

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA  
DIVISIÓN DE CARRERAS AGRÓNOMICAS**



**EVALUACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE ARSÉNICO POR ALFALFA.**

**POR:**

**MARÍA DEL REFUGIO RUÍZ HERNÁNDEZ**

**TESIS**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES**

**TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO**

**SEPTIEMBRE 2011**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS**

**EVALUACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE ARSÉNICO POR ALFALFA.**

TESIS DE LA C. **MARÍA DEL REFUGIO RUÍZ HERNÁNDEZ** QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

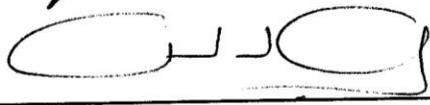
**INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES**

**APROBADA POR:**

**PRESIDENTE:**

  
M.C. MIGUEL ÁNGEL URBINA MARTÍNEZ

**VOCAL:**

  
M.C. CYNTHIA DINORAH RUEDAS ALBA

**VOCAL:**

  
ING. RUBÍ MUÑOZ SOTO

**VOCAL SUPLENTE:**

  
M.C. HUGO AGUILAR MÁRQUEZ

  
DR. FRANCISCO JAVIER SÁNCHEZ RAMOS

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS**



**Coordinación de la División de Carreras Agronómicas**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS**

**EVALUACIÓN DE LA ACUMULACIÓN DE ARSÉNICO POR ALFALFA.**

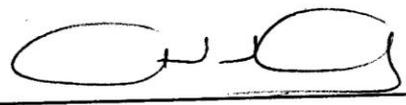
TESIS DE LA C: **MARÍA DEL REFUGIO RUÍZ HERNÁNDEZ** QUE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ PARTICULAR DE ASESORIA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**INGENIERO EN PROCESOS AMBIENTALES**

ASESOR PRINCIPAL:

  
M.C. Miguel Ángel Urbina Martínez

ASESOR:

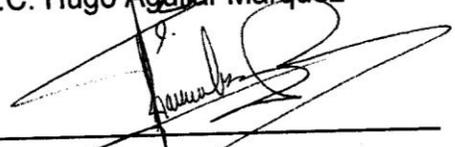
  
M.C. Cynthia Dinorah Ruedas Alba

ASESOR:

  
ING. Rubi Muñoz Soto

ASESOR:

  
M.C. Hugo Aguilar Márquez

  
D.R. FRANCISCO JAVIER SÁNCHEZ RAMOS

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS**



**Coordinación de la División de Carreras Agronómicas**

Torreón, Coahuila, México

SEPTIEMBRE 2011

## **AGRADECIMIENTOS.**

A DIOS:

Por darme la vida y la oportunidad de desarrollarme como profesionista, ayudándome a superar cada uno de los obstáculos que se presentaron en mi trayecto académico.

A mi “ALMA MATER” por ser el abrigo en la tempestad, por ser la cuna de mis sueños y por ser la segunda casa donde aprendí cosas nuevas gracias a los maestros para construirme como mejor persona.

A mis amigas Faviola Suarez González, Mónica Moreno Córdova y José Carlos Márquez que estuvieron a mi lado en cada momento que las necesite, por darme su apoyo y amistad.

Y a todos mis compañeros de generación por encontrar en cada uno de ellos, defectos y virtudes que me ayudan a ser mejor día a día.

## **DEDICATORIAS.**

### **A MIS PADRES:**

Romeo Ruíz Martínez y Elva Hernández caballero que han sido mi inspiración para lograr culminar este ciclo de mi vida profesional. Por todo su apoyo económico y moral, a sus consejos para seguir un camino recto y de superación.

### **A MIS HERMANOS:**

Maynor, David, Wilber, Luis Enrique, y Romeo  
Por toda la confianza que depositaron en mi, por el apoyo moral y economico, que gracias a Dios no fue en vano pues se supo aprovechar.  
A mis difuntos abuelos, que espiritualmente estan conmigo en momentos buenos y malos y que me da toda la fuerza para seguir adelante.

## **INDICE GENERAL**

<b>INDICE GENERAL .....</b>	<b>V</b>
<b>INDICE DE CUADROS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>X</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMARY.....</b>	<b>2</b>
1.1 INTRODUCCION .....	3
1.2 OBJETIVO .....	5
1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
1.3 HIPÓTESIS .....	5
<b>REVICION DE LITERATURA .....</b>	<b>6</b>
2.1 GENERALIDADES DEL ARSÉNICO .....	6
2.2 ARSÉNICO EN EL SUELO .....	8
2.2.1 CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO EN SUELOS .....	10
2.2.2 FORMAS DE ARSÉNICO PRESENTES EN SUELOS .....	11
2.2.3 FUENTES DE ARSÉNICO EN SUELOS .....	14
2.3 ARSÉNICO EN PLANTAS .....	15
2.3.1 FITOTOXICIDAD DEL ARSÉNICO .....	16
2.3.2 METABOLISMO DE ARSÉNICO EN PLANTAS .....	17
2.4 ALFALFA (MEDICAGO SPP) .....	18
2.4.1 GENERALIDADES .....	18

2.4.2 ABSORCIÓN DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS	
POR ALFALFA .....	19
<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>21</b>
3.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN .....	21
3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL .....	21
3.3 PREPARACIÓN DEL SUELO .....	21
3.3.1 DESCRIPCIÓN DEL SUELO CONTAMINADO .....	23
3.3.2 DESCRIPCIÓN DEL SUELO NO CONTAMINADO .....	23
3.4 ELABORACIÓN DE MACETAS .....	23
3.5 CULTIVO .....	24
3.5.1 FERTILIZACIÓN .....	24
3.5.2 SIEMBRA .....	25
3.5.3 RIEGOS .....	25
3.5.4 CUIDADO DEL CULTIVO .....	25
3.5.5 CORTES .....	26
3.6 VARIABLES MEDIDAS .....	26
3.6.1 ALTURA DE PLANTA (AP) .....	26
3.6.2 NUMERO DE BROTES (NB) .....	27
3.6.3 PESO VERDE (PV) .....	27
3.6.4 PESO SECO (PS) .....	27
3.6.5 PESO SECO DEL TALLO (PST) Y PESO SECO DE LA HOJA (PSH)	28
3.6.6 PESO HÚMEDO DE LA RAÍZ (PHR) Y PESO SECO DE LA RAÍZ(PSR)	28

3.6.7 DIÁMETRO DE RAÍZ (DR) .....	29
3.6.8 ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICO DEL SUELO .....	29
3.6.9 CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO EN TEJIDO VEGETAL .....	32
3.6.10 CUANTIFICACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN SUELO .....	37
3.6.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	37
<b>RESULTADOS Y DISCUCIONES .....</b>	<b>38</b>
4.1 ALTURA DE PLANTA Y NÚMERO DE BROTES .....	38
4.2 PESO SECO, PESO SECO DE HOJA Y PESO SECO DE TALLO .....	42
4.3 PESO SECO DE RAÍZ Y DIÁMETRO DE RAÍZ .....	46
4.4 ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICOS DEL SUELO .....	48
4.5 ARSÉNICO EN TEJIDO VEGETAL .....	51
4.6 ARSÉNICO EN SUELO – PLANTA .....	56
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>59</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>60</b>

## **INDICE DE TABLAS.**

TABLA	1. ESPECIES MINERALES DE ARSÉNICO PRESENTES EN SUELO	12
TABLA	2. VALORES DE PKA DE LAS PRINCIPALES ESPECIES DE ARSENICO.....	20
TABLA	3 CONCENTRACIONES REPORTADAS DE EPT EN ALFALFA .....	
TABLA	4 PREPARACIÓN DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS .....	22
TABLA	5. FECHAS DE CORTES PARA LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS ...	26
TABLA	6. PARÁMETROS Y TÉCNICAS AGRONÓMICAS EMPLEADOS .....	31
TABLA	7. NÚMERO DE PLANTAS EN UNIDADES EXPERIMENTALES .....	38
TABLA	8. MEDIAS ENTRE TRATAMIENTOS DE AP Y NB .....	41
TABLA	9. RENDIMIENTO DE ALFALFA COMO MATERIA SECA .....	43
TABLA	10. MEDIAS ENTRE TRATAMIENTOS PARA DR Y PSR .....	47
TABLA	11. RESULTADO DE ANÁLISIS FÍSICO – QUÍMICOS DEL SUELO ..	49
TABLA	12. MEDIAS DE ABSORCIÓN DE ARSÉNICO EN LOS DIFERENTES ÓRGANOS DE LA PLANTA .....	51
TABLA	13. MEDIAS DE TRATAMIENTOS DE ABSORCIÓN DE ARSÉNICO TEJIDO EN VEGETAL .....	55
TABLA	AL FINAL DEL EXPERIMENTO .....	57

## **INDICE DE FIGURAS.**

FIGURA	1. DINÁMICA DEL ARSÉNICO EN EL AMBIENTE .....	9
FIGURA	2. TRASFORMACIONES DEL ARSÉNICO EN EL SUELO .....	13
FIGURA	3. DIAGRAMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL .....	22
FIGURA	4. DESCRIPCIÓN DE LA ELABORACIÓN DE LAS MACETAS .....	24

## **INDICE DE GRAFICAS.**

Grafica 1. Altura de planta .....	39
Grafica 2. Numero de brotes .....	40
Grafica 3. Rendimiento de alfalfa .....	43
Grafica 4. Peso seco de hoja .....	44
Grafica 5. Peso seco de tallo .....	45
Grafica 6. Peso Seco de Raíz y Diámetro de Raíz .....	47
Grafica 7. Acumulación de arsénico en hojas .....	53
Grafica 8. Acumulación de arsénico en tallo .....	53
Grafica 9. Acumulación de arsénico en raíz .....	55

## **ABREVIATURAS.**

### **À**

Á: Amstroms (Unidad de Longitud) • 6

### **A**

AP: Altura de planta • 26

ASH: Arsénico en hoja • 51

ASR: Arsénico en Raiz • 51

AST: Arsénico en Tallo • 51

atm: Atmosferas (Unidad de presión) • 6

### **D**

DMA: Acido dimetilarsónico • 13 DR: Diámetro de raíz • 29

### **E**

EDTA • 31; Etildiaminotetracetico • 31 Eh: Potencial Eléctrico • 7

### **F**

FAL: Franco Arcilloso Limoso • 49

### **G**

GLM: General Linear Model • 42

## **H**

HG-AES: Hydrires generation atomic emisión spectrometric • 25

## **I**

ICP-OES: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer •  
22

## **M**

Meq: Miliequivalentes • 49

Mg: Magnesio • 31

MMA: Acido monometilarsónico • 13

## **N**

NB: Numero de brotes • 27

NIST: National Institute of Standars and Technology • 37

N03: Nitratos • 31

NPF: Numero de Plantas Finales • 47

## **P**

P205 • Fosforo' 31

pH: Escala de acides y alcalinidad • 7; Potencial de iones  
hidronio • 31 PHR: Peso húmedo de la raíz •

28

PS: Peso seco de la biomasa producida por maceta • 27 PSH: Peso seco  
de las hojas producidas por maceta • 28 PSR: Peso seco de la raíz • 28

PST: Peso seco de los tallos producidos por maceta · 28 PV: Peso verde de la biomasa producida · 27

## **S**

SC: Suelo Contaminado · 22

-SH: Grupo Tiol o Sulfidrilos · 16

SNC: Suelo No Contaminado · 21

## **T**

tex: Textura · 31

ton: Tonelada, Unidad de masa · 8

## **RESUMEN.**

Dos variedades de alfalfa fueron evaluadas, Sundor y Excelente-110 en este trabajo, con el objeto de saber la cantidad de arsénico que estas absorben y en que órgano lo almacenan, Se prepararon tratamientos de 0, 10, 20 y 40 mg\*kg<sup>-1</sup> de arsénico en suelo a partir de un suelo contaminado por deposiciones de la industria minera. La duración del experimento fue de un año, dividiéndose en tres etapas de cultivo, inicio, medio y final, basados en el desarrollo de las plantas. La absorción de arsénico fue más alta para ambas variedades al inicio; para la Sundor: 2.22/1.30 mg\*kg<sup>-1</sup> de materia seca en Hoja/tallo, 10.37/1.35 mg\*kg<sup>-1</sup>, 15.55/2.40 mg\*kg<sup>-1</sup>, 17.48/2.88 mg\*kg<sup>-1</sup>. Para tratamientos de 0, 10, 20 y 40 mg\*kg<sup>-1</sup> de As en suelo respectivamente, para la Excelente-110: 3.43/0.93 mg\*kg<sup>-1</sup> de materia seca en Hoja/tallo, 13.59/1.86 mg\*kg<sup>-1</sup>, 16.88/2.11 mg\*kg<sup>-1</sup>, 23.33/2.46 mg\*kg<sup>-1</sup>. Para tratamientos de 0, 10, 20 y 40 mg\*kg<sup>-1</sup> de As en suelo respectivamente. La producción de biomasa y desarrollo del cultivo a las concentraciones de arsénico trabajadas no se afectan, por lo que la alfalfa es tolerante a dichas concentraciones.

## **PALABRAS CLAVE:**

Metales pesados

Agua

Suelo

Contaminación

Plantas

## SUMMARY

Two varieties of alfalfa were evaluated, Sundor and Excelent-110 in this work, in order to know the amount of arsenic that is uptake and where it is store, treatments of 0, 10, 20 and 40 mg\*kg<sup>-1</sup> of arsenic in soil were prepared from a contaminated soil by depositions of mining waste. The duration of the experiment lasted a year divided into three stages of cultivation, beginning, middle and end, based on the development of plants. The absorption of arsenic was higher for both varieties at the beginning stage; for Sundor: 2.22/1.30 mg\*kg<sup>-1</sup> in the dry matter of leaf/stem, 10.37/1.35 mg\*kg<sup>-1</sup>, 15.55/2.40 mg\*kg<sup>-1</sup>, 17.48/2.88 mg\*kg<sup>-1</sup>. For treatments of 0, 10, 20 and 40 mg\*kg<sup>-1</sup> of Arsenic in soil respectively, for the Excellent-110: 3.43/0.93 mg\* kg<sup>-1</sup> in the dry matter of leaf/stem, 13.59/1.86 mg\*kg<sup>-1</sup>, 16.88/2.11 mg\*kg<sup>-1</sup>, 23.33/2.46 mg\*kg<sup>-1</sup>. For treatments of 0, 10, 20 and 40 mg kg<sup>-1</sup> of Arsenic in soil respectively. Biomass production and development of the crop were not affected by Arsenic concentrations, so Alfalfa is tolerant to these concentrations.

## **1.1 INTRODUCCION.**

(Trejo, 2005) La contaminación ambiental mundial por metales se hace cada vez más extensiva como consecuencia del aumento de la actividad industrial ocurrida entre finales del siglo 20 y comienzos del siglo 21. Estos contaminantes, derivados de un creciente número de factores antropogénicos (efluentes y desechos industriales y urbanos, tratamiento de las plantas con aguas residuales, agroquímicos y operaciones de la industria minera) han afectado progresivamente los diferentes ecosistemas. (Sepulveda & Trejo, 2002; Sepulveda et al., 2005; Trejo, 2005) En México existe actualmente una gran cantidad de sitios contaminados con diferentes tipos de compuestos, tanto orgánicos, como inorgánicos, debido principalmente a las actividades de la industria minera y petroquímica, además de la disposición clandestina y derrames de residuos peligrosos. (Sahagun, 2006) La Comarca Lagunera es una de las regiones Industriales, agrícolas y ganaderas más importantes de la Republica Mexicana y al mismo tiempo es una de las zonas agrícolas más contaminadas.

Estudios realizados con anterioridad (Salcedo et al., 1994) han demostrado una contaminación por arsénico en alimentos de consumo humano producidos en la comarca

lagunera, siendo el Chile uno de los más contaminados con una concentración de arsénico de 2.23 µg/g en base húmeda y de acuerdo a los resultados obtenidos, concluyen que esto podría contribuir al aumento de la ingesta de arsénico por los humanos, generando así un problema de salud pública. En este tipo de estudios se muestra la facilidad con la cual los metales pesados y metaloides contaminantes del ambiente pueden entrar a las cadenas tróficas. Otro estudio realizado (Rosas et al., 1999) muestra la contaminación por arsénico en el suelo, agua, forraje (*Medicago sativa*) y leche de la comarca lagunera, encontrando concentraciones de este metaloide en agua de 7 – 740 µg/L y en suelo un promedio de 30 µg/g.

La remediación de suelos agrícolas contaminados es indispensable para el desarrollo e implementación de una agricultura orgánica, como garantía de la inocuidad alimenticia, debido a que el empleo del compost (Soto & Muñoz, 2002); también tiene sus desventajas, tales como el incremento en el contenido de sales y fitotoxicidades, especialmente cuando se emplean residuos con trazas de metales pesados o materiales no terminados. En este trabajo se trata de establecer una evidencia científica de que la contaminación por arsénico se puede darse en la Alfalfa.

## **1.2 OBJETIVO.**

Evaluar la coabsorción de arsénico total en las variedades de Sundor y Excelente 110 de *Medicago sativa* (Alfalfa), para gestionar su funcionabilidad como planta biorremediadora de suelo contaminado con arsénico.

### **1.2.1 Objetivos específicos.**

- Cuantificar el arsénico total en tejido vegetal (raíz, tallo y hoja).
- Evaluar la coabsorción del arsénico total en los diferentes estadios del cultivo (desarrollo, medio y final).
- Evaluar el rendimiento de la alfalfa en función de la concentración de arsénico total en suelo y de las variedades de Alfalfa.

## **1.3 HIPOTESIS.**

La coabsorción de arsénico con nutrientes minerales estará en función de la concentración de arsénico total en suelo y el tiempo de cultivo.

## REVICION DE LITERATURA

### 2.1 Generalidades del Arsénico.

(Martí et al., 2002) El arsénico pertenece al grupo 15 del sistema periódico, tiene más características de no metal que de metal; de aquí que forme más fácilmente aniones que cationes. Se han descrito cuatro formas alotrópicas del arsénico: metálica, gris, parda y amarilla. Su estructura electrónica es  $[\text{Ar}] 3d^{10}, 3s^2, 4p^3$  y en sus compuestos funciona con los grados de oxidación (-III), (III) y (V). (Cotton & Wilkinson, 1990) Tiene un radio covalente (para el estado trivalente) de 1.21 Å. Con un punto de fusión de 814°C a 36 atm. Este muestra considerables variaciones en sus características químicas, los compuestos iónicos es difícil que se presenten, debido a la gran cantidad de energía que se necesita para adoptar la estructura electrónica del siguiente gas noble. Asimismo, es difícil obtener la pérdida de electrones de valencia debido a las altas entalpías de ionización (no existen los iones + 5). Las características más importantes de las valencias están implicadas en el número de enlaces covalentes formados. (ATSDR, 2005; Evangelou, 1998; Valverde, 1999). El arsénico tiene una fuerte afinidad por

el oxígeno y forma varias especies en el ambiente, dependiendo del Eh, pH y del medio en donde este.

La importancia del estudio de las formas y dinámica del arsénico, se torna importante debido a que este puede ocasionar problemas de salud en mamíferos. (Morales et al., 2000; Yu et al., 2000) Se ha asociado la exposición crónica al arsénico en agua de bebida al desarrollo de cáncer de piel (Individuos que beben 2 L de agua por día, con una concentración de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  tienen una probabilidad de 2 en 1000) y otros tipos de cánceres internos (vejiga, pulmón e hígado) en el hombre. (Sheppard, 1992) En el reino vegetal no se ha encontrado una diferencia significativa en la respuesta de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas al arsénico en suelo, se sabe que el arsénico resulta cinco veces más tóxico en suelos arenosos y abonados que en suelos arcillosos. (Carbonell-Barrachina et al., 1997) Concentraciones de  $10 \text{ mg As}\cdot\text{L}^{-1}$  resultan tóxicas para plantas de frijol y plantas de tomate reducen su producción de biomasa. (Prieto-García et al., 2005) En otro estudio se encontraron concentraciones relevantes en: cilantro ( $2.67 \text{ mg As}\cdot\text{kg}^{-1}$  en hoja), epazote ( $12.39 \text{ mg As}\cdot\text{kg}^{-1}$  en hoja,  $7.93 \text{ mg As}\cdot\text{kg}^{-1}$  en tallo y  $10.16 \text{ mg As}\cdot\text{kg}^{-1}$  en raíz), mejorana ( $7.07 \text{ mg As}\cdot\text{kg}^{-1}$  en hoja,  $5.63 \text{ mg As}\cdot\text{kg}^{-1}$  en tallo,  $6.35 \text{ mg}$

As\*kg<sup>-1</sup> en raíz), chile (6.26 mg As\*kg<sup>-1</sup> en fruto, 8.02 mg As\*kg<sup>-1</sup> en hoja, 4.49 mg As\*kg<sup>-1</sup> en tallo), naranjo (8.44 mg As\*kg<sup>-1</sup> en fruto), plátano (2.54 mg As\*kg<sup>-1</sup> en fruto, 5.42 mg As\*kg<sup>-1</sup> en hoja) y toronjil (20.13 mg As\*kg<sup>-1</sup> en hoja y 7.87 mg As\*kg<sup>-1</sup> en tallo). Con estudios como este, queda evidenciada la contaminación de la cadena alimenticia, pues como puede apreciarse existen frutos de la canasta básica y otros utilizados en infusiones como plantas medicinales como el toronjil.

Como es de apreciarse en lo anterior, la exposición al arsénico puede ocurrir por varias vías, es importante conocer la forma química y la dinámica en los diferentes medios para poder evaluar los impactos del arsénico a los factores bióticos y abióticos de los diferentes ecosistemas.

## **2.2 Arsénico en el Suelo.**

(Sigel et al., 2005) Es difícil estimar los valores típicos de la abundancia de arsénico en la naturaleza, porque este tiene una gran variabilidad, la cantidad de arsénico en la corteza terrestre esta en el orden de 10<sup>13</sup> ton, en la hidrosfera (océanos, ríos, mantos freáticos e ices) está en el orden de 10<sup>9</sup> ton y en la atmosfera de 10<sup>3</sup>

ton. Para entender las rutas naturales y antropogénicas de exposición al arsénico es necesario apoyarnos en la Figura 1.

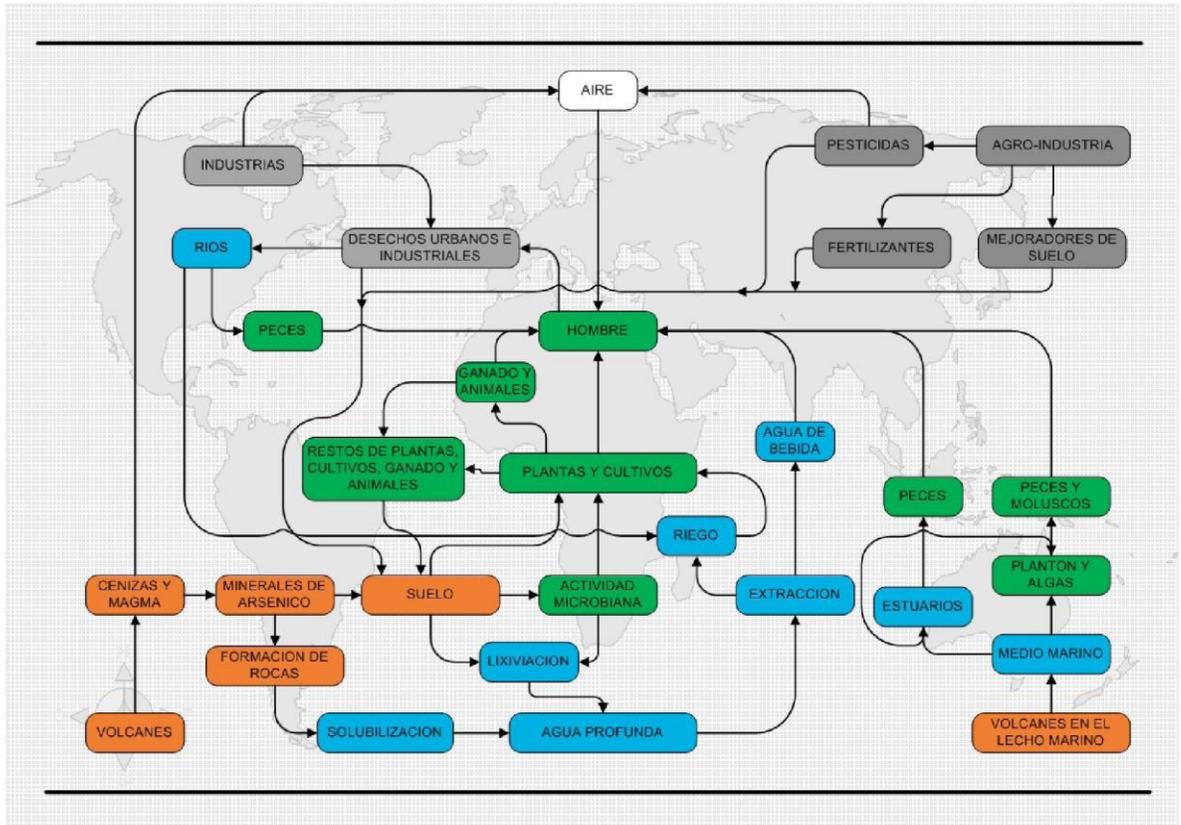


Figura 1. Dinámica del arsénico en el ambiente

(Matschullat, 2000) El orden de liberación de arsénico por año en la corteza terrestre es de  $1.715 \times 10^7$  kg, por exhalaciones y erupciones volcánicas y otros  $4.87 \times 10^6$  kg por actividad volcánica en el lecho marino, en los ríos de

$5.4 \times 10^7$  kg. Mientras que en agua profunda es difícil estimar las concentraciones de arsénico mundiales debido a la gran variabilidad de estas, pero se estima un rango de concentración de  $0.01 - 800 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ . La producción anual de arsénico en 1993 fue de  $3.0453 \times 10^7$  kg derivada de la explotación de cobre. En la atmósfera el arsénico tienen un orden de  $3.34 \text{ ton} \cdot \text{Año}^{-1}$ , donde el sesenta por ciento deriva de las emisiones de la explotación de cobre y la quema de carbón, otras formas de contribuir con esto es la aplicación de herbicidas, explotación de plomo y zinc, producción de vidrio y la conservación de madera; el tiempo que dura el arsénico suspendido está entre 7 a 10 días en forma de partículas de  $1 \mu\text{m}$ .

### **2.2.1 Concentración de arsénico en suelos.**

(Yaron et al., 1996) Un suelo no contaminado en general no excede de los  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de arsénico total en formas insolubles con el aluminio, fierro y calcio. En casos muy particulares se tiene hasta un seis por ciento de fracción soluble del arsénico total.

(Valverde, 1999) El contenido natural de arsénico en suelos se estima que esta comprendido entre  $5 - 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , en función del suelo, aunque la actividad humana puede

hacer aumentar estos niveles. Se ha calculado que la concentración media de arsénico en los suelos, a nivel global, es de  $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . (SEMARNAT, 2004) La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales de México, establecen en su proyecto de norma (PROY-NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004) un nivel permisible de  $22 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de arsénico en suelo para uso agrícola y de  $260 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  para suelo de uso industrial en México. (Valverde, 1999) La concentración arsénico en México se encuentra entre  $2 - 40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , en (Rosas et al., 1999) La Comarca Lagunera se han encontrado concentraciones de  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ .

### **2.2.2 Formas de arsénico presentes en suelos.**

La mina más importante de arsénico es la arsenopirita, la Tabla 1 enlista los minerales más importantes que contienen arsénico. (Sadiq, 1997; Sepulveda et al., 2005) A valores altos de potencial redox, el arsénico se encuentra en estado de oxidación As (V), pudiéndose encontrar, según el pH, bajo las formas:  $\text{H}_3\text{AsO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{AsO}_4^{-1}$ ,  $\text{HAsO}_4^{-2}$  y  $\text{AsO}_4^{-3}$ . En condiciones reductoras, el arsénico se encuentra en estado de oxidación As (III) y en función del pH, se puede encontrar como  $\text{HAsO}_2$  o como  $\text{AsO}_2^{-1}$ , aunque dependiendo de la concentración de  $\text{S}^{-2}$ , también se puede encontrar como  $\text{AsS}_2^{-1}$

o  $\text{As}_2\text{S}_3$ . (Bhattacharya et al., 2007; Parker & Rae, 1998) Estos compuestos pueden estar sujetos a reacciones de oxidación – reducción, metilación, adsorción, disolución, precipitación y volatilización. Algunas de las reacciones implicadas están catalizadas por bacterias y hongos. La Tabla 2 muestra los pKa de los compuestos de arsénico presentes en suelos y sedimentos.

**Tabla 1. Especies minerales de arsénico presentes en suelo**

<b>Tipo de Compuesto</b>	<b>Nombre</b>	<b>Forma molecular</b>	
<b>Sulfuros</b>	Mispíquel o arsenopirita	$\text{FeAsS}$	
	Regalar	$\text{As}_4\text{S}_4$	
	Oropimente	$\text{As}_2\text{S}_3$	
	Enargina	$\text{Cu}_3\text{AsS}_4$	
	Cobaltina	$\text{CoAsS}$	
	Proustita	$\text{Ag}_3\text{AsS}_3$	
<b>Óxidos</b>	Arsenolita	$\text{As}_2\text{O}_3$	
<b>Arseniuros</b>	Esmaltina	$(\text{Co}, \text{Ni})\text{As}_3$	
	Niquelina		$\text{NiAs}$
<b>Arseniatos</b>	Eritrina	$\text{Co}_3(\text{AsO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	
	Escorodita		$\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
	Mimetita		$\text{Pb}_5\text{Cl}(\text{AsO}_4)_3$
	Olivenita		$\text{Cu}_2\text{OHAsO}_4$

Tabla basada en G. J. Valverde 1999

Tabla 2. Valores de pKa de las principales especies de arsénico

Nombre	Formula	pKa	Grado de oxidación
Acido arsenioso	$\text{HAsO}_2$	9.3	+3
Acido arsénico	$\text{H}_3\text{AsO}_4$	2.3	+5
		11.6	
Acido monometilarsónico (MMA)	$\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$	3.6	+5
Acido dimetilarsónico o ácido cacodílico (DMA)	$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$	8.2	
		1.6*	+5
		6.2	
*corresponde al equilibrio $(\text{CH}_3)_2\text{As}(\text{OH})_2^+ \leftrightarrow (\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH}) + \text{H}^+$			
Basado en G. J. Valverde 1999			

La Figura 2 ilustra el conjunto de transformaciones que pueden sufrir las formas químicas del arsénico en los suelos.

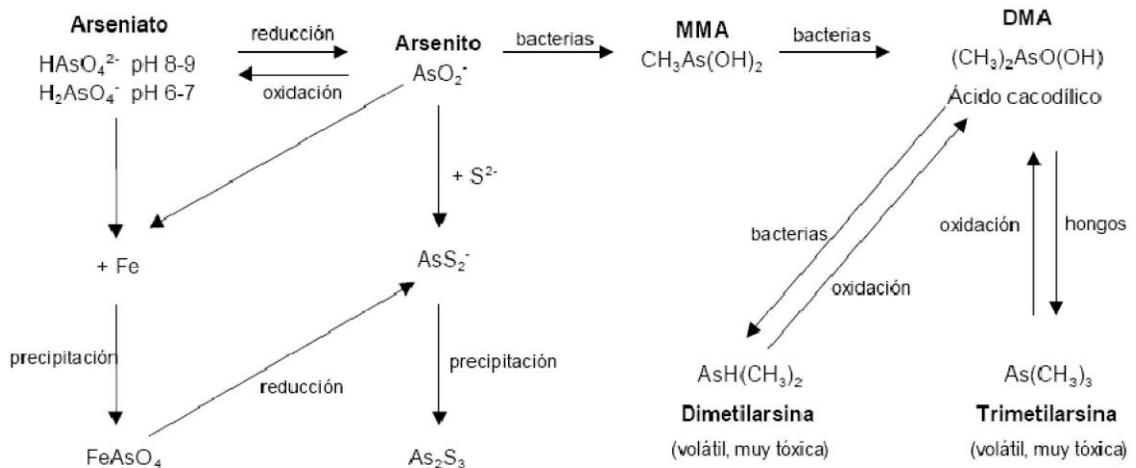


Figura 2. Transformaciones del arsénico en el suelo

### **2.2.3 Fuentes de arsénico en suelos.**

(Valverde, 1999) Desde finales del siglo XIX, se han utilizado varias sales inorgánicas como pesticidas y herbicidas. Entre estas destacan los arseniatos de Pb, Ca, Mg y Zn, los arsenitos de Zn, de Na o de Cu (verde de Scheele) o el acetoarsenito de cobre (verde de Paris). También se han utilizado como pesticidas y herbicidas compuestos orgánicos de arsénico, como el DMA y sus sales sódicas.

(Frankenberger, 2002) Otra fuente de contaminación de As, es la explotación de minas de Pb, Au, Zn y Cu, donde es liberado durante el proceso de fundición. El arsénico también se encuentra presente en el carbón, principalmente como arsenopirita; en los procesos de combustión del carbón, el arsénico puede ser volatilizado, pudiéndose depositar finalmente en el suelo.

(Lillo, 2005; Roychowdhury et al., 2005) La sobreexplotación de los mantos acuíferos, puede ser considerada como una fuente de contaminación del suelo por As, cuando el agua extraída se emplea para riego. La región lagunera tiene un área de 32,000 Km<sup>2</sup> con rangos de concentración de As en agua de 8 – 620 µg\*L<sup>-1</sup>, con condiciones oxidantes ligadas a climas áridos y con pH

entre 6.3 – 8.9; donde la especie predominante de este es la forma As (V) la cual es menos soluble y tiende a acumularse en el suelo pero el cual queda expuesto a la actividad microbiológica con la incorporación de material orgánico al suelo, donde estudios realizados han demostrado que el arsénico puede ser reducido a As (III) por microorganismos con la producción de especies metiladas (Huang & Matzner, 2006); haciendo de este una forma más biodisponible para las plantas.

### **2.3 Arsénico en Plantas.**

(Roychowdhury et al., 2005) La relación entre el arsénico en suelo y las plantas dependen de la forma y la disponibilidad del arsénico. La toxicidad del arsénico varia con la forma química y la valencia, en grado de toxicidad seria:  $AsH_3 > As (III) > As (V) > Formas\ orgánicas\ de\ arsénico$ . En general, la disponibilidad del arsénico a las plantas es más alta en suelos arenosos, suelos con poco material coloidal y baja capacidad de intercambio iónico y es más baja en suelos arcillosos, ricos en material orgánico, fierro, calcio y fosforo.

### **2.3.1 Fitotoxicidad del Arsénico.**

(Geng et al., 2005)El arsénico en sus formas de arseniato y arsenito son altamente toxicas para las plantas. La toxicidad del arseniato en las plantas es mediada por la disrupción de la fosforilación y la inhibición de la absorción del fosforo y la toxicidad del arsenito se basa por su alta afinidad con los grupos tioles (-SH) de las enzimas y proteínas tisulares.

En estudios realizados para discutir la forma en que el arsénico es absorbido por las plantas se ha encontrado que este es absorbido por la misma vía que el fosforo ((Adriano, 2001)vía pentosa fosfato) debido a su gran similitud química con este. Donde el arseniato es convertido en el interior de la planta a arsenito para que este sea metilado en las hojas (Zhu et al., 2006). (Prasad, 2004)Para expresar la toxicidad del arsénico no existe una concentración umbral, debido a que las plantas difieren en capacidad de acumulación antes de presentar síntomas de toxicidad pero esta se manifiesta en las plantas con manchas de color rojo marrón necróticas en las hojas viejas y raíces de color amarillo tostado y la reducción del crecimiento.

La forma en que el arsénico emigra desde el coloide del suelo a la rizosfera esta mediado por competencia a sitios de reacción en este y la transferencia de masas. (Smith et al., 2002) la proporción de arsénico absorbido de la solución por el coloide del suelo depende del número de sitios disponibles para la absorción. La presencia de iones de fosfato, ha sido reportada como supresor de la adsorción de arsénico, igual con otros iones como el cloruro, nitrato y sulfato, tienen un efecto significativo en la adsorción del As (V).

(Smith et al., 2002) La competición por los sitios de reacción del coloide del suelo cambia totalmente cuanto el arsénico es mayor que el fosforo, indicando que el efecto de acción de masas puede mandar la dirección de la adsorción de los aniones independientemente de la naturaleza de los ligandos.

### **2.3.2 Metabolismo de arsénico en plantas.**

El mecanismo de detoxificación y tolerancia para arsénico aun no está bien descrito en las plantas, (Dhankher, 2005) se ha observado que las plantas inicialmente reducen el As (V) a As (III) con la subsecuente formación de complejos péptidos con grupos

tioles reactivos, como la  $\gamma$  - glutamilcisteina, glutatión y fitoquelatinas, para posteriormente ser atrapados en el interior de la vacuolas. (Raab et al., 2005)

Las fitoquelatinas son pequeños péptidos de estructura general constituidos de cisteina, glutamina y glicina con pares de 2 a 11. (Quaghebeur & Rengel, 2005)

La síntesis de las fitoquelatinas involucra la transpeptidación de los dipeptidos del  $\gamma$  - glutamilcisteina del glutatión para expresar la fitoquelatin sintasa. La síntesis de fitoquelatinas es inducida por un rango de cationes como la plata, cadmio, cobre, mercurio, plomo y arsénico, para capturarlos y convertirlos en una forma menos toxica que sus formas libre.

#### **2.4 Alfalfa (*Medicago spp*) 2.4.1**

##### **Generalidades.**

(Santos, 2004) La alfalfa es una planta herbácea de la familia de las leguminosas de porte erecto, originaria de Asia Menor y del Sur del Cáucaso. Posee un sistema pedicular pivote que puede llegar hasta 9 metros de profundidad. Los tallos parten nuevos brotes. La inflorescencia consiste en un racimo que contiene entre cinco y treinta flores de color azul, violáceo o más

raramente blanco. Sus frutos presentan una apariencia retorcida, con entre una y cinco vueltas en espiral y contiene varias semillas de forma arriñonada. La tasa de fecundación cruzada esta en torno entre el 80 y 90 %; la polinización se efectúa de manera más eficiente por medio de insectos.

#### **2.4.2 Absorción de elementos potencialmente tóxicos por alfalfa.**

Estudios realizados han demostrado que la alfalfa es capaz de absorber elementos potencialmente tóxicos (EPT) como (Cajuste et al., 2001; G. & Cajuste, 1992; Rosas et al., 1999; Torresdey et al., 2004)plomo, cadmio, níquel, cobre, zinc, oro y arsénico, (Peralta et al., 2000)también se ha medido la capacidad de germinación de la semilla de alfalfa en presencia de metales pesados (todo aquel que tiene una densidad mayor a 5 g/mL) donde se observo que esta capacidad se vio disminuida, en aproximadamente en un 50 %, y el promedio de los valores de las concentraciones absorbidas de EPT se muestran en la tabla 5.

Tabla 3 Concentraciones reportadas de EPT en Alfalfa

Elemento	Concentración mg/Kg
Plomo	43000
Cadmio	7100
Arsénico	3.16
Zinc	4900

Para la acumulación de (Torresdey et al., 2004) plomo, cadmio y zinc se dio en la raíz de la planta y en el caso del (Rosas et al., 1999) arsénico se reportó que solo un 40% del arsénico absorbido se acumulaba en la raíz.

Con los antecedentes antes descritos hacen a la planta de alfalfa una candidata viable para su estudio de la acumulación de arsénico en sus diferentes órganos.

## **MATERIALES Y METODOS.**

### **3.1 Lugar de la investigación**

Área experimental de la Facultad de Agricultura y Zootecnia de la Universidad Juárez del Estado de Durango, Kilómetro 35 carretera a Tlahualilo, Venecia Durango, México.

### **3.2 Diseño experimental.**

Se realizaron dos bloques donde tratamientos de: testigo, 10, 20 y 40 mg/kg de arsénico total, fueron dispuestos perpendicularmente a las variedades de Alfalfa: Sundor y Excelente 110. Como se muestra en la Figura 3.

### **3.3 Preparación del suelo.**

El suelo fue preparado a partir de un suelo libre de arsénico con la adición necesaria de un suelo contaminado con arsénico para obtener las concentraciones descritas en el apartado 3.1. Ambos suelos fueron previamente homogenizados y analizados para cuantificar la concentración de arsénico total, siendo esta para el suelo no contaminado (SNC) un valor no detectable y para el suelo

contaminado (SC) de 538 mg/Kg de arsénico total, ambas cuantificadas por plasma óptico (ICP-OES).

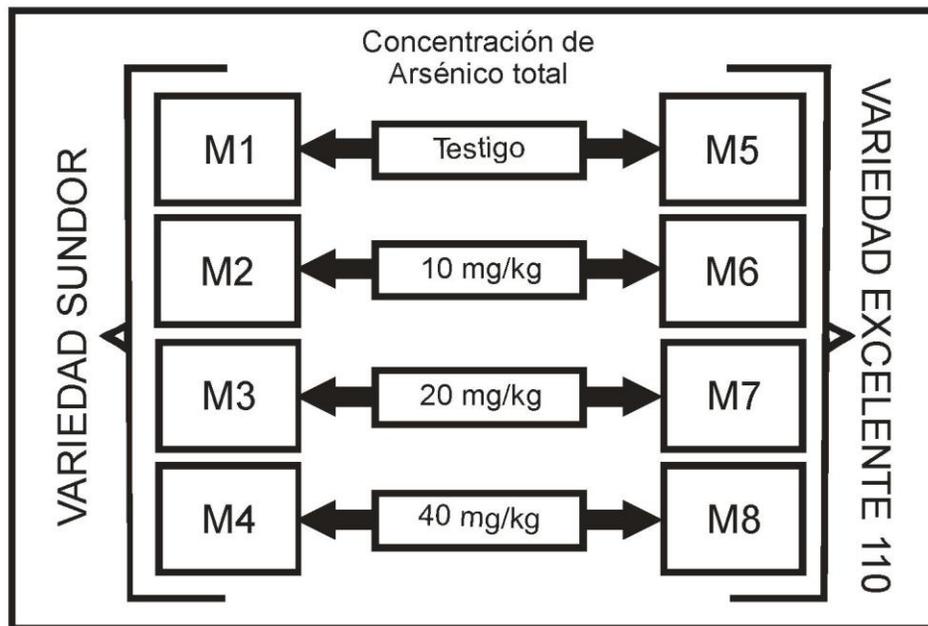


Figura 3. Diagrama del diseño experimental

Para la preparación de los diferentes tratamientos se emplearon las cantidades de SC y SNC descritas en la Tabla 4.

Tabla 4 Preparación de los diferentes tratamientos

Tratamiento	Concentración de Arsénico	SC	SNC
T1	0 mg/kg	---	100 kg
T2	10 mg/kg	2 kg	98 kg
T3	20 mg/kg	4 kg	96 kg
T4	40 mg/kg	8 kg	92 kg

Los tratamientos fueron mezclados por rotación a 30 rpm en un periodo de tiempo de 30 minutos con adiciones equivalentes de SC y SNC.

### **3.3.1 Descripción del suelo contaminado.**

Se empleo un suelo contaminado de manera antropogenica con deposiciones propias de una refinería metalúrgica, donde las especies químicas predominantes contenidas en este eran la arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ) y arseniatos de plomo ( $\text{PbAsO}_3$ ). Este suelo fue tomado hasta una profundidad de 20 cm, en un área de aproximadamente de 4 metros cuadrados.

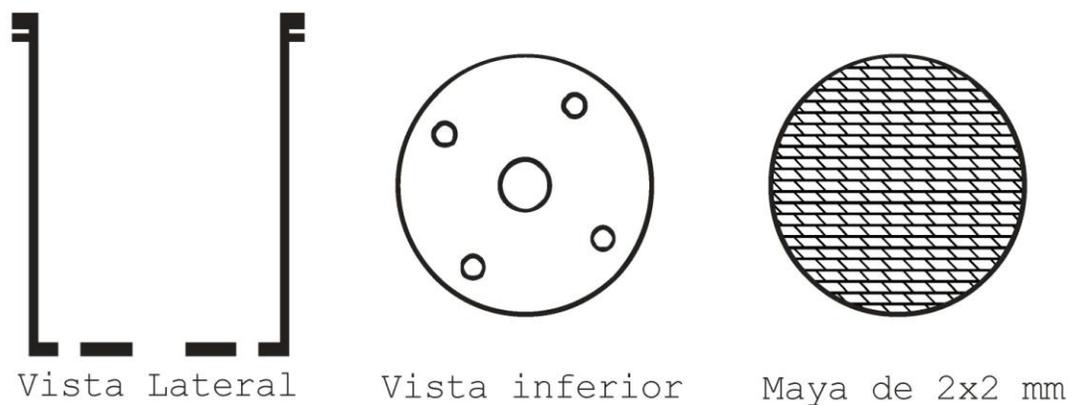
### **3.3.2 Descripción del suelo no contaminado.**

Se tomo suelo a 15 cm de profundidad en un área de aproximadamente 8 metros cuadrados, esta área se encontraba cerca de un suelo arable, donde se encontraban plantados nogales.

### **3.4 Elaboración de macetas.**

Fueron realizadas a partir de contenedores cilíndricos con dimensiones de 45 cm de alto y 30 cm de diámetro, con una perforación concéntrica de 5 cm de diámetro y cuatro circundantes con diámetro de 2.5 cm ver la Figura 4. Para

evitar la pérdida de suelo a través de las perforaciones antes descritas se empleo una maya plástica de 2x2 mm. A estas macetas se le colocaron 22 kg de suelo preparado como se describió en el apartado 3.2 para hacer un total de 8 macetas las cuales fueron dispuestas como se muestra en el diagrama esquemático del apartado 3.1.



**Figura 4. Descripción de la elaboración de las macetas**

### **3.5 Cultivo**

#### **3.5.1 Fertilización**

Se fertilizo con aproximadamente 1.5 g de MAP (11 – 52 – 00) y 0.15 g de urea por maceta, para completar la mitad de las concentraciones recomendadas de (INIFAP et al., 2000) 30 – 100 – 00 (Nitrógeno – Fosforo – Potasio en  $\text{kg}\cdot\text{h}^{-1}$ ), antes de la siembra. Posteriormente se aplicó la cantidad restante al tercer corte.

### **3.5.2 Siembra.**

Se sembraron las variedades Sundor y Excelente 110, el día 31 de Marzo 2007 por la técnica del voleo. Cuando las plantas alcanzaron una altura superior a 10 cm se extrajeron cuantas plantas fueran requeridas para obtener un total de 25 plantas por maceta.

### **3.5.3 Riegos.**

Para los riegos se empleo un sistema de goteo por gravedad, todos los riegos fueron efectuados con agua purificada a través de osmosis inversa, se analizo su contenido de arsénico total, la cual presento un valor no detectable para la técnica de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AES). Se rego en periodos de 2 – 3 días con un volumen de 40 – 50 litros.

### **3.5.4 Cuidado del cultivo.**

Durante el periodo del cultivo se presentaron las plagas características de la alfalfa, las cuales fueron controladas mediante aplicaciones foliares y periféricas al cultivo de extractos de chile y ajo ambos al 10 %. Para el

control de arvenses se procedió con la extracción manual de todas ellas que se presentaran en las macetas.

### 3.5.5 Cortes.

Los cortes se realizaron cuando las plantas alcanzaron un 20 % de floración, a una altura entre los 3 y 5 cm con tijeras de manera manual. Se realizaron en total, los cortes descritos en la Tabla 5, en donde puede apreciarse los cortes realizados además de la fecha y la estación del año.

Tabla 5. Fechas de Cortes para los diferentes tratamientos

ESTACIÓN	ESTADIO	FECHAS
VERANO	INICIO	12-JUN-09
		05-JUL-09
		31-JUL-09
OTOÑO	MEDIO	29-AGO-09
		26-SEP-09
		19-NOV-09
INVIERNO	FINAL	12-ENE-10
PRIMAVERA		25-FEB-10
		31-MAR-10
		02-MAY-10

### 3.6 Variables medidas.

#### 3.6.1 Altura de planta (AP)

Esta fue medida con un fluxómetro, se eligieron tres plantas representativas por maceta. La medición se llevo a

cabo antes de cada corte y fue determinada a ras de suelo a la parte más alta de la planta, considerándose plantas representativas para calcular un promedio de altura por maceta.

### **3.6.2 Numero de brotes (NB)**

Estos fueron determinados después de cada corte, se considero como brote a toda planta que tuviera una altura superior o igual a 10 cm. Se contaron unitariamente los brotes independientemente de los macollos presentados en la maceta.

### **3.6.3 Peso verde (PV)**

Determinado mediante una balanza granataria, con un rango de trabajo de 0.001 – 5 kg. Se determino inmediatamente después de cada corte, para prever la pérdida de masa por deshidratación de las plantas. Se peso la masa total, de la biomasa producida por maceta.

### **3.6.4 Peso seco (PS)**

Para la determinación del peso seco las plantas fueron deshidratadas a temperatura ambiente dentro de bolsas de papel canela. Una vez secas la masa total producida por

maceta fue pesada en una balanza analítica con resolución de 0.0001 – 250 g.

### **3.6.5 Peso seco del tallo (PST) y peso seco de la hoja (PSH)**

Se separaron todas las hojas del tallo, considerándose como inicio de la hoja al peciolo. Una vez que las plantas fueron secadas como se indico en el apartado 3.5.4, fue separado el tallo de las hojas, fueron pesados individualmente en una balanza analítica con resolución de 0.0001 – 250 g.

### **3.6.6 Peso húmedo de la raíz (PHR) y Peso seco de la raíz (PSR)**

El peso húmedo de la raíz fue determinado mediante la extracción de esta, una vez desarmada la maceta, en una balanza granataria con un rango de trabajo de 1 – 5000 g, La raíz fue lavada mediante enjuagues sucesivos en agua corriente hasta quitar todos los grumos de tierra retenida en la raíz, todo esto con la ayuda de una brocha de media pulgada común, finalmente para asegurar una buena limpieza de la raíz, se enjuago en agua destilada.

Una vez seca la raíz, esta fue pesada en una balanza analítica con un rango de trabajo de 0.0001 – 250 g, para determinar el peso seco. Posteriormente estas fueron molidas a una malla de 2 mm y almacenadas en bolsas plásticas hasta su análisis.

### **3.6.7 Diámetro de raíz (DR)**

Fue medido a un centímetro de la corona de la planta, mismo lugar en donde fue cortada la raíz, el diámetro fue medido con un fluxómetro, se tomaron plantas representativas para calcular un promedio del diámetro por maceta.

### **3.6.8 Análisis físico – químico del suelo**

Este fue hecho a partir de muestras representativas de cada tratamiento, el proceso de preparación de muestras de suelo se explica en los siguientes apartados. En total se obtuvieron 16 muestras 8 previas al experimento y 8 después del experimento.

#### **3.6.8.1 Preparación de la muestra de suelo previa al experimento.**

Como se discutió en el apartado 3.2, se realizaron un total de 8 tratamientos los cuales a su vez se hicieron en dos partes debido a la capacidad de la revoladora, por lo que se tuvieron un total de 8 muestras para analizar. Todas estas fueron tomadas después de haber preparado el tratamiento, se cribaron a través de una malla de 2 mm. Posteriormente fueron almacenadas en bolsas plásticas hasta su análisis.

#### **3.6.8.2 Preparación de la muestra de suelo posterior al experimento.**

Estas fueron obtenidas de las macetas una vez que el periodo del cultivo fue finalizado, la forma de recolectar fue mediante el desarmado de la maceta, se extendió todo el suelo contenido para su secado al ambiente, una vez seco se deshicieron los pendones, todo sobre una cubierta platica, la cual también fue empleada para mezclar el suelo contenido en esta, una vez homogenizado el suelo este se extendió formando un paralelogramo, posteriormente fueron tomados un kilogramo por cada esquina de este y un último de la parte central para generar una muestra representativa

de cada maceta, esta se hizo pasar a través de una malla de 2 mm, por último este fue almacenado en bolsas plásticas hasta su análisis. Se generaron un total de 8 muestras, como puede apreciarse en el diagrama del campo experimental en el apartado 3.1.

### 3.6.8.3 Parámetros agronómicos determinados en las muestras de suelo

Todos los ensayos descritos a continuación fueron realizados en el laboratorio de suelos de la Facultad de Agricultura y Zootecnia de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Como control de calidad se emplearon duplicados a una cantidad del 30 % de las muestras analizadas por sesión, los ensayos realizados se enlistan en la Tabla 6, en esta puede apreciarse también el método o técnica empleada.

Tabla 6. Parámetros y técnicas agronómicas empleados

Parámetro	Método y/o Técnica
1 Textura (Tex)	Boyucos*
2 pH (pH)	Potenciométrico*
3 Conductividad eléctrica (CE)	Conductimétrico*
4 Materia Orgánica (MO)	Walkley - Black*
5 Calcio (Ca)	Titulación con EDTA*
6 Magnesio (Mg)	Titulación con EDTA*
7 Nitratos (NO <sub>3</sub> )	Transnitración del Ac. Salisilico**
8 Fosforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	Olsen Modificado*

Referencias \*(Rodríguez & Rodríguez, 2002) \*\* (Steubing et al., 2001)

### **3.6.9 Cuantificación de arsénico en tejido vegetal**

Para la cuantificación de arsénico total se empleo una metodología basada en la digestión de Dennis H. Cox publicada en 1980, en la cual el propio autor describe: (Cox, 1980) “Esta metodología es sensible y exacta para la determinación de nano-gramos de arsénico total. Esta consiste en una digestión húmeda con acido nítrico, sulfúrico y perclórico, para asegurar la descomposición de componentes orgánicos de arsénico”. El proceso de digestión de muestras fue realizado en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Juárez del estado de Durango, campus Gómez Palacio.

#### **3.6.9.1 Tratamiento de la muestra**

Una vez cortada la planta, esta fue lavada con agua corriente y posteriormente con agua destilada, después estas fueron almacenadas dentro de bolsas de papel canela y fueron secadas al ambiente. Cuando las plantas estuvieron secas se separo la hoja del tallo y raíz todas las muestras fueron molidas y se hicieron pasar por una malla de un milímetro.

### 3.6.9.2 Reactivos e Instrumentos

Para la digestión del tejido vegetal se empleo ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) y sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrados grado “Metal Traza” de la marca Fisher®. Para el acondicionamiento del producto de la digestión se empleó ácido clorhídrico “Metal Traza” marca Fisher®, Sales de Ioduro de potasio (KI), Hidróxido de sodio (NaOH) ambas Fisher® certificado y Borohidruro de Sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) de Sigma-Aldrich® grado reactivo. Para la cuantificación del arsénico se empleo un Espectro de Absorción Atómica Perkin Elmer® modelo AAnalyst 800, equipado con un FIAS 100 de la misma marca. Como control de calidad se validó un estándar secundario el cual fue realizado con tejido de hoja y tallo de las variedades de alfalfa estudiadas y valorado por decuplicado al mismo tiempo que el estándar de referencia certificado por “Institute for Reference Materials and Measurements, european commission” BCR – 279 de *Ulva Lactuca* (sea lettuce), por su similitud en composición. Donde el estándar secundario fue analizado por tetraplicado con cada lote de muestras digeridas (siete por lote), analizándose las muestras por duplicado.

### **3.6.9.3 Preparación de soluciones**

#### **3.6.9.3.1 Solución de Acido clorhídrico al 10 % p/v**

Para 1 L de solución, se colocaron 274 mL de ácido clorhídrico concentrado en un matraz de aforación de 1 L y se aforo con agua tipo I.

#### **3.6.9.3.2 Solución de Ioduro de potasio al 20 % p/v**

Para 100 mL de solución, se pesaron 20 g de ioduro de potasio los cuales fueron disueltos en agua tipo I y aforados a 100 mL.

#### **3.6.9.3.3 Solución de Hidróxido de sodio al 10 % p/v**

Para 100 mL de solución, se colocaron 10 g de hidróxido de sodio, los cuales fueron disueltos en agua tipo I y aforados a 100 mL.

#### **3.6.9.3.4 Solución de Borohidruro de sodio al 0.2 % p/v en**

##### **hidróxido de Sodio al 0.05% p/v**

Para 500 mL de la solución, se agregaron a un matraz de aforación de 500 mL 2.5 mL de Hidróxido de sodio al 10 % p/v. posteriormente se agregó agua hasta tres cuartas partes del matraz y se depositan 1.0 gr de borohidruro de sodio, estos fueron disueltos y finalmente se aforo con agua tipo I.

#### **3.6.9.4 Método**

Se pesaron  $0.100 \text{ g} \pm 0.005$  de muestra de tejido vegetal, en un vaso de precipitado de 50 mL, seguidamente se agregaron 5 mL de Acido nítrico concentrado, 1 mL de acido perclórico concentrado, una vez realizado esto, se calentó en placa a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  tapadas con vidrio de reloj, dentro de una campana de flujo laminar hasta que las muestras se tornaron incoloras. Posteriormente se llevaron a casi sequedad, para ser bajadas de la placa y dejando enfriar a temperatura ambiente se añadieron 2.5 mL de acido nítrico concentrado y se calentaron nuevamente a  $100^\circ\text{C}$ , tapadas con vidrio de reloj y dentro de la campana de flujo laminar hasta casi sequedad. Finalmente se agregaron 2 mL de acido sulfúrico concentrado a temperatura ambiente para ser calentado a  $240^\circ\text{C}$ , hasta que la solución se volvió incolora. Una vez incolora se llevo a casi sequedad y se enfrió a temperatura ambiente. Se lavaron los vidrio de reloj, recuperando la solución dentro del vaso de precipitado con aproximadamente 5 mL de acido clorhídrico al 10 % p/v. Por último se lavaron las paredes del vaso y se agrego la solución a un matraz de aforacion de 10 mL.

Para el acondicionamiento del producto de digestión para la cuantificación de arsénico total, fue necesario

tomar 2 mL de este, se les agrego 5 mL de acido clorhídrico al 10% p/v mas 1 mL de ioduro de potasio al 20 % dentro de un matraz de aforacion de 10 mL, aforando con acido clorhídrico al 10% p/v. Se protegieron de la luz y se almacenaron a 4°C hasta su análisis por espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros. Finalmente para la cuantificación de arsénico en las diluciones preparadas fue necesario preparar la solución de borohidruro (ver apartado 3.5.9.3.4) como acarreador y acido clorhídrico al 10% p/v como agente reductor en para el generador de hidruros.

#### 3.6.9.5 Cálculos

Para poder expresar los resultados obtenidos en  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de tejido vegetal fue necesario aplicar la siguiente ecuación:

$$\text{Concentracion de Arsenico en Alfalfa} = \frac{C1 * Va}{P}$$

Donde: **C1**= Concentración de la muestra dada por el Instrumento en  $\mu\text{g/L}$

**Va**= Volumen de aforacion final expresado en Litros

$P$ = Peso de la muestra analizada expresado en gramos

### **3.6.10 Cuantificación de Arsénico total en suelo**

La cuantificación de arsénico fue llevada a cabo en el Laboratorio Central del Grupo Metalúrgico Peñoles, por ICP-OES empleando como material de referencia los NIST 2710 y 2711. A través de digestión acida en placa caliente.

### **3.6.11 Análisis estadístico**

Las variables evaluadas fueron analizadas a través de un ANOVA factorial y comparación de medias por el método de TUKEY, en el programa SAS System for Windows 9.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES 4.1

### Altura de planta y Número de brotes

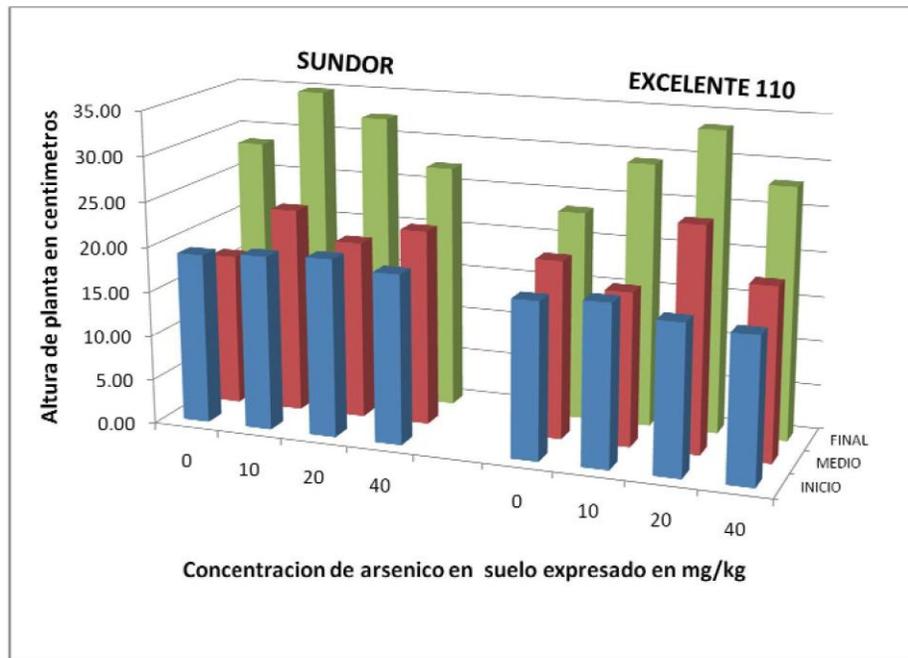
Las variables de AP y NB están directamente relacionadas con la cantidad de plantas o macollos encontrados en las unidades experimentales; a continuación en la Tabla 7 se presentan las plantas obtenidas al Inicio y al final del experimento.

Tabla 7. Número de plantas en unidades experimentales

Variedad	[As] En mg/Kg	Numero Plantas-Inicio	Numero Plantas-Final
Sundor	0	25	14
Sundor	10	25	22
Sundor	20	25	14
Sundor	40	25	16
Excelente 110	0	25	17
Excelente 110	10	25	18
Excelente 110	20	25	4
Excelente 110	40	25	16

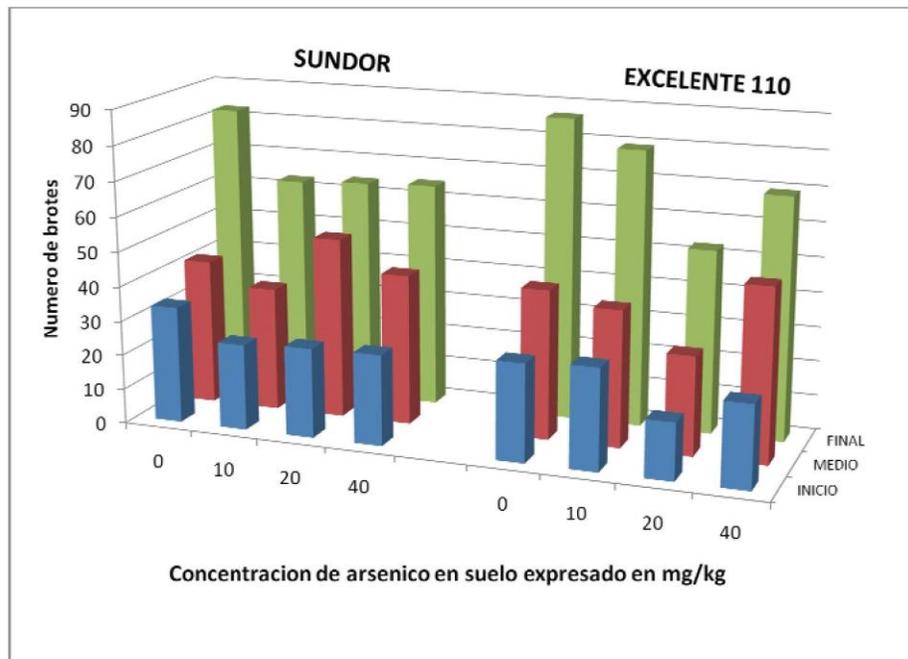
En la tabla 4 puede apreciarse el grado de afectación en la población de plantas de las unidades experimentales, para el caso de la variedad sundor la población se vio afectada en un 30 por ciento, y en la Excelente 110 en un 49 por ciento, este grado de afectación está directamente relacionada a las variables fenológicas como AP y NB y en menor grado a las variables de PS, PSH y PST.

A continuación se presentan las graficas de altura de planta (Grafica 1) Y numero de brotes (Grafica 2), en estas puede apreciarse la asociación antes dicha.



Grafica 1. Altura de planta

Al observar la grafica puede apreciarse la relación indirecta entre numero de brotes y altura de plantas, si bien no existió diferencia significativa entre variedades a las variables de AP y NB, si se encontró una ligera diferencia significativa entre tratamientos y estadios, el resultado de comparación de medias para tratamientos se presenta en la Tabla 8.



Grafica 2. Numero de brotes

En esta puede apreciarse las medias que son estadísticamente diferentes (medias precedidas con distinta letra), estadísticamente iguales (medias precedidas con la misma letra) y las que son ligeramente diferentes (medias precedidas con ambas letras).

Puede asumirse que las diferencias presentadas en la variable de NB están directamente relacionadas con el número de plantas en las unidades experimentales y las alturas de plantas con la cantidad de brotes desarrollados.

Tabla 8. Medias entre tratamientos de AP y NB

Tratamiento		Medias AP	Medias NB
0 mg*kg <sup>-1</sup> de As	B	21.405 cm	A 55.900 u
10 mg*kg <sup>-1</sup> de As	AB	24.505 cm	AB 47.750 u
20 mg*kg <sup>-1</sup> de As	A	25.390 cm	B 41.700 u
40 mg*kg <sup>-1</sup> de As	AB	22.465 cm	AB 48.250 u

Al realizar una correlación entre NB y AP se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.59689 con una significancia < 0.0001, esto nos explica la diferencia entre alturas en los distintos tratamientos, Al correlacionar las variables Tratamientos con NB, no se encontró una correlación significativa, esto nos dice que las diferencias encontradas se debieron principalmente a efectos de competencia y plasticidad de las plantas en los diferentes tratamiento, pues no puede asumirse que la concentración de arsénico en suelo explica estas diferencias.

(Kabata-Pendias & Pendias, 2001; Stoeva et al., 2005) Mencionan que la fitotoxicidad del arsénico solo es manifestada a muy altas concentraciones como en lugares donde se encuentran residuos de minería. En el caso de la planta de frijol esta no presenta estrés a una concentración de 5 mg\*Kg<sup>-1</sup>, pero si lo presento a una concentración de 10 mg\*Kg<sup>-1</sup>. (Carbonell-Barrachina et al., 1997)Concentraciones de 10 mg\*Kg<sup>-1</sup>, hacen que la planta de tomate reduzca su producción de biomasa. En el siguiente

apartado se discutirá las variables que indican la producción de biomasa.

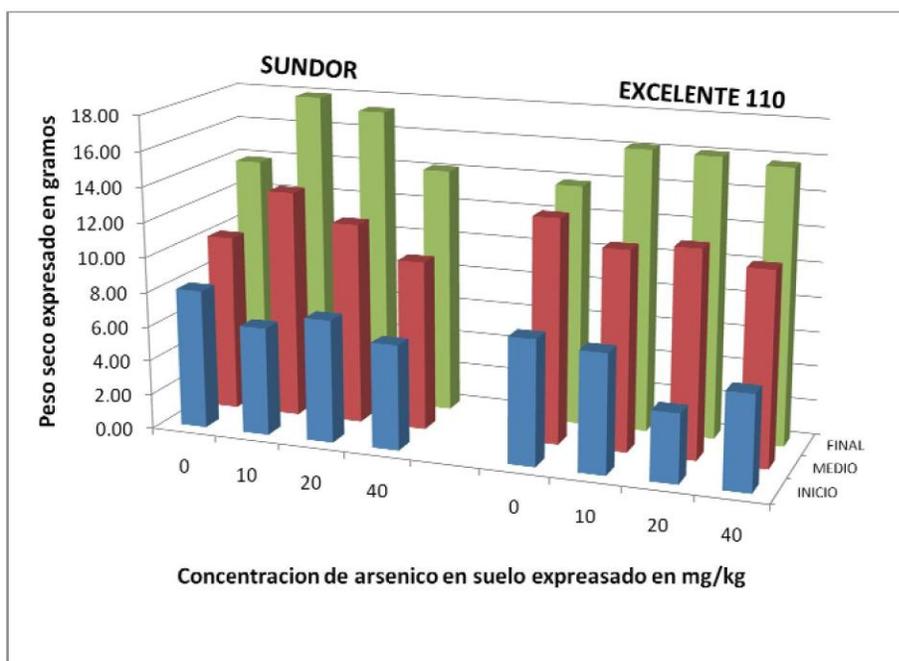
#### **4.2 Peso seco, peso seco de hoja y peso seco de tallo**

Para el análisis de resultados se consideró, al peso seco como la cantidad de biomasa producida. El contenido promedio de agua en la alfalfa se calculo en un 75 por ciento. Y una densidad de siembra de 350 plantas por metro cuadrado. En la Tabla 9 pueden observarse las medias de los valores obtenidos para las diferentes variedades y tratamientos en sus diferentes estadios y el equivalente del valor acumulado en toneladas de materia seca por hectárea por año, para expresar el rendimiento, la representación grafica de dicha tabla se encuentra en la Grafica 3, donde solo se omite el valor acumulado.

El GLM (GLM, de sus siglas en ingles "General Linear Model") a un nivel de significancia de 0.05 por ciento, no expresa diferencia significativa al rendimiento obtenido entre variedades y tratamiento, pero si expreso una diferencia entre los diferentes estadios. Conjuntamente se realizo el análisis de comparación de medias por el método de "Tukey" para corroborar los datos obtenidos por el GLM, obteniendo concordancia entre ambos resultados.

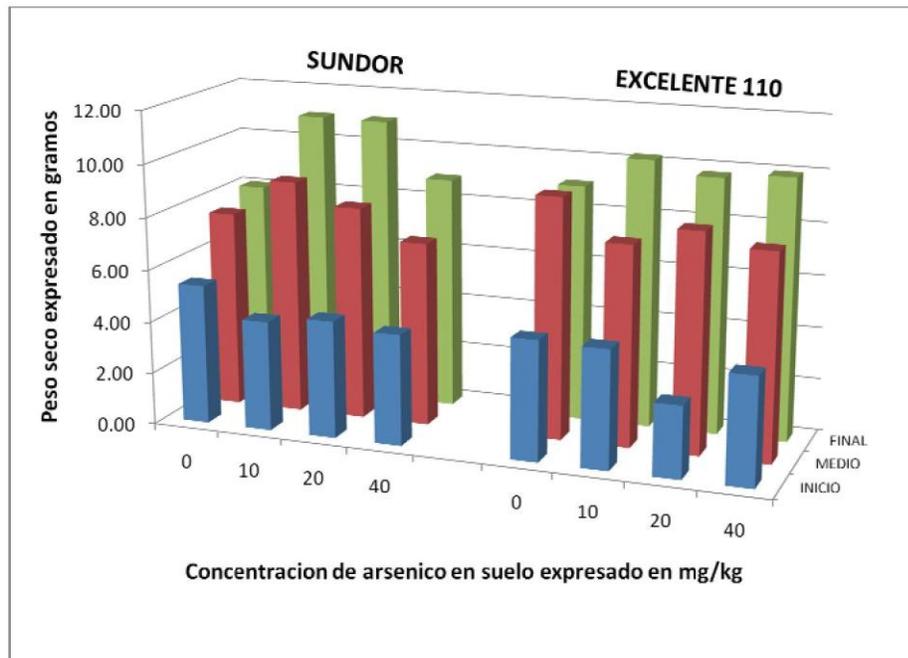
Tabla 9. Rendimiento de alfalfa como materia seca

Variedad	[As] mg/kg	Inicio	Medio	Final	Acumulado	Ton/ha/año
Sundor	0	8.03	10.19	13.89	110.21	15.6
Sundor	10	6.24	13.13	17.94	129.88	18.4
Sundor	20	7.07	11.59	17.31	125.26	17.7
Sundor	40	6.03	9.76	14.16	104.01	14.7
Excelente 110	0	7.19	12.89	13.86	115.71	16.4
Excelente 110	10	6.79	11.46	16.19	119.51	16.9
Excelente 110	20	3.93	11.86	16.06	111.61	15.8
Excelente 110	40	5.43	11.06	15.74	112.41	15.9



Grafica 3. Rendimiento de alfalfa

Para el análisis del PSH (Grafica 4) y PST (Grafica 5) se calculo que el peso proporcionado al peso seco, por la hoja es de un 66 por ciento y el del tallo de un 34 por ciento.

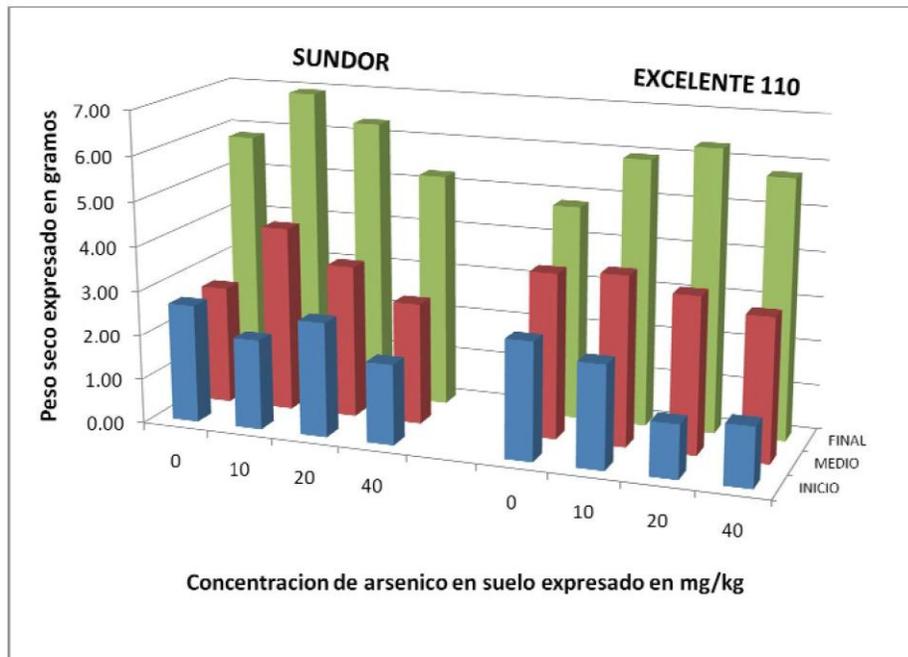


Grafica 4. Peso seco de hoja

Los análisis GLM y Tukey expresaron igualdad a los expresados para PS, esto es debido a que el PSH y PST derivan del PS.

(Khattak et al., 1989; Urbano & Davila, 2003) Obtuvieron resultados similares de rendimiento reportando un promedio de  $17 \text{ ton} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{año}$ , en once variedades de alfalfa cultivadas a 0.30 m de distancia de surco a chorro corrido. Si bien se observa diferencia en los diferentes estadios del cultivo, el rendimiento al final de año tiende a compensar esas diferencias, se observa que la variedad sundor tiene ligeramente mayor producción de biomasa sobre la excelente

110,(Cultivars & Schedules, 2006) Concluyen que el rendimiento de alfalfa puede variar entre variedades, pero estas diferencias se compensan al termino del año, siendo los rendimientos similares.



Grafica 5. Peso seco de tallo

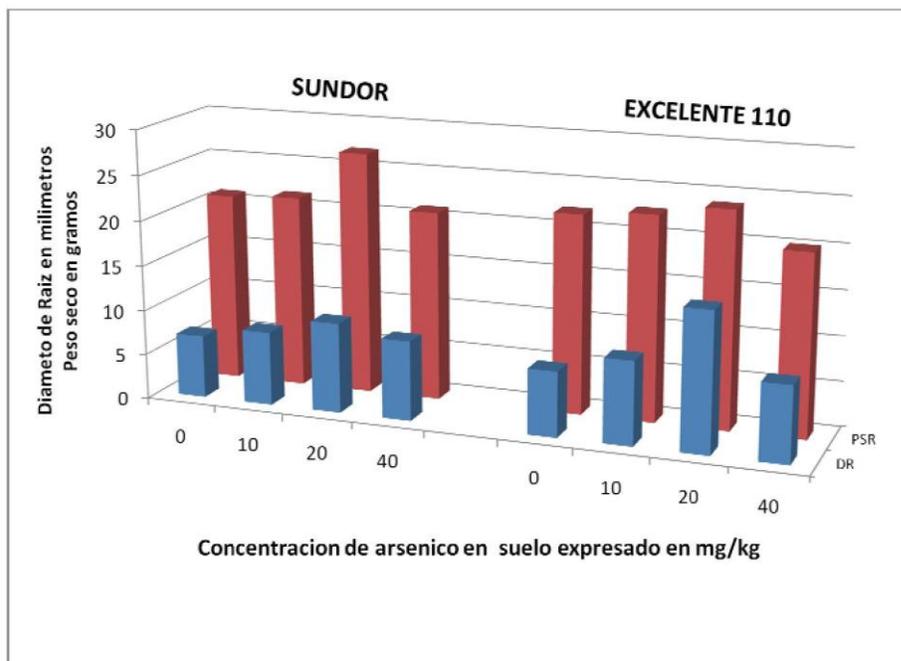
(Santamaría et al., 2000)Es importante señalar que la densidad de siembra recomendada para la zona norte de México es de hasta 200 plantas por metro cuadrado para el primer año, obteniéndose rendimientos de 20 ton\*ha<sup>-1</sup>\*año. Nuestra densidad de siembra fue de 350 plantas por metro cuadrado, por tal razón no es posible comparar nuestros rendimientos a los rendimientos obtenidos en campo, mas sin

embargo es posible comparar el comportamiento del cultivo a través de año siendo este el discutido anteriormente. Finalmente haciendo uso de las discusiones del apartado 4.1 y del presente, podemos suponer que la planta de alfalfa con las variedades estudiadas presentan tolerancia a las concentraciones de arsénico en suelo empleadas en el presente trabajo.

#### **4.3 Peso seco de raíz y diámetro de raíz.**

El contenido de humedad promedio de la raíz fue de un 36.1 por ciento, se realizaron análisis de GLM y comparación de medias por “Tukey” para evaluar las variables de PSR y DR, las cuales no obtuvieron diferencia significativa entre variedades, pero entre tratamientos se encontró significancia para la variable de diámetro de raíz. En la Grafica 6, puede apreciarse la representación de los datos obtenidos.

Se presento significancia entre tratamientos, en la Tabla 10, se expresan los resultados de comparación de medias entre tratamientos.



Grafica 6. Peso Seco de Raíz y Diámetro de Raíz

Tabla 10. Medias entre tratamientos para DR y PSR

Tratamiento	DR en milímetros	PSR en gramos
0 mg*kg <sup>-1</sup> de As	B 7.1	BC 21.55
10 mg*kg <sup>-1</sup> de As	AB 8.7	B 22.05
20 mg*kg <sup>-1</sup> de As	A 12.7	A 25.40
40 mg*kg <sup>-1</sup> de As	B 8.6	C 20.55

Al igual que para NB y AP la variable DR está relacionada con el número de plantas en las unidades experimentales, al realizar un análisis de correlación entre NPF y DR se encontró un coeficientes de -0.53524 con una significancia de 0.0004, no se encontró correlación entre la concentración de arsénico y el PSR, por lo que no podemos atribuir que las variaciones entre tratamientos

sean causadas por la concentración de arsénico en suelo y es mejor explicado por fenómenos de competencia y plasticidad debido al confinamiento de las plantas en las unidades experimentales.

#### **4.4 Análisis físico – químicos del suelo**

Como se mencionó en el apartado 3.5.8.3 y 3.5.10 con respecto a la calidad empleada y los parámetros agronómicos determinados en el suelo en la Tabla 11 se presentan los resultados para los diferentes parámetros, los previos al experimento y los finales del experimento. Al inicio del cultivo se tuvo un suelo bajo en materia orgánica, con un pH ligeramente alcalino, característico de un suelo mineral de clima árido, con valores óptimos de calcio y nitratos, finalmente con valores críticos de fósforo y magnesio. Al final del cultivo se vio un incremento marcado de la materia orgánica haciendo un suelo mediano en materia orgánica, incrementando los valores de magnesio y la disminución de los nitratos. Es importante resaltar que el muestreo del suelo fue realizado antes de fertilizar al inicio del cultivo.

Tabla 11. Resultado de Análisis Físico - químicos del suelo

Variedad	Sundor								Excelente 110							
	T1		T2		T3		T4		T1		T2		T3		T4	
Parámetro	Ant	Des	Ant	Des	Ant	Des	Ant	Des	Ant	Des	Ant	Des	Ant	Des	Ant	Des
<b>Tex</b>	FAL	FAL	FAL	FAL	FAL	FAL	FAL	FAL	FAL	FAL	FAL	FAL	FAL	FAL	FAL	FAL
<b>MO</b>	1.0	2.5	1.3	2.5	1.3	2.1	1.4	2.3	1.0	2.1	1.3	2.2	1.3	2.1	1.4	2.1
<b>pH</b>	7.5	7.7	7.4	7.9	7.3	7.8	8.0	7.7	7.5	7.9	7.4	8.2	7.3	8.0	8.0	8.1
<b>CE</b>	2.4	1.3	2.8	0.9	3.3	1.8	3.7	2.5	2.4	1.3	2.8	0.9	3.3	1.3	3.7	1.9
<b>Ca</b>	10.0	5.2	13.5	2.8	17.4	11.6	26.3	22.4	10.0	6.0	13.5	4.0	17.4	7.2	26.3	17.2
<b>Mg</b>	2.4	3.2	2.8	2.8	3.5	4.0	3.8	5.6	2.4	2.0	2.8	1.2	3.5	2.0	3.8	3.6
<b>NO<sub>3</sub></b>	252.4	67.9	293.2	68.3	374.2	76.8	452.1	55.6	252.4	65.5	293.2	0	374.2	53.3	452.1	32.1
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	5.0	0.8	6.3	2.4	5.8	0.5	6.0	1.8	3.0	2.4	6.5	1.7	4.8	2.3	5.9	2.7
<b>As</b>	20.0	20.1	29.7	30.4	39.9	37.1	60.6	53.9	20.0	32.9	29.7	27.2	39.9	18.9	60.6	60.6
<b>As cor</b>	0.0	0.0	6.5	7.2	16.7	13.9	37.4	30.7	0.0	9.7	6.5	4.0	16.7	0.0	37.4	37.4

Tex. Expresada como FAL Franco Arcilloso Limoso  
MO. Expresada como por ciento  
pH. Adimensional  
CE. Expresada como mohm\*cm<sup>-1</sup> a 25°C  
Ca y Mg. Expresados como Meq\*L<sup>-1</sup>  
NO<sub>3</sub>, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y As. Expresados como mg/kg<sup>-1</sup>  
ND. No detectable  
Ant y Des. Antes y después, respectivamente  
As cor. Arsénico corregido, Valores menos el valor promedio de los testigos

Para el análisis de arsénico en suelo se emplearon los NIST 2710 y 2711, con una recuperación de 81.7 y 101.1 por ciento respectivamente. Es importante mencionar que las concentraciones iniciales de los tratamientos son: 20.0, 29.9, 39.9, 60.6 para los tratamientos de 0, 10, 20 y 40  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  respectivamente, para fines prácticos se seguirá mencionando estas concentraciones para identificar los diferentes tratamientos. También se realizó un factor de corrección con el promedio de los valores de los testigos, el cual se les sustrajo a todos los valores, los cuales pueden apreciarse en la última fila de la Tabla 11. A excepción del tratamiento tres de la variedad de Excelente 110, no se aprecia disminución significativa en la concentración de arsénico, una causa probable de dicho fenómeno es la contaminación con otra fuente de arsénico en el desarrollo del experimento, la cual pudo haber sido la adición de fertilizante MAP, el cual en la literatura se ha reportado con concentraciones de  $9.75 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  y pueden permitirse hasta  $13 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  por cada unidad porcentual aplicada de fertilizante (Kane & Hall, 2006; McCauley et al., 2003). Este fenómeno será discutido con más detalle en el apartado 4.6 en combinación con la cantidad de arsénico absorbido al interior de la planta.

#### 4.5 Arsénico en tejido vegetal

Para los análisis de arsénico total en tejido vegetal fue necesario monitorear la calidad de los procesos de digestión, para lo cual se empleo el estándar certificado mencionado en el apartado 3.5.9.2. El cual tuvo una recuperación del 106 por ciento al valorar el estándar secundario, el cual tuvo un valor medio de arsénico de:  $4.91 \text{ mg/Kg}^{-1} \pm 0.29$  de arsénico en materia seca; la recuperación promedio del estándar secundario fue de: 95.8 por ciento.

Las variables de Arsénico en hoja (ASH), Arsénico en Tallo (AST) y Arsénico en Raíz (ASR) no presentaron diferencia significativa en el análisis de GLM, siendo la variedad de Excelente 110 la que tuviera mayor acumulación de arsénico en sus diferentes órganos. En la Tabla 12 se presentan los valores de las medias para ambas variedades.

Tabla 12. Medias de Absorción de Arsénico en los diferentes órganos de la planta

Variedad	ASH	AST	ASR
Sundor	8.3348	2.00525	4.7775
Excelente 110	10.0262	2.03675	5.3950

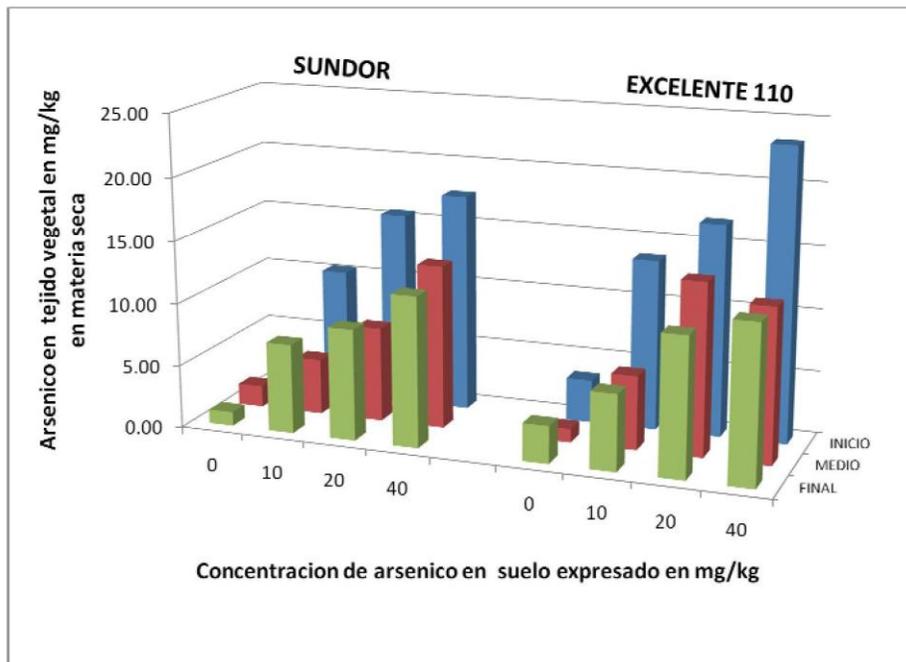
Valores expresados en  $\text{mg*kg}^{-1}$  de materia seca

(Rosas et al., 1999) Rosas en su estudio encontró valores de arsénico en alfalfa en un rango de  $0.2 - 3.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de arsénico con un 40% de acumulación en sus raíces. La mayor acumulación en nuestro trabajo se dio en las hojas con un 56 por ciento seguido de un 31 por ciento en raíces y finalmente con un 13 por ciento en tallos. Otros estudios han demostrado que el arsénico es absorbido por otros tipos de forrajes como el maíz y hortalizas como el tomate. (Miteva, 2002) En tomate se han encontrado concentraciones en el rango de  $0.87$  a  $37.66 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ , expuestas a concentraciones de  $0 - 100 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ , en solución nutritiva, mostrando correlaciones positivas.

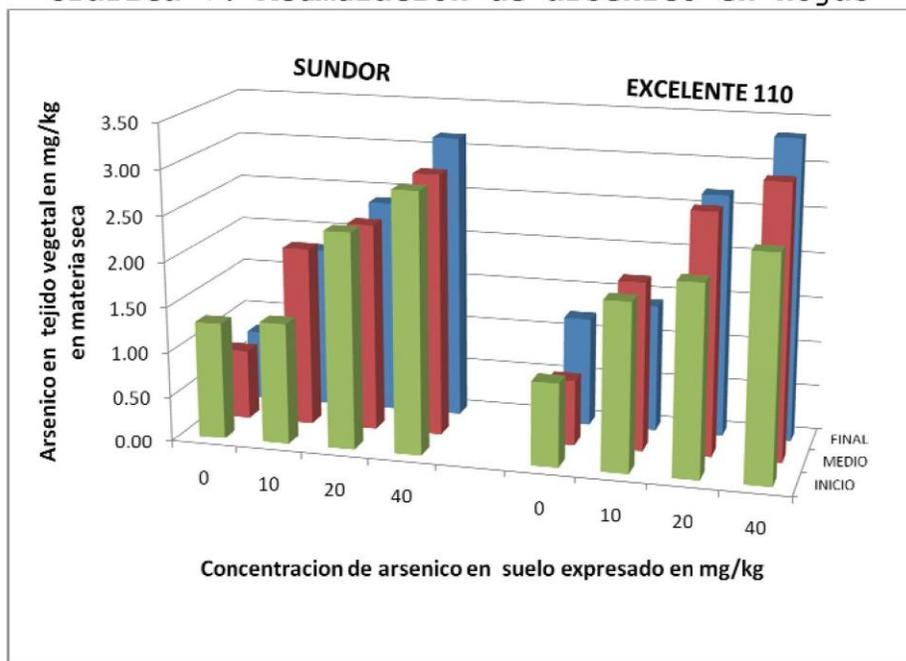
Al analizar las variables de ASH, AST y ASR, entre tratamientos se encontró diferencia estadística, a continuación se presentan las diferentes graficas para ASH (Grafica 7), AST (Grafica 8), y ASR (Grafica 9) en los diferentes estadios del cultivo.

Las variables de ASH y AST se correlacionaron positivamente con el contenido de arsénico en suelo, al igual que el trabajo de Miteva 2002, comentado anteriormente. Los coeficientes de correlación que se obtuvieron fueron:  $0.79967$  y  $0.92491$  ambos con una

significancia < 0.0001 para las variables de ASH y AST respectivamente.



Grafica 7. Acumulación de arsénico en hojas

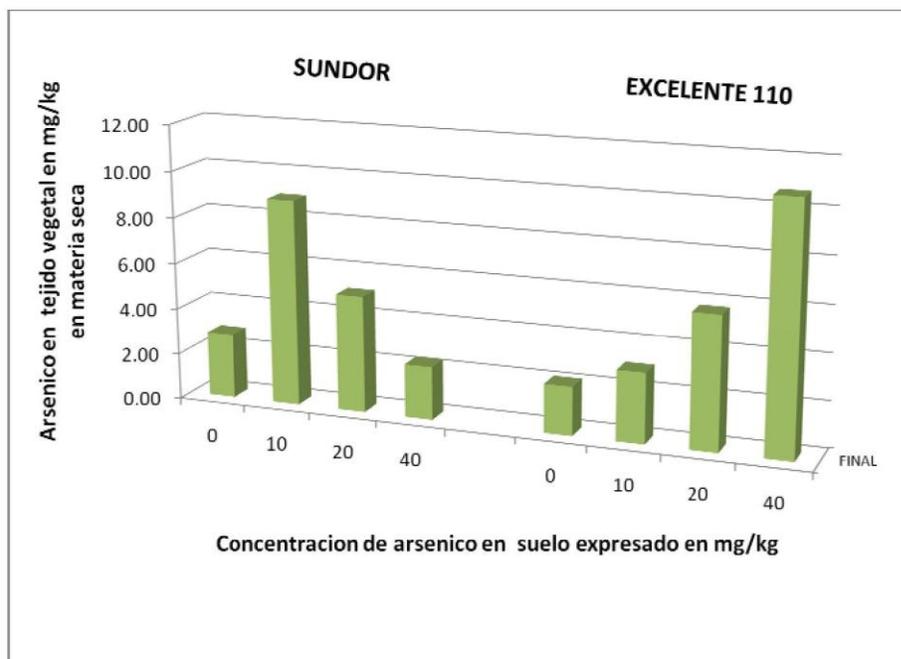


Grafica 8. Acumulación de arsénico en tallo

El comportamiento de la acumulación del arsénico a la raíz se fue de manera diferente para ambas variedades (ver Grafica 9).

Al correlacionar cada variedad contra la concentración de arsénico en suelo, para en el caso de Sundor si se omite el valor del blanco se obtiene un coeficiente de -0.95973 con una significancia  $< 0.0001$ . Para la variedad de Excelente 110 se obtuvo un coeficiente de 0.98895 con una significancia  $< 0.0001$ . Ambos coeficientes pueden explicar con gran seguridad que la concentración contenida en la raíz está en función de la concentración de arsénico en el suelo, igualmente sucede para la variable de AST y en menor grado para la variable ASH.

A continuación en la Tabla 13 se muestran las medias de los valores de 54acumulación de arsénico para los diferentes tratamientos, cabe mencionar que estas fueron diferentes estadísticamente entre sí a excepción en ASR donde solo difiere el tratamiento de  $0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  del resto. También se presento diferencia significativa entre estadios inicio y final para las variables ASH y AST, finalmente también se presento diferencia entre el inicio y medio de la variable ASH, situación que puede apreciarse en las graficas anteriores.



Grafica 9. Acumulación de arsénico en raíz

Tabla 13. Medias de tratamientos de absorción de Arsénico en tejido vegetal

Tratamiento	ASH	AST	ASR
0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	2.09	0.95	2.46
10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	7.78	1.70	5.98
20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	12.03	2.44	5.41
40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	14.82	2.98	6.49

Valores expresados en  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de materia seca

Diferentes estudios realizados en arroz, girasol y diferentes vegetales (Prieto-García et al., 2005; Raab et al., 2005; Wang et al., 2006) han mostrando igualmente correlaciones positivas entre las concentraciones de arsénico a las que fueron expuestos y la acumulación de este en sus diferentes órganos, a excepción del

comportamiento de la variedad Sundor en su acumulación en la raíz.

#### **4.6 Arsénico en suelo – planta**

En estudios de plantas fitoremediadoras se ha asociado una disminución del 26 por ciento del arsénico contenido en el suelo por *Chinese Brake* una planta hiperacumuladora (Tu et al., 2002). En la Tabla 14 se expresan los resultados de absorción de arsénico por alfalfa por maseta o unidad experimental y la concentración final teórica de arsénico en suelo en las unidades experimentales. Para dichos cálculos se consideraron la suma de las medias de acumulación de arsénico en tratamientos para las variables ASH, AST y ASR (Tabla 13) y los rendimientos anuales para cada tratamiento en las variedades estudiadas más su respectivo peso de raíz, ambos en materia seca.

Es evidente que la concentración teórica de Arsénico en el suelo no resulta diferente a la obtenida al inicio del experimento, Las diferencias en los resultados expresados en la Tabla 11 en sus dos últimas filas, a excepción del tratamiento 3 de excelente 110, pueden explicarse por variabilidad analítica, pues como se apreció en la Tabla 14 la disminución de la concentración de arsénico por efecto

de la alfalfa es muy poca. Y las diferencias encontradas pueden atribuirse por lixiviación del arsénico.

Otro factor que hay que considerar es la posible contaminación del experimento con arsénico por la adición del fertilizante MAP, este en su producción es generado a partir de la roca fosfórica rica en arsénico, pero la cantidad adicionada de MAP fue de 3.0 gramos en total y si este tiene una concentración media de  $9.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , no logra ser significativa la contribución de este a la concentración de arsénico en suelo.

Tabla 14. Estimación de las concentraciones de arsénico en suelo al final del experimento

Variedad	[As]-I	PS	mgAsT-S	xAc-As	mgT-AsM	[As]-F
Sundor	0	110.21	0	5.5	0.72	0
Sundor	6.5	129.88	143	15.46	2.34	6.39
Sundor	16.7	125.26	367.4	19.88	3.02	16.56
Sundor	37.4	104.01	822.8	24.29	3.04	37.26
Excelente 110	0	115.71	0	5.5	0.76	0
Excelente 110	6.5	119.51	143	15.46	2.20	6.40
Excelente 110	16.7	111.61	367.4	19.88	2.69	16.58
Excelente 110	37.4	112.41	822.8	24.29	3.22	37.25

**[As]-I** Concentración de Arsénico en macetas al inicio del experimento

**PS** Sumatoria del PS y PSR

**mgAsT-S** Miligramos totales de arsénico presentes en las macetas

**xAc-As** Media de la acumulación de arsénico en planta expresado en miligramos

**mgT-AsM** Miligramos totales acumulados por las plantas por macetas en un año

**[As]-F** Concentración final teórica de arsénico en macetas al final del experimento

La presencia de arsénico en los tratamientos testigos solo puede ser justificada por la presencia de este en el suelo empleado para realizar las macetas, pues las adiciones de del suelo contaminado son equivalentes a las teóricas si se considera que el suelo libre de arsénico, contenía una concentración de  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  de arsénico, aseveración que puede ser comprobada si se observa la Tabla 11.

## **CONCLUSIONES**

La planta de alfalfa en sus variedades de sundor y excelente 110, es capaz de acumular arsénico en sus diferentes órganos, siendo esta acumulación dependiente de la concentración de arsénico presente en el suelo, presentando una relación proporcional entre arsénico acumulado en la planta y contenido de arsénico en suelo; A sí mismo la acumulación de arsénico en la planta tiende hacer constante con el paso del tiempo, presentado mayor acumulación en el desarrollo del cultivo.

La cantidad de arsénico removido del suelo, por acción de la planta de alfalfa no es suficiente para considerar a esta planta como fitoremediadora, mas sin embargo deberá de tenerse cuidado pues la planta de alfalfa y sus asociaciones biológicas con microorganismos y hongos disuelven el arsénico adsorbido en el suelo, esta también podrá acumular el arsénico proveniente de agua de riego, el cual es mas biodisponible que se encuentra contenido en el suelo.

## REFERENCIAS

- Adriano, D. C. (2001). *Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals*. Springer.
- ATSDR. (2005). Resumen de Salud Publica ARSENICO, Division de Toxicología y Medicina Ambiental.
- Bhattacharya, P., Welch, A. H., Stollenwerk, K. G., McLaughlin, M. J., Bundschuh, J. & Panullah, G. (2007). Arsenic in the environment: Biology and Chemistry. *Science of the Total Environment, The*, **379**(2-3), 109-120.
- Cajuste, L. J., Alarcon, A. V., Grabach, C. S., González, G. A. & Bauer, M. d. L. d. I. I. d. (2001). Cadmio, níquel y plomo en agua residual, suelo y cultivos en el valle del mezquital, Hidalgo, Mexico, Vol. 35, Agrociencia. Colegio de Posgraduados Texcoco, Mexico, pp. 267 - 274.
- Carbonell-Barrachina, A. A., Burló, F., Burgos-Hernández, A., López, E. & Mataix, J. (1997). The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. *Scientia Horticulturae*, **71**(3-4), 167-176.
- Cotton, F. A. & Wilkinson, G. (1990). *Química Inorganica Avanzada. Cuarta ed.* LIMUSA NORIEGA EDITORES, Mexico.

- Cox, D. H. (1980). Arsine evolution-electrothermal atomic absorption method for the determination of nanogram levels of total arsenic in urine and water. *J Anal Toxicol*, **4**(4), 207-11.
- Cultivars, F. & Schedules, A. (2006). RENDIMIENTO DE FORRAJE DE VARIEDADES DE ALFALFA EN DOS CALENDARIOS DE CORTE. *Revista Fitotecnica Mexicana*, **29-004**, 369-372.
- Dhankher, O. P. (2005). Arsenic metabolism in plants: an inside story. *New Phytologist*, **168**(3), 503.
- Evangelou, V. P. (1998). *Environmental soil and water chemistry*. John Wiley&Sons, Canada.
- Frankenberger, W. T. (2002). *Environmental Chemistry of Arsenic*. CRC Press.
- G., R. C. & Cajuste, L. J. (1992). Heavy metal in soil and alfalfa (*Medicago Sativa* L.) irrigated with three sources of wastewater, Vol. A, Colegio de Posgraduados, Centro de edafologia, Montesillo Mexico. *J. Environ. SCI. Health*, pp. 1771 -1783.
- Geng, C. N., Zhu, Y. G., Tong, Y. P. & Christie, P. (2005). Uptake and translocation of arsenic and phosphorus in pho 2 mutant and wild type of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant nutrition*, **28**(8), 1323-1336.
- Huang, J. H. & Matzner, E. (2006). Dynamics of organic and inorganic arsenic in the solution phase of an acidic

fen in Germany. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **70**(8), 2023-2033.

INIFAP, CIRNOC & CELALA. (2000). *Produccion y utilizacion de la alfalfa en la zona norte de México*. INIFAP PRODUCE, Mexico.

Kabata-Pendias, A. & Pendias, H. (2001). *Trace Elements in Soils and Plants*. CRC Press.

Kane, P. F. & Hall, W. L. (2006). Determination of Arsenic, Cadmium, Cobalt, Chromium, Lead, Molybdenum, Nickel, and Selenium in Fertilizers by Microwave Digestion and Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry Detection: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, **89**(6), 1447-1466.

Khattak, R. A., Haghnia, G. H., Mikkelsen, R. L., Page, A. L. & Bradford, G. R. (1989). Influence of Binary Interactions of Arsenate, Molybdate, and Selenate on Yield and Composition of Alfalfa. *Journal of Environmental Quality*, **18**(3), 355.

Lillo, J. (2005). Peligros geoquímicos: arsénico de origen natural en las aguas, Grupo de Estudios de Minería y Medioambiente (Textos y cursos online).

Martí, F. B., Conde, F. L., Jimeno, S. A. & Méndez, J. H. (2002). *Química Analítica Cualitativa. Desimoctava-Segunda Reimpresion ed.* THOMSON, España.

- Matschullat, J. (2000). Arsenic in the geosphere—a review. *Science of the Total Environment, The*, **249**(1-3), 297-312.
- McCauley, A., Scientist, S., Jones, C. & Chemist, S. (2003). Commercial Fertilizers and Soil Amendments. In *Nutrient Management Module*, Vol. 10, Department of Agriculture, LeRoy Luft, Interim Vice Provost and Director, Extension Service., Montana State University, pp. 20.
- Miteva, E. (2002). Accumulation and effect of arsenic on tomatoes. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **33**(11), 1917-1926.
- Morales, K. H., Ryan, L., Kuo, T. L., Wu, M. M. & Chen, C. J. (2000). Risk of Internal Cancers from Arsenic in Drinking Water. *Environmental Health Perspectives*, **108**(7), 655-661.
- Parker, A. & Rae, J. E. (1998). *Environmental interactions of clays: clays and the environment*. Springer.
- Peralta, J. R., Torresdey, J. L. G.-., Tiemann, K. J., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E. & Parson, J. G. (2000). Study of the effects of heavy metals on seed germination and plant growth on alfalfa plant (*medicago sativa*) grown in soild media, University of Texas at El Paso, El Paso and ITESM campus Ciudad Juarez. Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research, pp. 135 - 140.

- Prasad, M. N. V. (2004). *Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems*. Springer.
- Prieto-García, F., Callejas, J., de los Ángeles Lechuga, M., Gaytán, J. C. & Barrado, E. (2005). Acumulación en tejidos vegetales de arsénico proveniente de aguas y suelos de Zimapán, Estado de Hidalgo, México. *Bioagro*, **17**(3), 129-135.
- Quaghebeur, M. & Rengel, Z. (2005). Arsenic Speciation Governs Arsenic Uptake and Transport in Terrestrial Plants. *Microchimica Acta*, **151**(3), 141-152.
- Raab, A., Schat, H., Meharg, A. A. & Feldmann, J. (2005). Uptake, translocation and transformation of arsenate and arsenite in sunflower (*Helianthus annuus*): formation of arsenic-phytochelatin complexes during exposure to high arsenic concentrations. *New Phytol*, **168**(3), 551-8.
- Rodríguez, H. F. & Rodríguez, J. A. (2002). *Metodos de análisis de suelos y plantas, Criterios de interpretación*. 1 ed. trillas, Mexico.
- Rosas, R. Belmont, Armienta, A. & Baez. (1999). Arsenic concentration in water, soil, milk and forage in Comarca Lagunera, Mexico, Vol. 112, Water, Air and Soil Pollution. Instituto de Geofisica, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, pp. 133 - 149.

- Roychowdhury, T., Tokunaga, H., Uchino, T. & Ando, M. (2005). Effect of arsenic-contaminated irrigation water on agricultural land soil and plants in West Bengal, India. *Chemosphere*, **58**(6), 799-810.
- Sadiq, M. (1997). Arsenic chemistry in soils: An overview of thermodynamic predictions and field observations. *Water, Air, & Soil Pollution*, **93**(1), 117-136.
- Sahagun, J. d. J. R. (2006). Evaluacion de la contaminacion del suelo y agua subterranea por plaguicidas organoclorados en la Comarca Lagunera, Vol. Doctoral, Universidad Juarez del Estado de Durango, Facultad de Agricultura y Zootecnia. Venecua Durango, pp. 135.
- Salcedo, J. J. G., Serrano, M. C. H., Vargas, G. G. G., Anaya, B. V., Salazar, M. F. S. M. & Gallardo, L. B. S. (1994). Estudio del contenido de arsenico en alimentos de consumo humano producidos en la Comarca Lagunera, Vol. XIX No 77, BIOQUIMICA Mexico, pp. 187 -190.
- Santamaría, C. J., Núñez, H. G., Medina, G. G. & Ruiz, C. (2000). Producción y utilización de la alfalfa en la zona norte de México. *INIFAP, Matamoros, Coahuila*, **171**.
- Santos, A. L. (2004). Uso de ceniza de madera y carbonato de calcio como agentes neutralizantes en suelos acidos y estudios de su efecto en cebada y alfalfa, Universidad Juarez del Estado de Durango, Facultad de

Agricultura y Zootecnia, Divicion de Estudios de Posgrado, pp. 100.

SEMARNAT. (2004). PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plomo, selenio, talio y vanadio, Diario Oficial. Mexico.

Sepulveda, T. V. & Trejo, J. A. V. (2002). *Tecnologias de remediacion de suelos contaminados. 1 ed.* Instituto Nacional de Ecologia Mexico

Sepulveda, T. V., Trejo, J. A. V. & Perez, D. A. d. I. R. (2005). *Suelos contaminados por metales y metaloides. 1 ed.* Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecologia, Mexico DF.

Sheppard, S. C. (1992). Summary of phytotoxic levels of soil arsenic. *Water, Air, & Soil Pollution*, **64**(3), 539-550.

Sigel, A., Sigel, H. & Sigel, R. K. O. (2005). *Biogeochemistry, Availability, and Transport of Metals in the Environment.* Informa Health Care.

Smith, E., Naidu, R. & Alston, A. M. (2002). Chemistry of Inorganic Arsenic in Soils II. Effect of Phosphorus,

Sodium, and Calcium on Arsenic Sorption. Am Soc Agronom.

Soto, G. & Muñoz, C. (2002). Consideraciones teoricas y practicas sobre el compost y su empleo en la agricultura organica, Departamento de Agricultura Ecologica. Costa Rica.

Steubing, L., Godoy, D. R. & Alberdi, M. (2001). *Métodos de Ecología Vegetal*. Universidad Austral de Chile: Editorial Universitaria.

Stoeva, N., Berova, M. & Zlatev, Z. (2005). Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. *Biologia Plantarum*, **49**(2), 293-296.

Torresdey, J. L. G.-., Gonzalez, J. H., Tiemann, K. J. & Rodriguez, O. (2004). Biosorption of cadmium, chromium, lead and zinc by biomass of *Medicago Sativa* (Alfalfa). Department of Chemistry, The University of Texas at El Paso, El Paso.

Torresdey, J. L. G.-., Tiemann, K. J., Gonzalez, J. H., Aguilera, I. C.-., Henning, J. A. & Townsend, M. S. (2004). Ability of medicago sativa (Alfalfa) to remove nikel ions from aqueous solution, Department of chemistry, University of Texas at Department of Agronomy & Horticulture, New Mexico State University, Las Cruces. El Paso Texas, pp. 239 - 248.

- Trejo. ( 2005). El intrigante Cadmio. In *Departamento de Quimica Biologica, Facultad de Farmacia y Bioquimica.*, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires.
- Trejo, M. L. (2005). El intrigante Cadmio, Universidad de Buenos Aires, Departamento de Quimica Biologica, Facultad de Farmacia y Bioquimica.
- Tu, C., Ma, L. Q. & Bondada, B. (2002). Arsenic accumulation in the hyperaccumulator Chinese brake and its utilization potential for phytoremediation. *Journal of Environmental Quality*, **31**(5), 1671-1675.
- Urbano, D. & Davila, C. (2003). Evaluación del rendimiento y composición química de once variedades de alfalfa (*Medicago sativa*) bajo corte en la zona alta del estado Mérida, Venezuela. *Rev. Fac. Agron*, **20**(1), 97-107.
- Valverde, G. J. (1999). Especiacion de arsenico en suelos contaminados tras el accidente minero de aznalcollar. In. *Quimica Analitica*, Universidad de Barcelona. Barcelona, pp. 123.
- Wang, F. M., Chen, Z. L., Zhang, L., Gao, Y. L. & Sun, Y. X. (2006). Arsenic Uptake and Accumulation in Rice (*Oryza sativa* L.) at Different Growth Stages following Soil Incorporation of Roxarsone and Arsanilic Acid. *Plant and Soil*, **285**(1), 359-367.

- Yaron, B., Calvet, R. & Prost, R. (1996). *Soil Pollution: Processes and Dynamics*. Springer.
- Yu, R. C., Hsu, K. H., Chen, C. J. & Froines, J. R. (2000). Arsenic Methylation Capacity and Skin Cancer 1, Vol. 9, AACR, pp. 1259-1262.
- Zhu, Y. G., Geng, C. N. U., Tong, Y. I. P., Smith, S. E. & Smith, F. A. (2006). Phosphate (Pi) and Arsenate Uptake by Two Wheat (*Triticum aestivum*) Cultivars and Their Doubled Haploid Lines. *Annals of Botany*, **98**(3), 631.