembocadura. Se realizaron diversos estudios para determinar niveles de contaminación en el agua de pozos, la contaminación del aire por material particulado en todas las áreas afectadas y poblaciones próximas, y los niveles del contaminante en peces, crustáceos, aves y vertebrados terrestres (véase el volumen monográfico de la revista *Science of the Total Environment* 242 publicado en 1999).

La superficie de suelo afectado por el vertido fue de 4.286 ha, incluyendo 2.557 ha de suelos agrícolas (59,7% de área afectada total), 1.054 ha de bosque, y 98 ha del parque nacional de Doñana. De junio a diciembre de 1998 se eliminó la mayoría del lodo, junto con los primeros centímetros superiores del suelo, usando maquinaria pesada, palas y camiones (**Fig. 2**). La cantidad total de material contaminado fue de  $5,21 \cdot 10^6 \text{ m}^3$ :  $1,98 \cdot 10^6 \text{ m}^3$  de lodo y  $3,23 \cdot 10^6 \text{ m}^3$  de la capa superficial de suelo. Todo ese material fue depositado en la antigua corta de la mina de Aznalcóllar.



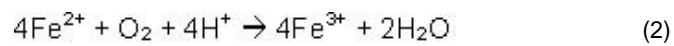
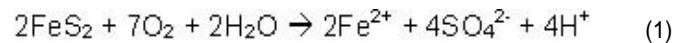
**Figura 2.** Proceso de limpieza del lodo pirítico con maquinaria pesada.

## La contaminación del suelo

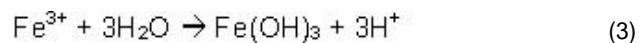
La contaminación del suelo tuvo lugar en tres etapas:

1. Contaminación inicial debido al vertido, con infiltración heterogénea en el suelo y tendencia a la acidificación, neutralizada en parte por la presencia de  $\text{CaCO}_3$  en el suelo. Contaminantes principales: As, Cd, Cu, Pb, Sb, Tl y Zn.
2. Contaminación secundaria, a partir de mayo de 1998, como consecuencia del secado parcial de los lodos, la oxidación y disolución de los sulfuros a sulfatos metálicos, produciendo un polvo blanco en la superficie. El viento transportó fácilmente los sulfatos, que también se disolvieron por la lluvia, penetrando en el suelo.
3. Contaminación terciaria, que ocurrió tras la retirada de los lodos del suelo, por oxidación de sulfuros que habían penetrado en el mismo. El agua ácida se había infiltrado en capas más profundas del suelo y el lodo se introdujo en el suelo a través de macroporos y grietas.

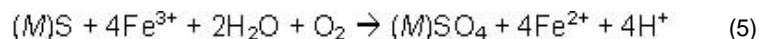
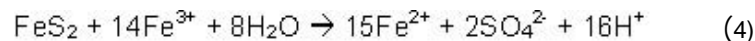
El proceso de oxidación de los sulfuros metálicos conlleva la formación de una capa blanca superficial de sulfatos solubles, como resultado de reacciones químicas y biológicas. La oxidación bacteriana de la pirita por *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans* o *Leptospirillum ferrooxidans*, puede ser 10-20 veces más rápida que la oxidación química. La oxidación química resultó favorecida por la lluvia de primavera, el fino tamaño de partícula de los lodos y la presencia de Fe (III). El proceso de oxidación se puede resumir en las siguientes reacciones:



El  $\text{Fe}^{3+}$  formado en la reacción (2) puede hidrolizarse:



O puede oxidar a otros residuos de pirita y/o a sulfuros metálicos:



La presencia de  $\text{CaCO}_3$  en el suelo neutraliza la acidez producida, la oxidación del  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  es rápida, y facilita la precipitación del Fe. Finalmente, los sulfatos precipitan con Ca, formando yeso.



La contaminación de metales pesados más severa ocurrió en la capa superficial (0-20 cm) de la mayoría de los suelos, afectando gravemente a las plantas de raíces poco profundas y a la microfauna. Las concentraciones de metales en el suelo fueron muy variables, consecuencia de la heterogeneidad de la contaminación del metal. Esta heterogeneidad fue promovida por un procedimiento de limpieza necesariamente desigual, visible por las manchas negras de lodo (**Fig. 3**), y por la diferente tasa de infiltración y absorción de los metales en el suelo. Estas dependen, a su vez, de características del mismo como textura, contenido de  $\text{CaCO}_3$ , y concentración de carbono orgánico. La mayor contaminación se debió a As y Zn, que mostraron una alta solubilidad en los suelos afectados. El nivel biogeoquímico establecido de As, Cu, Pb, Zn, y Fe en los suelos se estimó en  $31 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $36 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $47 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $109 \mu\text{g g}^{-1}$  y 3.03%, respectivamente (López-Pamo *et al.*, 1999).



**Figura 3.** Manchas de lodo en el suelo durante el proceso de limpieza.

La Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía clasificó el grado de contaminación de los suelos en base a unos niveles máximos de concentración de los principales contaminantes: As, Cd, Cu, Pb y Zn (Orden de 18/12/1998 de la Junta de Andalucía) y considerando el destino de cada zona: Corredor Verde como zonas menos sensibles y aquellas para uso de los ciudadanos como zonas sensibles. Los valores están dentro del intervalo de concentraciones totales permitidas en otros países para situaciones similares (**Tabla 1**), a excepción del Cu, con valores permitidos más altos. Los suelos con concentraciones superiores a los indicados requieren intervención. Se desarrolló el programa de investigación llamado 'PICOVER', implicando diversas universidades y centros de investigación de 1999 a 2002, con el objeto de obtener la información científica necesaria para desarrollar el proyecto 'Corredor Verde del Guadiamar', cuyo objetivo era el reconocimiento del río Guadiamar y su cuenca como un corredor natural entre Doñana y Sierra Morena.

Para estudiar las tecnologías de fitorremediación y su aplicación a los suelos afectados, la Junta de Andalucía estableció 4 zonas de experimentación, cubriendo distintos tipos de suelos y grado de contaminación. Estas zonas cubren 20.000 m<sup>2</sup> cada una, y están divididas en 20 parcelas de 1.000 m<sup>2</sup>. El desarrollo adecuado de un programa de fitorremediación requiere un conocimiento preciso de los condicionantes físico-químicos y biológicos de los suelos sobre el crecimiento vegetal, y los medios por los cuales pueden ser superados, para minimizar los riesgos a largo plazo para la calidad ambiental.

**Tabla 1.** Niveles de metales ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) en los suelos que requieren intervención según la Junta de Andalucía y comparación con las concentraciones máximas permitidas en otros países y para diferentes usos (Bernal *et al.*, 2007).

	Junta de Andalucía, 1998	Reino Unido, 1987	UE, 1986	USA, 1990	Canadá, 1999	Alemania 1999	Australia 1999	Holanda 2000
	Menos sensibles/ sensibles	Residencial / construido	pH 6-7	Todos*	Industrial	Agricultura limo/arcilla	Residencial/ industrial	Todos
<b>As</b>	100 / 52	n.i.	n.i.	5	39	n.i.	100/500	55
<b>Cd</b>	10 / 5	3/12	1/3	1	192	1/1.5	20/100	12
<b>Cu</b>	500 / 250	130/130	50/140	5	15921	40/60	1000/5000	190
<b>Pb</b>	500 / 350	500/2000	50/300	5	744	70/100	300/1500	530
<b>Zn</b>	1200/ 700	300/300	150/300	5	n.i.	150/200	7000/35000	720

\*Extraible en 0.1 M CH<sub>3</sub>COOH; n.i.: no indicado.

## Estrategias de fitorremediación

### Claves para la elección de la estrategia

El objetivo básico de la biorremediación es promover los procesos naturales (atenuación natural) y desarrollar técnicas para acelerar estos procesos en la recuperación de suelos y sedimentos contaminados. En el caso que nos ocupa, las tecnologías que se han ensayado son:

- Fitoextracción – la acumulación de los metales en las partes cosechables de las plantas y su eliminación del medio.
- Fitoimmobilización – la reducción de la “disponibilidad” de los metales en el suelo, mediante adsorción o absorción, precipitación o quelatación en las raíces o en la rizosfera.

En los suelos afectados por el vertido de Aznalcóllar nos enfrentamos a unas condiciones específicas que se deben solventar para poder abordar una estrategia de fitorremediación, como son:

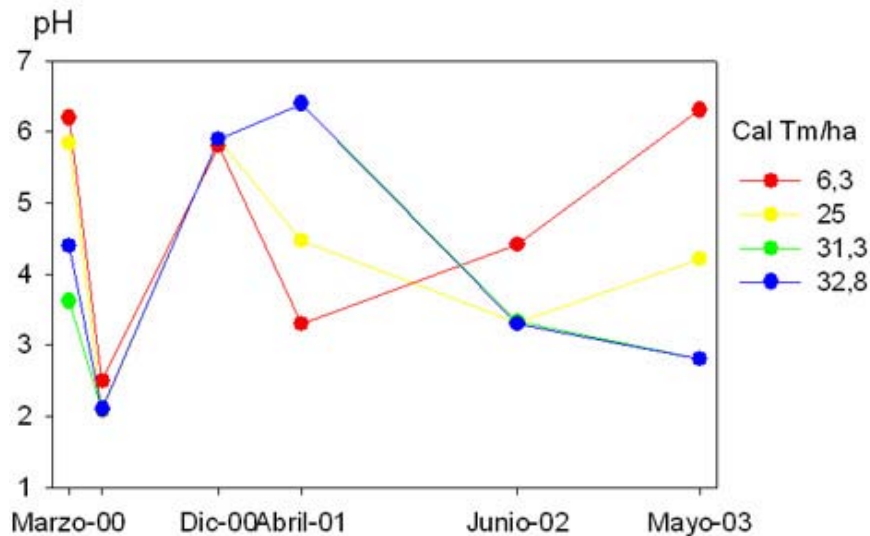
- Acidez del suelo con distribución heterogénea.
- Altas concentraciones de varios metales y arsénico.
- Variabilidad espacial de la solubilidad y toxicidad de los metales .
- Pobre fertilidad física, química y biológica del suelo, debido a la eliminación de la capa superficial fértil de suelo.

Bajo estas circunstancias, nos encontramos con la necesidad de acondicionar el suelo para permitir el crecimiento vegetal, bien por introducción de la vegetación o por desarrollo de una vegetación espontánea. Valores de pH del suelo inferiores a 5 resultan inadecuados para el desarrollo vegetal, sin embargo los valores de pH de los suelos alcanzaron 2,9, por lo que se precisó la adición de enmiendas calizas que neutralizaran la acidez. Por otra parte, la eliminación de la capa superficial del suelo dejó los suelos desnudos y con escasa fertilidad. Así, el contenido medio de carbono orgánico de los suelos fue menor del 1%, por lo que se precisó el aporte de enmiendas orgánicas como estiércol y compost.

### Experimento de fitorremediación

Utilizando las parcelas de experimentación diseñadas por la Junta de Andalucía en la zona denominada 'El Vicario', 10 km al sur de Aznalcóllar, se desarrolló un proyecto de fitorremediación de 4 años de duración, basado en el uso de enmiendas orgánicas y de plantas para recuperar la zona. En una primera fase de “fitorremediación activa” se utilizaron enmiendas del suelo (cal y materia orgánica), y especies tolerantes a metales pesados que mostraban tanto estrategias de acumulación como de exclusión. En una segunda fase, de “Atenuación Natural”, se dejaron los suelos evolucionar sin intervención alguna, permitiendo el desarrollo de vegetación espontánea.

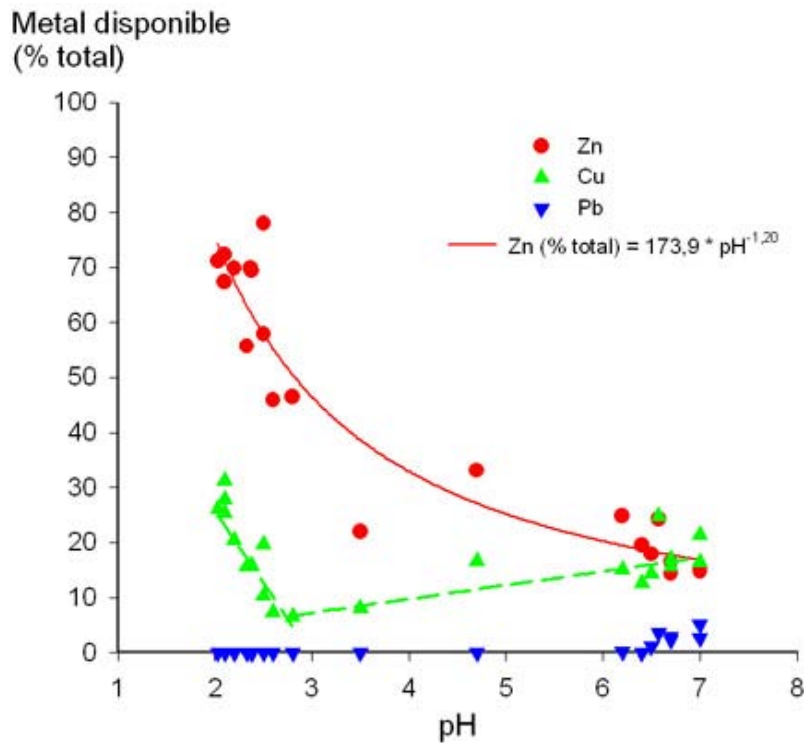
Inicialmente el suelo mostró una gran variabilidad de pH (entre 2,9 y 6,7), pero en los meses siguientes los valores disminuyeron drásticamente como consecuencia de la oxidación de los restos de piritita en el suelo, como se ha comentado anteriormente. La adición de enmienda caliza tuvo un efecto inmediato en el pH del suelo, logrando que suelos con pH entre 2-3 aumentaran a valores cercanos a 6, cinco meses después del tratamiento (**Fig. 4**). La persistencia de los efectos fue breve, dominando la disminución de los valores en los siguientes 6 meses. Aunque el  $\text{CaCO}_3$  es capaz de neutralizar la acidez del suelo, la persistencia de fenómenos de oxidación de sulfuros y el lavado de cationes por agua de lluvia hizo disminuir el pH del suelo. Cabe destacar, sin embargo, que no se alcanzaron valores tan bajos de pH como los encontrados antes de los encalados. Las enmiendas orgánicas, aunque no tienen tanta capacidad de neutralización de la acidez, poseen una alta capacidad tampón gracias a su elevado contenido de materia orgánica, favoreciendo el mantenimiento del pH del suelo de forma más prolongada.



**Figura 4.** Evolución del pH del suelo tratado con distintas dosis de caliza ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Tm ha}^{-1}$ ) en las distintas etapas del proyecto de fitorremediación.

Durante la fase de fitorremediación activa, las enmiendas orgánicas disminuyeron las formas disponibles de Zn, Cd, Fe y Mn en el suelo, debido a los cambios en el pH del suelo, el aporte de sales inorgánicas (principalmente fósforo) con el estiércol, y la transformación de la materia orgánica (Clemente et al., 2004). De los elementos contaminantes, el Zn fue el más afectado por el pH del suelo (Fig. 5), por lo que las enmiendas calizas resultaron determinantes para controlar su disponibilidad. Mientras que el Pb precipita fácilmente con gran cantidad de aniones inorgánicos, principalmente fosfato aportado con la fertilización, y con las enmiendas orgánicas, siendo entonces difícilmente asimilable por las plantas. En cambio, la materia orgánica del suelo condiciona la solubilidad y disponibilidad del Cu, por lo que su disponibilidad puede aumentar a pH neutro o ligeramente alcalino (Fig. 5). En estudios realizados en maceta se observó que el efecto de compost estaba asociado principalmente al aumento inicial de pH, pero dicho tratamiento fue incapaz de mantener unos valores de pH adecuados para el desarrollo vegetal. En cambio el estiércol fue capaz de mantener el pH en valores más elevados, debido a existencia de nuevas condiciones de oxido-reducción en el suelo. El estiércol aporta una materia orgánica lábil, fácilmente degradable por los microorganismos del suelo como fuente de energía, que hace que las condiciones redox del suelo sean menos oxidantes, ralentizando el proceso de oxidación de los sulfuros y, por tanto, de acidificación (Walker et al., 2004). Además, la alta riqueza en fósforo del estiércol, llevó a la formación de fosfatos muy insolubles con el Pb (Walker et al., 2004).





**Figura 5.** Relación existente entre la proporción de metal disponible y el pH del suelo. Las líneas describen la tendencia del Cu, y la ecuación matemática ajustada a la tendencia del Zn que se muestra en la parte superior de la gráfica.

Por el contrario, la presencia de compuestos orgánicos solubles, añadida mediante los residuos y aportada por las raíces de los cultivos, tuvo mayor influencia sobre la disponibilidad de Cu que el pH. Así, la concentración de Cu disponible disminuyó en un 20% (Clemente et al., 2006) del valor inicial en los suelos sin enmienda orgánica (control), mientras que los valores aumentaron con el uso de estiércol ( $4,5 \mu\text{g g}^{-1}$ ) y permanecieron prácticamente constantes en los suelos con compost ( $0,7 \mu\text{g g}^{-1}$ ), debido a que el estiércol es más rico que el compost en compuestos solubles, capaz de formar quelatos solubles con el Cu. En la fase de atenuación natural se produjeron los mayores descensos del Cu disponible en los tratamientos con materia orgánica (Clemente et al., 2006). La degradación de los compuestos orgánicos solubles del estiércol y su humificación en el suelo ayudaron a la retención del Cu en formas poco solubles, pero la materia orgánica humificada del compost fue más efectiva.

En la segunda fase de atenuación natural, además del Cu, las concentraciones disponibles de Zn, Mn, Cd y As disminuyeron en todos los tratamientos, gracias a la fijación sobre óxidos amorfos de Fe y Mn recientemente formados (Clemente et al., 2006; Kraus y Wiegand, 2006). Los resultados de este experimento rechazan la teoría de la "bomba química de relojería", que postula un aumento de la solubilidad de los metales pesados con el tiempo por la adición de materia orgánica, ya que más de dos años tras la adición de las enmiendas no se observó aumento en la solubilidad de metales, sino todo lo contrario. Cabe destacar que la disponibilidad de todos los metales disminuyó, pese a que el pH del suelo no aumentó en la etapa de atenuación natural.

Otro beneficio asociado a las enmiendas orgánicas se debe a la mejora de la actividad biológica del suelo. La biomasa microbiana se considera un indicador de fertilidad y salud de un suelo, y es extremadamente sensible a la presencia de contaminantes. Por tanto, la biomasa microbiana puede ser un índice válido para medir el grado de recuperación del suelo. Antes de comenzar con los trabajos de recuperación, el suelo de Aznalcóllar no mostraba valores apreciables de biomasa microbiana, lo que indicaba la muerte de los microorganismos. Sin embargo, dos años después de iniciada la fitorremediación activa y la etapa de atenuación natural, la biomasa microbiana se recuperó hasta alcanzar valores similares a los de suelos no contaminados. La recuperación fue más rápida con los tratamientos de enmiendas orgánicas. Las zonas del suelo que mantenían un pH ácidos, indicador de excesiva contaminación, mostraron la menor recuperación de la población microbiana, incluso con la adición de estiércol y compost.

### Fitoextracción con *Brassica juncea*

Se evaluó la posibilidad de fitoextracción de los contaminantes mediante el uso de una especie acumuladora comercial que combina un crecimiento rápido, y una elevada acumulación de biomasa y metales pesados. La especie *Brassica juncea* (L.) Czern., conocida como “mostaza india”, fue la planta seleccionada, pues había demostrado ser capaz de acumular Zn y, en especial, Pb en anteriores trabajos (Ebbs y Kochian, 1997; Epstein *et al.*, 1999), y se adapta bien al clima mediterráneo (del Río *et al.*, 2000).

#### *Crecimiento de las plantas: efecto de las enmiendas*

La acidificación del suelo por oxidación de sulfuros metálicos tras el vertido piritico condicionó el crecimiento de *B. juncea*, ya que sólo sobrevivió en parcelas cuyos suelos mostraban valores de pH > 4,5 (**Fig. 6**). Para la mayoría de las especies vegetales el pH óptimo del suelo es 6-7, en parte porque en este rango de valores la disponibilidad de nutrientes es máxima. En este intervalo de pH, la solubilidad de los metales pesados es baja, favoreciendo el crecimiento vegetal. La excepción es el As, un metaloide, cuya solubilidad es más baja a pH bajo (< 6). En suelos como los de Aznalcóllar, contaminados por metales y As, un pH alrededor de 6,0 puede ser idóneo. La adición de una enmienda caliza (como es la espuma azucarera), permitió aumentar los valores de pH hasta alcanzar un intervalo óptimo para el crecimiento de las plantas (Clemente *et al.*, 2004). Respecto a la aplicación de enmiendas orgánicas, el estiércol mejoró la producción de planta en la primera de las dos cosechas (2.869 kg ha<sup>-1</sup>), frente al compost (977 kg ha<sup>-1</sup>) y al control (1.354 kg ha<sup>-1</sup>). Sin embargo, en la segunda cosecha el tratamiento con compost fue más productivo (2.188 kg ha<sup>-1</sup>) que el control (1.631 kg ha<sup>-1</sup>), poniendo de manifiesto el papel de fertilizante de acción lenta y mejorador de las propiedades físicas del suelo del compost (Clemente *et al.*, 2005). El tratamiento con estiércol fue menos efectivo en el segundo cultivo de *B. juncea* (518 kg ha<sup>-1</sup>) debido al crecimiento de una gran cantidad de especies silvestres (casi 8.000 kg ha<sup>-1</sup>), que impidieron el desarrollo de la especie acumuladora (Clemente *et al.*, 2005). La presencia de semillas en el estiércol es uno de los problemas que su uso puede ocasionar a la hora de un correcto desarrollo del cultivo planeado. En cualquier caso, las enmiendas orgánicas mejoraron el crecimiento de las plantas en los dos cultivos realizados. En las parcelas con un pH aceptable para el crecimiento de las plantas (>4.5) el estiércol de vaca permitió la mayor producción de biomasa, probablemente como consecuencia del aporte de nutrientes (principalmente N y P), y de la reducción de las concentraciones de metales biodisponibles.

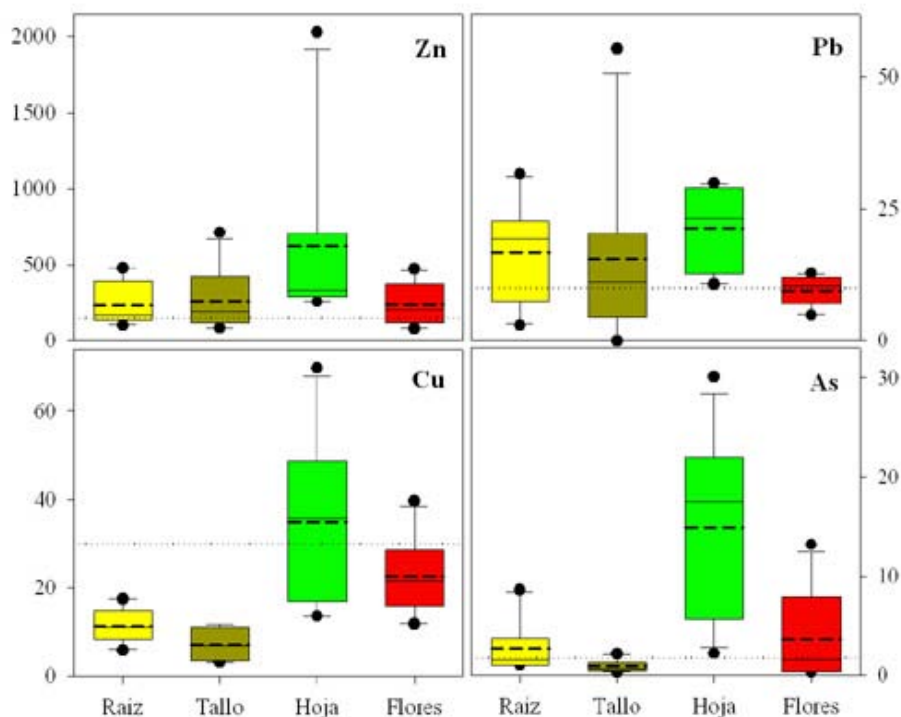


**Figura 6.** Crecimiento de *B. juncea* en parcela con pH>5 (izquierda) y en parcela con pH<4,5 (derecha).

#### Acumulación de metales en *Brassica juncea*

Las concentraciones más elevadas de Zn y Cu se obtuvieron en las plantas de las parcelas más ácidas, en las que los metales se encontraban más fácilmente disponibles, pero que, por otro lado, dieron lugar a un menor rendimiento de planta. En general, la acumulación fue más elevada en el primer cultivo que en el segundo, reflejando la mayor disponibilidad de metales en el suelo. A diferencia de lo observado con la producción de biomasa, no fue posible observar una influencia clara de las enmiendas sobre la acumulación de metales, ya que ésta quedó enmascarada por la heterogeneidad de los valores de pH en el suelo (Clemente *et al.*, 2005). La concentración de Zn en las distintas partes de *B. juncea* aumentó en el orden: raíces < tallos < hojas, comportamiento típico de especies acumuladoras de metales (**Fig. 7**). Las mayores concentraciones de Cu y As se dieron en las hojas. No se observó una tendencia concreta en la acumulación de Pb en *B. juncea*, y las

concentraciones de Zn y Pb en la mayoría de las partes de las plantas analizadas excedieron los niveles encontrados en plantas de *B. juncea* crecidas en un suelo no contaminado de una localidad del área del río Guadimar (37,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  Zn; 0,07  $\mu\text{g g}^{-1}$  Pb; del Río *et al.*, 2000).



**Figura 7.** Concentración de metales en *Brassica juncea* ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ). La caja indica los cuartiles superior e inferior, la línea continua corresponde a la media, la línea discontinua a la mediana, las líneas verticales a los percentiles 90-10, y los puntos indican los valores extremos.

Sin embargo, la acumulación de metales pesados en la parte aérea no fue muy alta, con concentraciones inferiores a los niveles descritos en trabajos realizados en suelos contaminados y en solución nutritiva donde sólo estaba presente un metal contaminante. La explicación se encuentra en el hecho de que en la solución de los suelos contaminados de Aznalcóllar se acumulan concentraciones elevadas de varios metales con propiedades químicas (peso atómico, carga eléctrica) muy parecidas (Cu, Fe, Mn, Zn, Cd). Éstos son absorbidos por las plantas a través del mismo mecanismo, resultando en una inhibición mutua en su asimilación. En cualquier caso, *B. juncea* se comportó como una acumuladora de metales (Zn y Pb) y, por tanto, puede ser empleada como un indicador de la disponibilidad de estos elementos para las plantas en el suelo, y de la efectividad de los tratamientos de recuperación de suelos contaminados por metales pesados.

#### Extracción de metales por *Brassica juncea*

Las enmiendas orgánicas tuvieron un efecto claro en la capacidad de extracción de *B. juncea*. La mayor extracción de metales se produjo con la aplicación de estiércol, en el primer cultivo, y con la aplicación de compost, en el segundo, coincidiendo con los mejores rendimientos. La acumulación restringida y la baja producción de biomasa, son la causa de la baja cantidad de metales extraída por las plantas. La cantidad de Zn, Cu, Pb y As que se pueden extraer mediante el uso de *B. juncea* se estimó tomando como base el tratamiento con estiércol, que fue el de mayor producción (Tabla 2). Teniendo en cuenta la cantidad de metal presente en los 20 cm superficiales del suelo, y los límites establecidos por la Unión Europea para suelos agrícolas (CEC, 1986), se calculó el exceso de metales que sería necesario extraer (Tabla 2). De acuerdo con esta estimación, el número de cultivos requeridos para disminuir las concentraciones existentes hasta quedar por debajo de los valores máximos de la UE, es excesivamente alto. Obviamente, la mostaza india no resulta apropiada para conseguir la remediación del suelo contaminado en Aznalcóllar a través de fitoextracción.

recuperación basado en la fitoestabilización o fitoinmovilización es más realista que la fitoextracción en estos suelos contaminados y susceptibles de acidificación. Por lo tanto, la fitoextracción con *B. juncea* no es una opción real en estos suelos contaminados, y no ha sido considerada como una alternativa viable en esta situación.

**Tabla 2.** Estimación de la capacidad de fitoextracción de *B. juncea* y el número de cultivos necesario para bajar la concentración de metales en el suelo hasta alcanzar los niveles admitidos por la UE en suelos agrícolas.

	Concentración media en el suelo (ppm)	Concentración máxima permitida por la UE (ppm)	Cantidad en exceso a extraer (kg/ha)*	Cantidad acumulada por cultivo (g/ha) <sup>1</sup>	Nº de cultivos necesarios
As	284	34	600	0,6	10 <sup>6</sup>
Cu	202	140	149	3,1	48.000
Pb	454	300	370	1,6	230.000
Zn	810	300	1224	80,5	15.000

\*Considerando 20 cm de la capa arable. <sup>1</sup>Considerando la mejor producción obtenida de 3.000 kg/ha con la adición de estiércol.

## Experimento de fitoinmovilización con *Lupinus*

La fitoinmovilización puede contribuir significativamente a la disminución de la solubilidad de metales y la re-vegetación de lugares contaminados (Vangronsveld *et al.*, 1995). El proceso se basa en la habilidad de las raíces y/o los microorganismos asociados para impedir el movimiento de los contaminantes en el suelo y su transferencia a la parte aérea de la planta. Los mecanismos involucrados incluyen la precipitación de los contaminantes en formas insolubles en el suelo y su acumulación en las vacuolas de las raíces.

### Interés de la planta de altramuz

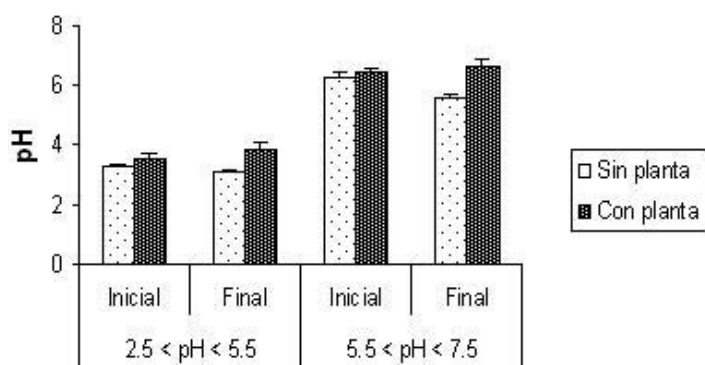
El altramuz blanco (*Lupinus albus* L.) es una leguminosa cultivada tradicionalmente en el Mediterráneo y a lo largo del valle del Nilo, donde se usa para consumo humano, abono verde y forraje. Una de las propiedades más destacables de esta especie es su alta resistencia a diferentes situaciones de estrés: a) resistencia a bajas temperaturas (por sus características fisiológicas tolera hasta -9°C, aunque el crecimiento óptimo sucede a temperaturas diurnas comprendidas entre 15 y 25°C), b) capacidad de desarrollarse en suelos con un rango de pH entre 4,5 y 7,5 y por tanto típicos de una especie acidófila (a valores de pH > 7,5, asociados a la presencia de caliza activa, muestra signos de clorosis de Fe; cuando el pH se sitúa por debajo de 4,5, lo que es habitual en zonas afectadas por residuos mineros (Vázquez *et al.*, 2006), se detecta toxicidad de Al, alcanzando un valor letal a pH 3,0), y c) resistencia a la sequía (siendo las etapas más críticas, el período de floración y de crecimiento de la vaina).

La adaptación fundamental y característica del altramuz es su capacidad de desarrollar raíces proteoideas, consistentes en un grupo de pequeñas raíces con alta densidad de pelos radiculares, capaces de demobilizar las reservas de nutrientes del suelo cuando estos no están disponibles para la planta, mediante la liberación al medio de ácido cítrico (Dinkelaker *et al.*, 1989). Este hecho, junto a la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico al tratarse de una especie leguminosa, se traduce en una capacidad adaptativa del altramuz para crecer en suelos degradados y pobres en nutrientes, típicos de zonas contaminadas. Además, el altramuz es una especie resistente a niveles elevados de elementos tóxicos en el suelo, con fuerte carácter excluyente, y gran capacidad para retenerlos en las raíces, evitando su transporte a la parte aérea donde se encuentran los tejidos fotosintéticos indispensables para la vida de la planta (Zornoza *et al.*, 2002). El altramuz puede presentar una elevada producción de biomasa (10-15 t/ha) sin necesidad de fertilizantes. Estas características, junto con el hecho de ser una especie autóctona del sur y suroeste de España, la hacen *a priori* recomendable para su uso en fitoinmovilización de suelos degradados, entre otras causas, por la contaminación minera.

Con objeto de probar la capacidad fitorrecuperadora del altramuz en condiciones reales, se realizó un experimento de campo (2000-2001) en una parcela experimental de la zona "El Vicario" (Vázquez *et al.* 2006, 2007). Primeramente, se realizó una labor al suelo, con el fin de limpiar, homogeneizar y descompactar el terreno y facilitar la siembra. La parcela experimental, de 1.000 m<sup>2</sup>, mostraba una gran heterogeneidad en sus condiciones físico-químicas, en parte como consecuencia de la presencia de restos de lodo. Por ello se decidió dividirla en 32 subparcelas de 25 m<sup>2</sup>. A continuación se sembró *Lupinus albus* cv. Marta, de manera uniforme en las subparcelas centrales, con una densidad de siembra aproximada de 20 g de semilla/m<sup>2</sup>. El objetivo del experimento era determinar si el altramuz podía reducir la disponibilidad de metales pesados en el suelo.

### Contaminantes en el suelo

En las subparcelas no cultivadas se observaron valores de pH finales significativamente menores que los iniciales (**Fig. 8**). Por el contrario, en las subparcelas cultivadas se observaron valores de pH iniciales y finales similares. La presencia del cultivo incrementó los valores de pH finales con respecto a los observados en subparcelas no cultivadas. La atenuación de la acidez del suelo próximo a la raíz se atribuye principalmente a la alta tasa de liberación de citrato al medio por las raíces de altramuz (Dinkelaker *et al.*, 1989), que actúa a modo de tampón en el suelo (Hinsinger *et al.*, 2003). Igualmente, las precipitaciones y diversos agentes externos influyen notablemente en la acidez del suelo, aumentando el ritmo de liberación de los contaminantes. En cambio, la presencia de una cubierta vegetal ejerce un efecto amortiguador de estos agentes externos sobre la degradación del suelo (Vázquez *et al.* 2006, 2007).



**Figura 8.** Valores de pH antes y después del ciclo de cultivo de las subparcelas con y sin cultivo de altramuz agrupadas según su rango de pH ( $2,5 < \text{pH} < 5,5$  y  $5,5 < \text{pH} < 7,5$ ). Tomado de Vázquez *et al.* (2006, 2007).

El cultivo de altramuz (de Enero a Abril) mostró una tendencia a reducir los niveles disponibles de contaminantes en suelo con respecto a los del momento de la siembra. En la mayoría de los casos, esta reducción sólo fue significativa en abril, época de máxima producción de biomasa. Es decir, al igual que con la acidez, las concentraciones de los contaminantes disminuyeron gracias a la presencia del cultivo, tanto por la propia absorción de las plantas como por su interacción con los componentes del suelo (Dakora y Phillips, 2002; Hinsinger *et al.*, 2003). Hay que destacar el descenso observado en la fracción soluble de As (disminuyó un 53% en el momento de la cosecha en verde), de Cd (un 89%) y de Zn (un 94%) (Vázquez *et al.*, 2006, 2007).

### Contaminantes en la planta

La biomasa correspondiente a la parte aérea (incluyendo vainas) experimentó un gran incremento desde enero hasta abril. En mayo las plantas se secaron, acabando su ciclo con la caída de los restos vegetales al suelo. Este patrón de crecimiento condicionó notablemente las concentraciones y las exportaciones a lo largo del ciclo de cultivo. De este modo, durante la etapa de máxima producción de biomasa se facilitó un descenso de las concentraciones en planta (efecto dilución), así como un máximo en las exportaciones alcanzadas por el altramuz. Estos hechos nos llevaron a proponer este momento (abril) como el óptimo para la cosecha con fines de remediación, ya que permite extraer la máxima cantidad de elemento contaminante, evitando su retorno al suelo (**Fig. 9**). Sin embargo, el carácter excluyente del altramuz respecto a los metales pesados (Cd, Cu, Pb y Zn) y al As tiene una gran repercusión en su aplicabilidad en fitorrecuperación de suelos contaminados. La baja tasa de transporte de los contaminantes a la parte aérea dió lugar a unos valores de exportación bajos (p.ej., 8, 1 y 708 g/ha año para As, Cd y Zn respectivamente), a pesar de la alta biomasa alcanzada en campo (11,0 g MS/planta; 50-70 cm de altura). No obstante, los incrementos observados en el contenido de As, Cd y Zn en parte aérea en el momento de la cosecha, frente al inicio (entre 20 y 40 veces más altos), y los valores hallados en raíz explicarían el descenso ya comentado de la fracción disponible de estos contaminantes. Por tanto, el altramuz contribuye a una fitoinmovilización de los contaminantes (Vázquez *et al.*, 2006, 2007).



**Figura 9.** *Máxima producción de biomasa de altramuz en la zona experimental "El Vicario" en la 3ª Toma de muestra (Abril-01), aproximadamente cinco meses después de la siembra. Se observan manchas rojas correspondientes a zonas de acumulación de lodo contaminante, dominando el color de los óxidos de Fe debidos al cambio de las condiciones ambientales. Tomado de Vázquez *et al.* (2006, 2007).*

## **Conclusiones: lecciones aprendidas del caso Aznalcóllar**

La contaminación de los suelos por el vertido de lodo pirítico procedente de la mina de Aznalcóllar ha supuesto un paso muy importante en la aplicación práctica de las tecnologías de fitorremediación a suelos contaminados por metales pesados. Los principales elementos responsables de la contaminación fueron As, Cd, Cu, Pb, y Zn, junto con la acidificación de los suelos causada por la oxidación de la pirita.

Los experimentos realizados han puesto de manifiesto la dificultad de aplicación de estas técnicas de fitorremediación en suelos recientemente contaminados por diversos metales y metaloides, con escasa estabilidad de los contaminantes, y con una tendencia a la acidificación que acentúa la solubilidad de los metales y la toxicidad del suelo. La presencia de diversos elementos contaminantes hace inadecuada la fitoextracción con una especie acumuladora de gran biomasa como la mostaza india, debido a que la competencia entre estos elementos a nivel radical, provoca una escasa acumulación de biomasa y baja transferencia de metales a las plantas. Sin embargo, dicha especie puede resultar útil para detectar cambios en la biodisponibilidad de Cu, Pb, y Zn en el suelo.

A la luz de los resultados, la técnica más viable en el caso de Aznalcóllar es la fitoinmovilización, de manera que los contaminantes permanezcan en el suelo en formas escasamente disponibles. El uso combinado de enmiendas calizas y orgánicas ha permitido adecuar las condiciones del suelo para el crecimiento vegetal, condición indispensable en fitorremediación, mediante la adecuación de los valores de acidez del suelo y de la fertilidad química y biológica del mismo. Dicho manejo, con la introducción de plantas, ha facilitado los procesos de fijación de metales.

Los ensayos de campo realizados indican que la presencia de plantas como el altramuz, que toleran cierta acidez del suelo, amortiguó el pH ácido de los suelos contaminados, y una reducción de la biodisponibilidad de As, Cd y Zn, lo cual indica la adecuación de esta planta en fitoinmovilización de suelos contaminados por metales pesados y As, en suelos acidificados y contaminados por lodos de piritas.

## **Agradecimientos**

La investigación descrita en este artículo ha sido financiada por el MEC (REN2001-1114-C02-01 y 02, CTM2004-06715-C02-01 y 02) y por la Junta de Andalucía. Las semillas de altramuz fueron cedidas por Ing. Gil Aragón (SIDT) y de la mostaza india por Dr. A. de Haro (IAS-CSIC). La Oficina del Corredor del Guadiamar (Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía) cedió el uso de la parcela experimental.

## **Referencias**

Bernal, M.P., Clemente, R., Walker, D.J. 2007. The role of organic amendments in the bioremediation of heavy metal-polluted soils. En *Environmental Research at the Leading Edge* (ed. Gore, R.W.), pp. en prensa, Nova Science Publishers, Inc., Nueva York. 551111

- CEC. 1986. Council of the European Communities directive of 12 of June on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. *Official J. Eur. Commun.* 1986, L 181, 6-12.
- Clemente, R., Almela, C., Bernal, M.P. 2006. A remediation strategy based on active phytoremediation followed by natural attenuation in a soil contaminated by pyrite waste. *Environ. Pollut.* 143: 397-406.
- Clemente, R., Walker, D.J., Bernal, M.P. 2004. *Uso de enmiendas orgánicas en la fitorrecuperación de suelos contaminados por metales pesados*. CEBAS-CSIC, Murcia, España.
- Clemente, R., Walker, D.J., Bernal, M.P. 2005. Uptake of heavy metals and As by Brassica juncea grown in a contaminated soil in Aznalcóllar ( ): The effect of soil amendments. *Environ. Pollut.* 138: 46-58.
- Dakora, F.D., Phillips, D.A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* 245: 35-47.
- del Río, M., Font, R., Fernández-Martínez, J.M., Domínguez, J., de Haro, A. 2000. Field trials of Brassica carinata and Brassica juncea in polluted soils of the Guadiamar river area. *Fresen. Environ. Bull.* 9: 328-332.
- Dinkelaker, B., Romheld, V., Marschner, H. 1989. Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (Lupinus albus L.). *Plant Cell Environ.* 12: 285-292.
- Ebbs, S.D., Kochian, L.V. 1997. Toxicity of zinc and copper to Brassica species: implications for phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 26:776-781.
- Epstein, A.L., Gussman, C.D., Blaylock, M.J., Yermiyahu, V., Huang, J.W., Kapulnik, Y., Orser, C.S. 1999. EDTA and Pb-EDTA accumulation in Brassica juncea grown in Pb-amended soil. *Plant Soil* 208: 87-94.
- Grimalt, J.O., Ferrer, M., Macpherson, E. 1999. The mine tailing accident in Aznalcóllar. *Sci. Total Environ.* 242: 3-11.
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., Jaillard, B. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant Soil* 248: 43-59.
- Kraus, U., Wiegand, J. 2006. Long-term effects of the Aznalcóllar mine spill – heavy metal content and mobility in soils and sediments of the Guadiamar river valley ( SW Spain ). *Sci. Total Environ.* 367: 855-871.
- López-Pamo, E., Baretino, D., Antón-Pacheco, C., Ortiz, G., Arránz, J.C., Gumiel, J.C., Martínez-Pledel, B., Aparicio, M., Montouto, O. 1999. The extent of the Aznalcóllar pyrite sludge spill and its effects on soils. *Sci. Total Environ.* 242: 57-88.
- Vangronsveld, J., Van Assche, F., Clijsters, H. 1995. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: *In situ* immobilization and revegetation. *Environ. Pollut.* 87: 51-59.
- Vázquez, S., Agha, R., Granado, A., Sarro, M.J., Esteban, E., Peñalosa, J.M., Carpena, R.O. 2006. Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. *Water Air Soil Poll.* 177: 349-365.
- Vázquez S., E. Esteban, J.M. Peñalosa y R.O. Carpena. 2007. El vertido de Aznalcóllar. En: *Procesos de degradación y recuperación de suelos* (eds. Lobo, C., Millán, R.) pp. 487-498. Editorial CIEMAT, Madrid.
- Walker, D.J., Clemente, R., Bernal, M.P. 2004. Contrasting effects of manure and compost on soil pH, heavy metal bioavailability and growth of Chenopodium album L. in a soil contaminated by pyritic mine waste. *Chemosphere* 57: 215-224.
- Wenzel, W.W., Adriano, D.C., Salt, D., Smith, R. 1999. Phytoremediation: A plant-microbe-based remediation system. En *Bioremediation of Contaminated Soils* (ed. Adriano, D.C., Bollang, J.M., Frankerberger, W.T., Smith, R.C.), Agronomy nº 37, pp. 457-508, ASA, CSSA, SSSA, Madison, EEUU.
- Zornoza, P., Vázquez, S., Esteban, E., Fernández-Pascual, M., Carpena, R.O. 2002. Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 1003-1009.