

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

**ESTRÉS POR URANIO EN PLANTAS.
ACUMULACIÓN EN ESPECIES
VEGETALES DE ZONAS MINERAS Y
ESTUDIO DE RESPUESTAS
FISIOLÓGICAS EN REMOLACHA
(*Beta vulgaris*)**

Tesis doctoral presentada por:

Silvia Concepción López

Dirigida por:

Anna Maria Garcia Ortolà

2009

Dña. Anna Garcia Ortolà, Dra. en Ciencias Biológicas, Profesora Titular de la Universidad Politécnica de Valencia.

CERTIFICA:

Que la memoria titulada "*Estrés por uranio en plantas. Acumulación en especies vegetales de zonas mineras y estudio de respuestas fisiológicas en remolacha (Beta vulgaris)*" presentada por Dña. Silvia Concepción López para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas ha sido realizada bajo su dirección.

Y para que así conste a todos los efectos y a petición de la persona interesada, se expide el presente certificado en Valencia, Noviembre del año dos mil ocho.

Anna Garcia Ortolà

A José Pedro Mestre Arceredillo

***A vos, José, mi compañero y esposo por 30 años, porque compartimos
amor, aventura, hijos y enojos, y...
porque mientras escribo esta dedicatoria
lloro como el primer día que te fuiste***

Agradecimientos

Deseo agradecer a todos los que me ayudaron en la realización de esta tesis tanto por su colaboración directa en el trabajo como por ofrecerme su amistad y afecto fortaleciendo mi voluntad de trabajo.

A mis hijos Maria Cecilia y Pedro Santiago por haberme alentado a finalizar esta tesis y, en definitiva, por ser ellos mismos mi mayor apoyo.

A mis hermanos Rafael y Silvia y a mi prima Marina que me ayudaron a seguir el camino, brindándome su afectuosa compañía.

A mis primos Marcela y Coco por haberme ayudado a elaborar un nuevo sueño para cuando termine esta tesis.

A Néstor Bárbaro por confiar profesionalmente en mí y por enseñarme a buscar quien soy.

A Olga Martín por sus ideas prácticas y sus hábiles manos que facilitaron el diseño y montado de las experiencias de esta tesis.

A Antonio Solis por su colaboración en el mantenimiento de los ensayos.

A Guido Tomellini por los análisis de uranio.

A Juan Pablo Bonetto y Mariana Melaj por su colaboración al inicio de esta tesis.

A Marisa Tramontini, Emilia Bisi, Florencia Uehara, Luciano Benavides, Mariana Malter Terrada, Verónica Yusef, Alfonso Buján, y Carlos Leiva por compartir el día a día del Grupo Agronómico.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis y a María Dina García por su labor de coordinación.

Finalmente, pero no por eso menos importante, agradezco a mi directora de tesis Dra. Anna María García Ortolà por su atención y por su calidez humana.



INDICE

ÍNDICE GENERAL

	<i>página</i>
Dedicatoria y Agradecimientos	2
Índice General	5
Índice de Tablas	8
Índice de Figuras y Fotografías	10
Abreviaturas	12
Resumen	14
Resum	16
Abstract	18
I – INTRODUCCIÓN	20
1. CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS EN MEDIOS CON ELEVADO CONTENIDO DE METALES PESADOS	21
1.1. Biodisponibilidad y toxicidad	22
1.2. Efectos sobre el metabolismo y los indicadores de estrés de las plantas	25
1.3. Mecanismos de tolerancia	28
2. EL CASO DEL URANIO	34
2.1. Absorción del uranio por las plantas	35
2.2. Cambios metabólicos provocados por la presencia de uranio en plantas superiores	37
3. TRATAMIENTO DE SUELOS Y AGUAS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS UTILIZANDO MATERIALES BIOLÓGICOS	40
3.1. Cultivo de plantas con fines de fitorremediación	40
II - JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS	46
1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	47
III - MATERIALES Y MÉTODOS	51
1. TRANSFERENCIA DE URANIO A PLANTAS EN ECOSISTEMAS NATURALES Y MODIFICADOS	52
1.1. Descripción de las zonas de muestreo y toma de muestras ..	52
1.2. Procedimientos analíticos	56

	<i>página</i>
1.2.1. Determinación del contenido de uranio total	56
1.2.2. Determinación del contenido en nitrógeno total	56
1.2.3. Determinación del contenido en fósforo del suelo	57
1.2.4. Determinación del contenido en materia orgánica del suelo	57
1.2.5. Medida del pH del suelo	58
1.3. Indicadores de transferencia y translocación	58
2. TRANSFERENCIA DE URANIO A PLANTAS EN CONDICIONES CONTROLADAS	59
2.1. Material vegetal	59
2.2. Diseño experimental	61
2.3. Evapotranspiración y toma de muestras de la solución nutritiva	63
2.4. Procedimientos analíticos	63
2.4.1. Determinación de fosfatos y de uranio	63
2.4.1.1. <i>Obtención del extracto</i>	63
2.4.1.2. <i>Análisis del contenido de fosfatos</i>	64
2.4.1.3. <i>Análisis del contenido de uranio</i>	64
2.4.2. Determinación del nitrógeno total	65
2.4.3. Contenido hídrico relativo	65
2.4.4. Determinación del contenido en pigmentos fotosintéticos	65
2.4.5. Extracción y determinación de la actividad ascórbico peroxidasa	66
2.4.6. Determinación de la cantidad de proteína soluble	67
2.5. Indicadores de transferencia y tolerancia	67
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	68
IV - RESULTADOS	69
1. BIOACUMULACIÓN DE URANIO EN CONDICIONES DE CAMPO	70
2. TOLERANCIA Y ACUMULACIÓN DE URANIO EN UN CULTIVO HIDROPÓNICO DE REMOLACHA (<i>Beta vulgaris</i>)	77
2.1. Acumulación de uranio en remolacha expuesta a distintas concentraciones de uranio	77

	<i>página</i>
2.1.1. Cambios en la solución de cultivo	77
2.1.2. Evolución de la concentración de uranio y fósforo en la solución nutritiva durante el periodo de exposición al contaminante	79
2.1.3. Desarrollo del cultivo y biomasa vegetal	81
2.1.4. Contenido de nitrógeno y fósforo	82
2.1.5. Acumulación de uranio en parte aérea y raíz	83
2.1.6. Indicadores de tolerancia, toxicidad y capacidad de bioacumulación de uranio	86
2.1.7. Recuperación del uranio agregado	88
2.2. Efecto del fósforo en la acumulación de uranio y en la tolerancia de remolacha	89
2.3. Efecto del tiempo de exposición al uranio sobre el crecimiento, contenido hídrico, niveles de pigmentos fotosintéticos y actividad enzimática	91
2.3.1. Acumulación de biomasa vegetal	91
2.3.2. Contenido hídrico relativo	93
2.3.3. Contenido de pigmentos fotosintéticos en las hojas ...	95
2.3.4. Actividad del enzima ascórbico peroxidasa	99
V - DISCUSIÓN	101
1. TOLERANCIA Y BIOACUMULACIÓN DE URANIO EN CONDICIONES DE CAMPO	102
2. TOLERANCIA Y ACUMULACIÓN DE URANIO EN CULTIVOS HIDROPÓNICOS DE REMOLACHA	107
2.1. Recuperación del uranio en los distintos compartimentos del sistema planta-medio de cultivo	107
2.2. Acumulación de uranio en plantas y transferencia sustrato-tejido vegetal	109
2.3. Crecimiento de las plantas e índices de tolerancia o toxicidad.	111
2.4. Efecto del uranio sobre algunos parámetros fisiológicos y bioquímicos	113
3. FACTIBILIDAD DEL USO DE PLANTAS TERRESTRES PARA FITORREMEDIACIÓN	116
VI – CONCLUSIONES	120
VII – BIBLIOGRAFÍA	124

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>página</i>
Tabla 1 - Algunos trabajos publicados sobre distintos aspectos de la relación uranio–especies vegetales	38
Tabla 2 - Composición de la solución nutritiva utilizada para el ensayo	59
Tabla 3 - Esquema temporal del Experimento 3 en donde se muestran los tratamientos aplicados y los días de muestreo. . .	62
Tabla 4 - Presencia de las especies vegetales escogidas en diferentes zonas de muestreo	72
Tabla 5 - Concentración de uranio en biomasa aérea y radicular de distintas especies vegetales en relación con el contenido de uranio en el suelo que cohabitan	73
Tabla 6 - Reposición de agua durante el ensayo en relación con la concentración inicial de uranio en la solución nutritiva de un cultivo hidropónico de remolacha roja (<i>Beta vulgaris</i>)	78
Tabla 7 - Biomasa, porcentaje de materia seca y relación entre biomasa de raíz y parte aérea en un cultivo hidropónico de <i>Beta vulgaris</i> con distintas concentraciones iniciales de uranio	82
Tabla 8 - Nitrógeno y fósforo en tejido de <i>Beta vulgaris</i> creciendo en un cultivo hidropónico con distintas concentraciones de uranio	83
Tabla 9 - Concentración de uranio en el tejido vegetal de parte aérea y raíz de <i>Beta vulgaris</i> creciendo en un cultivo hidropónico con distintas concentraciones de uranio	84
Tabla 10 - Uranio total acumulado en la parte aérea y en la raíz de <i>Beta vulgaris</i> en relación con el uranio total agregado	86
Tabla 11 - Índices de tolerancia (IC) y factor de bioacumulación (FB _H) de uranio en plantas de remolacha (<i>Beta vulgaris</i>), en un cultivo hidropónico con distintas concentraciones iniciales de uranio	88
Tabla 12 - Recuperación de uranio en la solución de cultivo y en las plantas de remolacha (<i>Beta vulgaris</i>) tras 15 días de exposición a distintas concentraciones de uranio	88
Tabla 13 - Efecto de la presencia del anión fosfato en el medio de cultivo sobre la biomasa y la absorción de uranio en plantas de remolacha roja	89
Tabla 14 - Efecto del agregado de uranio y de su posterior eliminación en el medio de cultivo sobre el peso fresco de la parte aérea de remolacha roja	92
Tabla 15 - Efecto del agregado de uranio y de su posterior eliminación en el medio de cultivo sobre el peso fresco de las raíces de remolacha roja	92

	<i>página</i>
Tabla 16 - Grado de inhibición del crecimiento en plantas de remolacha expuestas al uranio	93
Tabla 17 - Efecto del agregado de uranio y de su posterior eliminación en el medio de cultivo sobre el contenido hídrico relativo en hojas de remolacha roja	95
Tabla 18 - Contenido de clorofila $a + b$, $Clor_{(a+b)}$, en hojas de remolacha roja (<i>Beta vulgaris</i>) en relación al tratamiento recibido y al tiempo de cultivo transcurrido	95
Tabla 19 - Contenido de carotenoides totales $x + c$, $Car_{(x+c)}$, en hojas de remolacha roja (<i>Beta vulgaris</i>) en relación al tratamiento recibido y al tiempo de cultivo transcurrido	96
Tabla 20 - Contenido de clorofila a , $Clor_a$, en hojas de remolacha roja (<i>Beta vulgaris</i>) en relación al tratamiento recibido y al tiempo de cultivo transcurrido	97
Tabla 21 - Contenido de clorofila b , $Clor_b$, en hojas de remolacha roja (<i>Beta vulgaris</i>) en relación al tratamiento recibido y al tiempo de cultivo transcurrido	97
Tabla 22 - Análisis estadístico de la actividad ascórbico peroxidasa (APX) en hojas de remolacha roja (<i>Beta vulgaris</i>) en relación al tratamiento recibido y al tiempo de cultivo transcurrido	99

ÍNDICE DE FIGURAS y FOTOGRAFÍAS

	<i>página</i>
Figura 1 - Curva de respuesta a la concentración de elementos esenciales y no esenciales en el medio de crecimiento de las plantas	25
Figura 2 - Mecanismos a nivel celular para la detoxificación y tolerancia a metales pesados en plantas superiores	33
Figura 3 - Ubicación del Complejo Minero San Rafael, en Sierra Pintada, dentro de la Provincia de Mendoza en Argentina ...	48
Figura 4 - Concentración de uranio en la parte aérea de coirón (<i>Stipa sp.</i>) en relación con el contenido de uranio del suelo que habitan	74
Figura 5 - Concentración de uranio en la raíz de coirón (<i>Stipa sp.</i>) en relación con el contenido de uranio del suelo que habitan	74
Figura 6 - Porcentaje de uranio de la raíz translocado hacia la parte aérea en relación con la concentración de uranio en raíces de coirón (<i>Stipa sp.</i>) creciendo sobre suelos con distintos niveles de uranio	75
Figura 7 - Factor de bioacumulación (FB _s) de uranio en raíz y parte aérea de coirón (<i>Stipa sp.</i>)	76
Figura 8 - Evolución del consumo diario de agua por evapotranspiración	78
Figura 9 - Concentración de uranio en la solución nutritiva de un cultivo hidropónico de <i>Beta vulgaris</i> en función del tiempo transcurrido después del agregado de distintas concentraciones del contaminante	79
Figura 10 - Concentración de uranio en la solución nutritiva en función del tiempo transcurrido tras el agregado del contaminante, en presencia o ausencia de <i>Beta vulgaris</i>	80
Figura 11 - Evolución de la concentración de fósforo en la solución nutritiva	80
Figura 12 - Concentración de uranio en tejido vegetal, parte aérea (a) y raíz (b), de <i>Beta vulgaris</i> en relación con la concentración de la solución hidropónica donde fue cultivada .	85
Figura 13 - Porcentaje de uranio de la raíz translocado hacia la parte aérea en relación con el contenido total de uranio en raíces de <i>Beta vulgaris</i> , creciendo en un cultivo hidropónico con distintas concentraciones de uranio	87
Figura 14 - Efecto de la presencia del anión fosfato y de uranio en el medio de crecimiento sobre la aparición de nuevas hojas en remolacha roja	90

	<i>página</i>
Figura 15 - Variaciones de peso fresco de parte aérea y raíz de remolacha roja sometida a los distintos tratamientos en el transcurso del ensayo	91
Figura 16 - Contenido hídrico relativo en hojas de remolacha roja expuesta a uranio, comparado con plantas control sin agregado de contaminante	94
Figura 17 - Contenido de clorofila, $Clor_{(a+b)}$, y carotenoides, $Car_{(x+c)}$, en hojas de remolacha roja (<i>Beta vulgaris</i>) en relación al tratamiento recibido y al tiempo de exposición al uranio	96
Figura 18 - Variación porcentual de las clorofilas <i>a</i> y <i>b</i> después del agregado de uranio, en función del tiempo de ensayo transcurrido	98
Figura 19 - Actividad del enzima ascórbico peroxidasa en hojas de remolacha roja (<i>Beta vulgaris</i>) en relación al tratamiento recibido al tiempo de exposición al uranio	99
Foto 1 - Talud de una escombrera (1A), vegetación de la zona y detalle de matas de coirón (1B y 1C)	54
Foto 2 - Planta de jarilla y diferencias morfológicas de las hojas de las dos especies de jarilla estudiadas	55
Foto 3 - Rama de chil-chil (<i>Tagetes minuta</i>)	55
Foto 4 - Plántulas de remolacha colocadas en los recipientes con la solución hidropónica	60
Foto 5 - Plantas de remolacha (<i>Beta vulgaris</i>), tras 15 días de exposición a concentraciones de U de 0, 1, 2, 3 y 5 mgU L ⁻¹ ..	81

ABREVIATURAS

- A : Absorbancia
- APX : ascórbico peroxidasa
- BSA : del inglés "bovine serum albumine" ó albúmina bovina
- Car_(x + c) : carotenoides totales, incluyendo xantofilas y carotenos
- CAT : catalasa
- CHR: contenido hídrico relativo
- Clor_a : clorofila *a*
- Clor_b : clorofila *b*
- Clor_(a+b) : clorofila *a + b*
- Clor-[Mg] : molécula de clorofila normal con Mg como ión central
- Clor-[MP] : molécula de clorofila "sustituída" , con un metal pesado (MP) como ión central
- CMFSR : Complejo Minero Fabril San Rafael
- CU_p : concentración de U en la planta
- CU_s : concentración de U en el sustrato
- DBM : dibenzoilmetano
- DHA : dehidroascorbato
- EDTA : ácido etilen diamino tetra acético
- FAO/IAEA: División conjunta "Food and Agriculture Organization/ International Atomic Energy Agency".
- FB : factor de bioacumulación
- FB_H : factor de bioacumulación en plantas cultivadas en hidroponía
- FB_S : factor de bioacumulación en plantas que crecen en suelo
- FT : factor de translocación raíz-parte aérea
- GIC : grado de inhibición del crecimiento
- GR : glutatión reductasa
- GSH : glutatión
- IC : índice de tolerancia
- MO : materia orgánica
- OIEA: Organismo Internacional de Energía Atómica
- Pf : Peso fresco
- Ps: Peso seco
- Pt : Peso turgente
- PRAMU : Programa de Restitución Ambiental de la Minería del Uranio

ROS : del inglés "reactive oxygen species", especies reactivas del oxígeno

SAGyP : Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, República Argentina

SOD : superóxido dismutasa

TF : del inglés "transfer factor", factor de transferencia sustato-planta

UGAN : Unidad de Gestión Ambiental Nacional, Subsecretaría de Minería, República Argentina

VClor_a : variación temporal de clorofila *a*

VClor_b : variación temporal de clorofila *b*

Estrés por uranio en plantas. Acumulación en especies vegetales de zonas mineras y estudio de respuestas fisiológicas en remolacha (*Beta vulgaris*)

RESUMEN

El exceso de metales pesados en suelos y agua es uno de los problemas actuales más relevantes por el riesgo de toxicidad que implica su ingreso a las cadenas tróficas.

El uranio (U) es un constituyente natural de todos los suelos y la mayoría de las aguas naturales, pero se encuentra en mayor concentración en algunas rocas y minerales, que pueden ser explotados para obtener concentrados de U utilizables en la generación de energía.

El uso potencial de plantas para la limpieza de suelos y aguas contaminados con niveles excesivos de Uranio derivados de su manipulación está en estudio, habiéndose llegado en un caso a una instalación de rizofiltración por girasol a escala piloto.

Este trabajo tiene como objetivo general la contribución al conocimiento sobre la absorción de U en plantas terrestres y sobre el comportamiento de las mismas en medios contaminados con este metal pesado. Se ha subdividido en dos objetivos específicos: 1. Estudiar la capacidad potencial de absorción de U *in situ* de algunas especies vegetales de aparición espontánea en un área minera; 2. Estudiar el comportamiento y tolerancia de la remolacha roja (*Beta vulgaris*) a distintas concentraciones de U en condiciones de hidroponía en laboratorio.

El coirón (*Stipa* sp) fue la única especie vegetal que se encontró en todos los suelos, incluyendo las escombreras de colas de mineral, tolerando concentraciones de U en el sustrato de hasta 386 mgU kg⁻¹. *Tagetes minuta* (chinchil o chil-chil) se encontró en sustratos de hasta 280 mgU kg⁻¹. Las dos especies de jarilla, *Larrea divaricata* y *Larrea nitida*, en cambio, sólo estuvieron presentes en sustratos con baja contaminación. En todos los casos la acumulación de U y el factor de transferencia sustrato-planta o factor de bioacumulación (FB) fueron bajos.

En el cultivo hidropónico, la remolacha sobrevivió en solución nutritiva con distintas concentraciones de U agregado entre 0 y 5 mgU L⁻¹, durante 15 días.

La tolerancia al U estaría asociada a la presencia de P, en la forma de anión fosfato, en la solución nutritiva, ya que sin este elemento, la remolacha no

sobrevivió más de 7 días en una solución conteniendo $3,3 \text{ mgU L}^{-1}$, una concentración menor a la máxima soportada por la remolacha durante más tiempo en presencia de P.

La acumulación de U en raíces fue muy alta, observándose un FB promedio de 4.600. En parte aérea, en cambio, no se registró bioconcentración de U, con un FB siempre menor a 1.

La restricción a la translocación del U de raíz a parte aérea se observó tanto en las especies vegetales de aparición espontánea en suelos como en la remolacha cultivada en condiciones controladas. En remolacha la translocación fue ligeramente aumentada al retirarse el P de la solución nutritiva. La tolerancia al U del coirón, el chil-chil y la remolacha estaría basada probablemente en un mecanismo de exclusión del U de la parte aérea, donde podría interferir con procesos fisiológicos vitales.

De hecho, la evapotranspiración, el contenido hídrico relativo y el contenido total de clorofila sufrieron una fuerte reducción en las plantas de remolacha crecidas en medio con agregado de U. La actividad de la ascórbico peroxidasa, una enzima que actúa en situaciones de estrés oxidativo, aumentó. Una vez producida la contaminación de las plantas de remolacha, la eliminación del U del medio de cultivo no fue suficiente para la recuperación completa de las plantas.

El uso de las especies vegetales estudiadas en programas de fitorremediación estaría limitado por la escasa acumulación del contaminante en la parte aérea. Esto impediría su uso en estudios de fitoextracción en suelos. Pero podría utilizarse la alta capacidad de colonización de suelos disturbados y la tolerancia al U del coirón y el chil-chil para fitoestabilización de sustratos contaminados con U, evitando así la dispersión de la contaminación por acción eólica e hídrica. La aplicación de remolacha en sistemas de rizofiltración de aguas contaminadas con U, en cambio, parece ser factible. Sin embargo, es necesario mejorar las condiciones de operación para llevarlas a una situación de manejo industrial o semi-industrial ya que sólo se observó la factibilidad a nivel laboratorio.

Estrès per urani en plantes. Acumulació en espècies vegetals de zones mineres i estudi de respostes fisiològiques en remolatxa (*Beta vulgaris*)

RESUM

L'excés de metalls pesants en sòls i aigua és un dels problemes actuals més rellevants pel risc de toxicitat que implica el seu ingrés a les cadenes tròfiques.

L'urani (U) és un constituent natural de tots els sòls i la majoria de les aigües naturals, però es troba en major concentració en algunes roques i minerals, que poden ser explotats per a obtenir concentrats d'U utilitzables en la generació d'energia.

L'ús potencial de plantes per a la neteja de sòls i aigües contaminats amb nivells excessius d'Urani derivats de la seva manipulació està en estudi, havent-se arribat en un cas a una instal·lació de rizofil·tració per gira-sol a escala pilot.

Aquest treball té com objectiu general la contribució al coneixement sobre l'absorció d'U en plantes terrestres i sobre el comportament de les mateixes en medis contaminats amb aquest metall pesant. S'ha subdividit en dos objectius específics: 1. Estudiar la capacitat potencial d'absorció d'U *in situ* d'algunes espècies vegetals d'aparició espontània en un àrea minera; 2. Estudiar el comportament i tolerància de la remolatxa vermella (*Beta vulgaris*) a diferents concentracions d'U en condicions de hidroponia en laboratori.

L'única espècie vegetal que es va trobar en tots els sòls i escombreres amb diferents nivells d'U, fora i dintre de l'àrea d'explotació minera, va ser el "coirón" (*Stipa* sp), que es va mostrar tolerant a concentracions d'U en el substrat de fins a 386 mgU kg⁻¹. *Tagetes minuta* ("chin-chil" o "chil-chil") es va trobar en substrats de fins a 280 mgU kg⁻¹. Les dues espècies de "jarilla", *Larrea divaricata* i *Larrea nitida*, en canvi, només van estar presents en substrats amb baixa contaminació. En tots els casos l'acumulació d'U i el factor de transferència substrat-planta o factor de bioacumulació (FB) van ser baixos.

En el cultiu hidropònic, la remolatxa va sobreviure en solució nutritiva amb diferents concentracions d'U agregat entre 0 i 5 mgU L⁻¹, durant 15 dies.

La tolerància a l'U estaria associada a la presència de P en la solució nutritiva, ja que sense aquest element, la remolatxa no va sobreviure més de 7

dies en una solució contenint $3,3 \text{ mgU}\cdot\text{L}^{-1}$, una concentració menor a la màxima suportada per la remolatxa durant més temps en presència de P.

L'acumulació d'U en arrels va ser molt alta, observant-se un FB mitjà de 4.600. En part aèria, en canvi, no es va registrar bioconcentració d'U, amb un FB sempre menor a 1.

La restricció a la translocació de l'U d'arrel a part aèria es va observar tant en les espècies vegetals d'aparició espontània en sòls com en la remolatxa conreada en condicions controlades. En remolatxa la translocació va ser lleugerament augmentada al retirar-se el P de la solució nutritiva. La tolerància a l'U del "coirón", el "chil-chil" i la remolatxa estaria basada probablement en un mecanisme d'exclusió de l'U de la part aèria, on podria interferir amb processos fisiològics vitals.

De fet, la evapotranspiració, el contingut hídric relatiu i el contingut total de clorofil·la va sofrir una forta reducció en les plantes de remolatxa crescudes al medi amb agregat d'U. L'activitat de la ascòrbic peroxidasa, un enzim que actua en situacions d'estrès oxidatiu, va augmentar. Una vegada produïda la contaminació de les plantes de remolatxa, l'eliminació de l'U del medi de cultiu no és suficient per a la recuperació completa de les plantes.

L'ús de les espècies vegetals estudiades en programes de fitorremediació estaria limitat per l'escassa acumulació del contaminant en la part aèria. Això impediria el seu ús en estudis de fitoextracció en sòls. Però podria utilitzar-se l'alta capacitat de colonització de sòls disturbats i la tolerància a l'U del "coirón" i el "chil-chil" per a fitoestabilizació de substrats contaminats amb U, evitant així la dispersió de la contaminació per acció eòlica i hídrica. L'aplicació de remolatxa en sistemes de rizofiltració d'aigües contaminades amb U, en canvi, sembla ser factible. No obstant això, és necessari millorar les condicions d'operació per a dur-les a una situació de maneig industrial o semi-industrial ja que només es va observar la factibilitat a nivell de laboratori.

Plant responses to Uranium stress. The accumulation of Uranium in plant species from mine areas and a study on the physiological changes in red beet (*Beta vulgaris*)

ABSTRACT

Excessive concentration of some heavy metals in soil and water is one of the most pressing problems in today's world. This is due to the toxicity risk associated with their integration into the food chain.

Uranium (U) naturally occurs in all soil types and in almost all natural sources of water. However, its concentration is higher in specific rocks and minerals, which can be exploited to obtain U for energy generation. The potential use of plants for the cleanup of soil and water contaminated with excessive uranium levels derived from its manipulation is an active research topic, and has already led to the installation of a pilot system for rhizofiltration using sunflowers.

The main objective of this study is to improve our understanding of the process of U uptake by terrestrial plants and to characterise the physiological behaviour of these plants in U-contaminated environments. The research has been subdivided into two objectives: 1. To study the potential U uptake *in situ* by specific plant species of spontaneous emergence in a mining area; 2. To study the behaviour and tolerance of the red beet (*Beta vulgaris*) at various U concentrations in hydroponic conditions within a laboratory setting.

The only plant species to be found in all soil types, including mine tailings, was the *Stipa* sp. ("corión") which, within the media used, showed tolerance to U concentrations of up to 386 mgU kg⁻¹. *Tagetes minutes* ("chin-chil or chil-chil") was found in soils with U concentration up to 280 mgU kg⁻¹. In contrast, the two species of "jarilla", *Larrea divaricata* and *Larrea nitida*, were only present in soils with low levels of contamination. In all cases, the U accumulation and the soil-to-plant transfer factor or bioaccumulation factor (BF) were low.

In hydroponic conditions, beets survived in nutrient solution with the addition of U concentrations in the range 0 - 5 mgU L⁻¹ for at least 15 days.

The tolerance to U could be linked to the presence of phosphate ion in the nutrient solution. Without this element, beets survived for only 7 days in a solution containing 3.3 mgU·L⁻¹, a weaker concentration than the maximum tolerated (5 mgU L⁻¹) by the beet for 15 days with phosphate present.

The accumulation of U in roots was found to be very high, with a BF average of 4,600. In contrast, no U bio-concentration was detected in the aerial organs (BF < 1).

The restriction of U translocation from root to aerial organs was observed in both the plant species of spontaneous emergence in soils and in the beet cultivated under controlled conditions. In beet, the translocation was slightly increased when phosphate was removed from the nutrient solution. It is probable that the “coiron”, “chil-chil” and beet U tolerance is based on the U exclusion from the aerial organs, where U could interfere with vital physiological processes.

In fact, the evapotranspiration, the relative water content and total chlorophyll content were drastically reduced in beet plants grown in the presence of U. The activity of the ascorbic peroxidase, an enzyme that operates in oxidative stress states, also increased in these conditions. After the beet plants had been exposed to U contamination, its removal from the medium was not sufficient to attain a full recovery of the plants.

The use of the currently studied plant species in programmes of phytoremediation is restricted by the low accumulation of pollutants in their aerial organs, rendering these of little use for soil phytoextraction. However, the high capacity of colonization of polluted soil and the U tolerance of “coirón” and “chilchil” could be employed in the phytostabilization of U-contaminated substrates, thus preventing the dispersion of pollution through wind and water action. Nevertheless, the implementation of beet rhizofiltration systems to clean up U polluted waters appears to be feasible. However, it is still necessary to improve the operational conditions used in the laboratory and to adapt these to an industrial or semi-industrial scale for these procedures to be of general use.

I - INTRODUCCIÓN

1. CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS EN MEDIOS CON ELEVADO CONTENIDO DE METALES PESADOS

El exceso de metales pesados en suelos y agua es uno de los problemas actuales más relevantes por el riesgo de toxicidad que implica su ingreso a las cadenas tróficas.

Los metales pesados son aquellos elementos cuyo peso específico supera los cinco gramos por centímetro cúbico. Constituyen unos dos tercios del total de los elementos químicos (Barceló y Poschenrieder, 1989). A diferencia de otros contaminantes relacionados exclusivamente con la actividad humana como algunos compuestos orgánicos, los metales pesados están presentes en todos los ambientes naturales aunque su abundancia suele ser baja, a nivel de trazas, salvo en áreas muy localizadas. Esta situación implica que los metales pesados intervienen normalmente en reacciones habituales de adsorción, precipitación, solubilización e incorporación a organismos vivos.

Metales como As, Hg, Ag, Cd, Pb y U no tienen una función conocida en el metabolismo de las plantas y son tóxicos a distintas concentraciones. Otros, como Fe, Mo, Mn, Zn o Cu, son micronutrientes esenciales, necesarios en cantidades pequeñas en animales y plantas, especialmente como constituyentes de enzimas y otras proteínas. Pero cuando la concentración en tejido vivo aumenta por encima de ciertos límites, interfieren en las reacciones metabólicas.

En algunos suelos el tipo de mineral predominante involucrado en los procesos pedogenéticos puede determinar elevadas concentraciones de metales pesados. Un caso particular de esta situación son las menas de mineral que pueden ser explotadas comercialmente para su utilización en actividades industriales.

La explotación minera, la fundición de metales, la producción de fertilizantes y agroquímicos, el quemado de combustible y la incorporación de residuos industriales a los suelos son algunas de las actividades que han determinado un aumento localizado de algunos metales pesados, originando focos de contaminación en los suelos por exceso de metales pesados y tóxicos. Las aguas superficiales y subterráneas también se ven afectadas por contaminación directa o por arrastre de partículas y lixiviación.

Las plantas tienen una relación muy estrecha con su entorno. Mientras que los animales y el hombre pueden movilizarse para buscar condiciones favorables para su supervivencia, las plantas se hallan sujetas a un sustrato y espacio

determinado cuyos cambios las afectan directamente (Barceló y Poschenrieder, 1989). Esta misma característica las hace un indicador muy importante de las condiciones ambientales del medio que habitan.

Frente a situaciones anómalas del medio, las plantas presentan síntomas de estrés que pueden ir desde la imposibilidad de supervivencia hasta la adaptación a las condiciones adversas. La capacidad de respuesta varía con el tipo de estrés y con la especie vegetal de que se trate.

1.1. Biodisponibilidad y toxicidad

La biodisponibilidad de los metales pesados varía en los distintos suelos en relación con las propiedades de éstos y las complejas relaciones rizosféricas que incluyen no sólo los intercambios suelo-planta sino también la actividad de microorganismos (Schützendübel y Polle, 2002).

Si bien muchos de los valores guía o límites máximos permisibles de concentración de metales en distintos medios están establecidos en relación a la concentración total de metales en el medio, se considera que la biodisponibilidad y la fitotoxicidad están relacionadas con la concentración de metales en la solución del suelo y con los factores que gobiernan el mantenimiento de esta concentración de metales solubles (Nolan et al., 2005; Walter et al., 2003; Gérard et al., 2000).

Considerando que las plantas absorben los nutrientes y otros elementos directamente de la solución del suelo, es esperable que la biodisponibilidad de los metales dependa en gran medida de su solubilidad. Se ha observado correlación entre la concentración de metales pesados solubles en el suelo y la concentración de los mismos en las plantas, pudiéndose aplicar los conceptos básicos de disponibilidad de nutrientes basados en los parámetros de cantidad, intensidad (actividad o concentración en la solución del suelo) y reposición (Schmidt, 2003). El factor reposición es muy importante ya que la concentración de iones libres en la solución resulta insuficiente para explicar la absorción de los metales por las plantas, interviniendo la fase sólida en su disponibilidad (Gérard et al., 2000). La adsorción de los metales en las partículas de suelo y los fenómenos de intercambio regulan la partición de los metales entre la fase sólida y la fase solución, interviniendo, en la reposición de la concentración de metales solubles en la solución del suelo.

La composición mineralógica, las variaciones en el contenido de materia orgánica, la capacidad de intercambio catiónico, el pH del suelo, el estado de oxidación y los otros iones acompañantes determinan la solubilidad de los metales en la solución del suelo y la capacidad de adsorción de los metales pesados en la fase sólida.

La materia orgánica y los minerales conteniendo óxidos de hierro, aluminio y manganeso son sitios de adsorción que sustraen a los metales pesados de la solución del suelo. Al mismo tiempo los cationes metálicos pueden formar precipitados relativamente insolubles con fosfatos y otros componentes aniónicos del suelo. Los procesos de precipitación y adsorción son dependientes del pH, aumentando la adsorción a medida que aumenta el pH (Basta et al., 2005). Por este motivo, en general, los metales se encuentran más accesibles para ser absorbidos por las plantas en suelos o medios de cultivo ácidos. Sin embargo, la concentración en la solución del suelo y su reposición no son los únicos factores que intervienen en la absorción de los metales en las plantas, ya que éstos podrían ser absorbidos también como iones hidratados y como complejos formados con quelantes (Clemens et al., 2002).

Las mismas plantas pueden ejercer influencia sobre la biodisponibilidad de los metales a partir de procesos que modifican el pH del medio (Hammer y Keller, 2002), como la liberación de exudados (acomplejantes, ácidos orgánicos y aminoácidos), la liberación de CO₂ proveniente de la respiración de las raíces y, predominantemente, por la excreción neta de H⁺ o HCO₃⁻ relacionada con el balance de cationes/aniones disponibles y absorbidos por las raíces (Marschner, 1993).

En la rizosfera se puede producir, también, un descenso del potencial redox debido a la actividad de microorganismos (por ejemplo: consumo de O₂ por respiración) o a condiciones circunstanciales o permanentes de anegamiento. Este descenso del potencial redox reduce la disponibilidad de ciertos nutrientes, en particular ciertos metales que presentan más de un estado de oxidación con distinta solubilidad.

Muchos de los mecanismos inducidos por las plantas para modificar el entorno de la rizosfera constituyen estrategias para asegurarse la provisión de nutrientes esenciales que se encuentran a nivel de trazas en el medio o cuya solubilidad está disminuida por condiciones específicas del medio. Metales como Cu, Co, Fe, Mo, Ni y Zn se encuentran entre estos elementos.

La toxicidad o efectos adversos provocados por los metales pesados dependen del contaminante considerado y del organismo blanco o cuerpo receptor. Teniendo en cuenta que los metales pueden acumularse biológicamente y biomagnificarse, el riesgo de toxicidad puede aumentar en niveles tróficos superiores (Ahluwalia y Goyal, 2007).

La incorporación de sustancias fitotóxicas a las plantas está relacionada con los mecanismos desarrollados por cada especie vegetal para su exclusión o tolerancia y con la disponibilidad del tóxico en el medio. Un elemento potencialmente tóxico se constituye en un riesgo mayor cuando se encuentra en una forma biodisponible.

La conocida curva que relaciona el crecimiento o producción de materia seca con la provisión de nutrientes es también aplicable para aquellos metales pesados que son micronutrientes esenciales (Figura 1), pero con un umbral de toxicidad más bajo que los observados para macronutrientes como N y P. Los metales pesados sin función metabólica (no esenciales) no provocan respuesta en el crecimiento cuando su concentración en el medio es baja, pero cuando la concentración aumenta los síntomas de toxicidad aparecen, disminuyendo el crecimiento de la planta. Los umbrales de tolerancia y toxicidad para elementos esenciales y no esenciales no coinciden necesariamente como se muestra en la Figura 1 sino que puede haber un desplazamiento hacia la izquierda (concentraciones más bajas en el medio) en los casos de metales pesados no esenciales altamente tóxicos.

El efecto amortiguador del suelo debido a los procesos de adsorción, intercambio, y posibles precipitaciones en la disponibilidad de los metales pesados se mantiene en zonas costeras o en aguas someras donde los sedimentos ejercen influencia sobre el balance de metales solubles, pero desaparece en medios acuáticos puros. En medio acuático, la disponibilidad de los metales pesados para las plantas estará fuertemente influenciada por la solubilidad del metal pesado en sí mismo, pero también por la combinación y concentración de los otros elementos químicos acompañantes y por las restricciones impuestas al crecimiento de las raíces en este medio, especialmente en el caso de plantas originariamente terrestres.

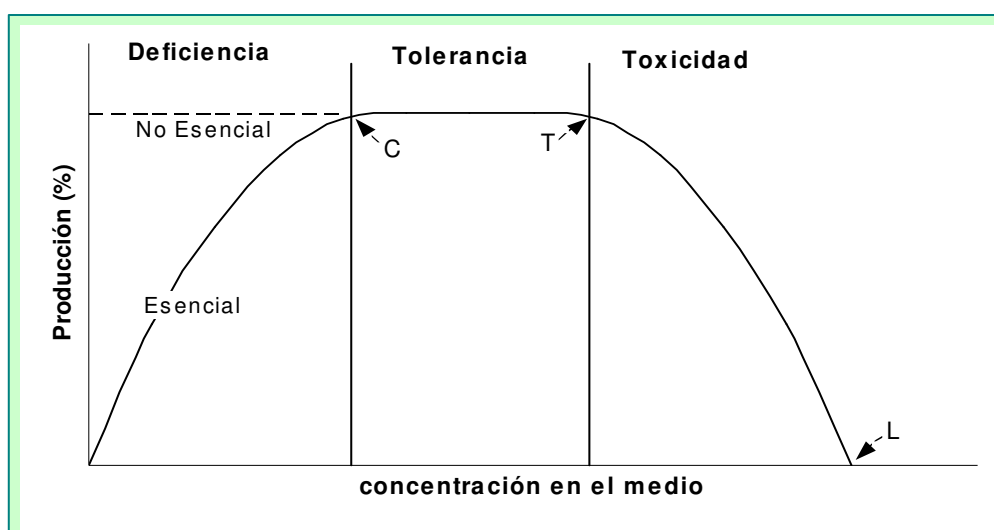


Figura 1 - Curva de respuesta a la concentración de elementos esenciales y no esenciales en el medio de crecimiento de las plantas. C: punto crítico de deficiencia para elementos esenciales; T: umbral de toxicidad y L: toxicidad letal. Modificado a partir de Berry y Wallace (1981) y Hagemeyer (2004).

Ligado a las nociones de biodisponibilidad y toxicidad se encuentra el concepto de transferencia de los metales pesados a las plantas y partir de ellas a la cadena trófica. El coeficiente de transferencia (Vera Tomé et al., 2003; Keller et al., 2003); la relación de concentraciones (Martínez-Aguirre et al., 1997); el coeficiente de bioacumulación (Soriano y Fereres, 2003); el factor de transferencia suelo-planta (Dushenkov, 2003) son distintas denominaciones para un mismo parámetro que relaciona la concentración del contaminante en el tejido vegetal con la concentración del mismo en el medio (concentración en tejido / concentración en sustrato). Esta relación ha sido utilizada tanto en trabajos sobre potencial toxicidad de los metales pesados para predecir o explicar la posible incorporación a la cadena trófica, como en estudios sobre tolerancia, acumulación y fitorremediación para evaluar la capacidad de las plantas en la acumulación y secuestro del contaminante.

1.2. Efectos sobre el metabolismo y los indicadores de estrés de las plantas

Los síntomas de toxicidad observados en plantas en presencia de cantidades excesivas de metales pesados están relacionados con una serie de interacciones a nivel celular y molecular (Hall, 2002), que se visualizan a nivel tisular o general de la planta.

A nivel macroscópico algunos de los síntomas detectados son: reducción del crecimiento de la planta, tanto de parte aérea como raíz, reducción en el número de hojas y del área foliar, reducción en la producción de semillas y biomasa, necrosis o marchitamiento de hojas. Estos cambios en el aspecto general de la planta responden a cambios metabólicos y/o estructurales inducidos por los metales pesados.

Las alteraciones metabólicas registradas están relacionadas con la capacidad de los metales para ligarse a los grupos sulfhidrilos de las proteínas, inhibiendo su actividad o rompiendo su estructura, la inducción de carencias nutricionales, el desbalance hídrico, efectos adversos sobre la fotosíntesis y daños en las funciones de la membrana plasmática.

La inducción de síntomas de carencia de nutrientes se debe tanto al desplazamiento en la absorción y funciones metabólicas de elementos esenciales (Hall, 2002; Schützendübel y Polle, 2002) como al efecto tóxico de los metales pesados sobre la membrana plasmática que al dañarse puede dejar salir nutrientes. En arroz, la presencia de Cd^{2+} aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática, induciendo el eflujo de K^+ de las raíces (Llamas et al., 2000), así como también ocurre con el exceso de Cu en otras especies (Hall, 2002).

La fotosíntesis se ve afectada por la presencia de metales pesados (Costa y Spitz, 1997; Singh y Agrawal, 2007) tanto por cambios estructurales como desorganización de los tilacoides en los cloroplastos (Sandalio et al., 2001).

Los pigmentos fotosintéticos, clorofila *a* y *b* disminuyen fuertemente en presencia de Cr (Shanker et al., 2005; Singh y Agrawal, 2007), Pb, Cd, Zn, Cu (Pandey y Sharma, 2002; Singh y Agrawal, 2007), Co y Ni (Pandey y Sharma, 2002). Estos últimos autores relacionaron la baja concentración de clorofila *a* y *b* con una reducción en su síntesis debido a la deficiencia de Fe inducida por los metales pesados, que interfieren en la absorción de Fe. Los carotenoides también se reducen aunque, en general, en menor medida, observándose en algunos casos un aumento en la relación de carotenoides / clorofila *a* y *b*, como parte de la estrategia de defensa frente al estrés provocado por el exceso de metales pesados (Singh y Agrawal, 2007).

Los metales pesados también inducen alteraciones en el balance del agua en las plantas, observándose síntomas de estrés hídrico aun en condiciones adecuadas de disponibilidad de agua. En la mayoría de los casos se ha reportado una

disminución de la tasa de evapotranspiración atribuida al cierre de estomas, inhibición de la absorción de agua por bloqueo de los canales de agua, bloqueo de aquaporinas y otros; pero también se han observado aumentos en la tasa de transpiración en algunos casos (Menon et al., 2005). El contenido hídrico relativo de las hojas se ve disminuida por la presencia de distintos metales, como Cd (Poschenreider et al., 1989) y Ni (Llamas, 2005).

El efecto en la resistencia estomática puede variar con la concentración de contaminante y el tiempo de exposición al mismo. El cadmio, por ejemplo, produce un incremento de resistencia estomática sin cambios en la turgencia de las hojas cuando el tiempo de exposición es corto, pero a medida que aumenta el tiempo de exposición se produce daño en el mecanismo de absorción de agua por degeneración de las células apicales de la raíz e incremento en el nivel de ácido abscísico que lleva al cierre de estomas. Si se prolonga la exposición a concentraciones elevadas de Cd, se produce marchitamiento y cierre hidropasivo de los estomas (Poschenreider et al., 1989; Pai et al., 2006).

Una de las consecuencias de la exposición a estrés biótico o abiótico es un incremento de las especies reactivas de oxígeno (como el radical superóxido O_2^- , el radical hidroxilo OH^\cdot y el peróxido de hidrógeno H_2O_2), intermediarias en las reducciones sucesivas de O_2 a H_2O . Las especies reactivas de oxígeno provocan oxidación inespecífica de proteínas y lípidos de membrana y daño en el ADN. Durante mucho tiempo se consideró a estas especies reactivas del oxígeno solamente como moléculas dañinas y peligrosas. En la actualidad hay evidencias de su función en el sistema de defensa a patógenos y en ciertas etapas del desarrollo, actuando también como moléculas señal intermediarias en la regulación de la expresión de genes (Schützendübel y Polle, 2002).

El control de los niveles de especies reactivas del oxígeno está ejercido por un sistema de defensa compuesto por metabolitos antioxidantes como ascorbato, glutatión, tocoferol y por enzimas como superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasa.

La producción de superóxido, O_2^- , aumenta cuando se producen situaciones donde la tasa de generación de fotorreductores en los tilacoides supera el nivel requerido para la reducción de CO_2 , cuando la concentración de CO_2 es baja y alta la intensidad lumínica (Asada, 1984). La superóxido dismutasa (SOD) es una metalo-proteína que puede presentarse en distintas especies vegetales asociada a

distintos metales formando diferentes isoenzimas: Mn-SOD; Cu/Zn-SOD; y Fe-SOD, y cataliza la conversión de superóxido a peróxido de hidrógeno.

El exceso de peróxido de hidrógeno, cuya acumulación es aún más dañina que la del radical superóxido, es eliminado por acción de dos tipos de enzimas: la catalasa (CAT) y la ascorbato peroxidasa (APX), que promueven la transformación del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno elemental.

En situaciones de estrés, la acumulación de especies reactivas del oxígeno se inicia a partir del aumento del ácido abscísico inducido por el estrés, que a su vez lleva al cierre de estomas y a un ingreso limitado de CO₂ que disminuye la eficiencia de la fotosíntesis (Schützendübel y Polle, 2002; Arbona et al., 2003). La exposición a metales pesados provoca una respuesta importante del sistema antioxidante pero la dirección de la respuesta no es unívoca. Se han observado tanto incrementos como disminución de la actividad enzimática de enzimas antioxidantes, dependiendo no solo del metal considerado sino de la especie vegetal, el tejido afectado y la intensidad del estrés (Schützendübel y Polle, 2002). Por ejemplo, en arveja (guisante) (*Pisum sativum* L.), la presencia de Cd²⁺ puede provocar tanto disminución (Sandalio et al., 2001), como aumento (Dixit et al., 2001) de la actividad enzimática de superóxido dismutasa y catalasa, variando en estas experiencias la variedad de arveja estudiada y el tiempo de exposición al contaminante.

1.3. Mecanismos de tolerancia

La tolerancia a metales pesados en plantas puede ser definida como la capacidad de sobrevivir en un medio tóxico para otras plantas, continuando con el desarrollo ontogénico y las distintas funciones metabólicas con normalidad. Sin embargo, el término tolerancia se utiliza frecuentemente en la literatura para referirse también a los cambios observados experimentalmente como respuesta a la presencia de los metales pesados (Hall, 2002).

Las estrategias de tolerancia conocidas están relacionadas fundamentalmente con la necesidad de evitar las concentraciones elevadas de metales pesados en sitios sensibles, tanto a nivel planta entera como a nivel celular. Los mecanismos de exclusión son los más difundidos en las especies tolerantes a metales pesados.

Como ya se mencionó anteriormente, ciertos ácidos orgánicos y otros compuestos orgánicos de bajo peso molecular, exudados por las raíces, son

capaces de aumentar la disponibilidad de nutrientes, incluyendo metales esenciales, de baja solubilidad en la solución del suelo, como por ejemplo Fe y Mn (Marschner, 1993). Asimismo, los exudados de las raíces intervienen en la tolerancia a los metales pesados, actuando como quelantes o acomplejantes de los mismos, limitando su disponibilidad inmediata (Hall, 2002).

La exposición de la raíz desnuda a los metales pesados estaría restringida a unos pocos milímetros en la punta de las raíces jóvenes. Dentro del córtex los metales se mueven en el apoplasto en razón de su concentración en el espacio intercelular y de la capacidad de retención de la pared celular.

La función de la pared celular como sitio de adsorción, y por lo tanto retención, de los metales pesados está vinculada con sus propiedades de intercambiador de iones de relativa baja afinidad y baja selectividad (Clemens et al., 2002). La pared celular de la mayoría de las plantas, algas y microorganismos está compuesta por polisacáridos y carbohidratos que le confieren una carga superficial negativa, que pueden atraer a los cationes formados por metales como Zn, Cu, Al, y U. La retención en la pared celular es un mecanismo inespecífico, con una capacidad limitada de adsorción, definida por los sitios de adsorción disponibles (Hall, 2002). Por lo tanto, la pared celular podría retener sólo una cierta cantidad de moléculas de un determinado metal en función de los sitios de adsorción, la superficie expuesta y la competencia por estos sitios ejercida por otros iones y/o metales presentes en el medio.

La membrana plasmática puede ser considerada la primera estructura viva afectada por la toxicidad de los metales pesados y que debe ser traspasada para entrar al interior celular. Se han descrito sistemas de transporte tanto activo como pasivo. Teniendo en cuenta que el potencial de membrana puede alcanzar -200 mV en las células epidérmicas de la raíz, los metales, en su condición de iones catiónicos, podrían ingresar a través de transportadores secundarios como canales de proteínas y/o transportadores acoplados H⁺-proteínas (Clemens et al., 2002). Recientemente se han aislado distintos tipos de transportadores de membrana con distinta afinidad por metales, actuando en consecuencia en su absorción y el mantenimiento de niveles compatibles con el funcionamiento celular. Varios transportadores de cationes, pertenecientes a las familias ZIP y Nramp (del inglés "natural resistance-associated macrophage protein"), involucrados en la absorción de micronutrientes y, en consecuencia, en la incorporación de metales como Zn, Fe y Mn, parecen admitir un amplio rango de sustratos, permitiendo la entrada de

metales sin función metabólica conocida, como el Cd (Clemens et al., 2002; Kochian et al., 2002).

La planta tiene mecanismos para dificultar la entrada del contaminante a su interior, como un incremento de la resistencia de la membrana o la inhibición del mecanismo de absorción activa como ocurre en presencia de Zn (Barceló y Poschenrieder, 1989). El aumento de la resistencia plasmática y los mecanismos de reparación de la membrana estarían relacionados con un aumento de proteínas de choque térmico, como se ha visto en cultivo de células de *Lycopersicon peruvianum* en medio con Cd y en *Enteromorpha intestinalis* después de exposición a Cu (Hall, 2002).

El eflujo activo de iones metálicos a través de transportadores de tipo P-ATPasas o cation/H⁺ antiporters ha sido estudiado en bacterias y en células animales. Es posible la existencia de una estrategia similar en plantas superiores (Hall, 2002).

A pesar de que, como se ha mencionado, los mecanismos de exclusión son los más difundidos, hay plantas que permiten la incorporación de los metales pesados, acumulándolos en su interior, pero desarrollando mecanismos que los aíslan y evitan su interferencia en el metabolismo celular.

Una vez ingresados al interior celular de las raíces, los metales pesados pueden ser almacenados en la vacuola o transportados hacia la parte aérea. El secuestro de los metales pesados en las vacuolas de las raíces es un mecanismo que permite el aislamiento del contaminante y evita su traslado hacia la parte aérea. En general en la mayoría de las plantas y para la mayoría de los metales pesados, existe una fuerte restricción al transporte hacia la parte aérea. En caso de que se produzca, el transporte se realiza primariamente por el xilema. El ingreso al xilema está mediado por transportadores de membrana y en muchos casos el movimiento de los metales acompaña el flujo ascendente provocado por la transpiración.

La acumulación de metales en la parte aérea es frecuente en plantas que crecen naturalmente en suelos metalíferos (Baker, 1981). En estos casos la acumulación de metales podría ayudar a la protección contra insectos herbívoros, bacterias o virus (Poschenrieder et al., 2006).

Las plantas en las cuales la concentración de metales en la parte aérea puede superar ciertos límites (1% para Zn, Mn; 0,1% para Ni, Co, Cr, Cu, Pb, Al;

0,01% para Cd y Se), sin presentar síntomas visibles de toxicidad, se denominan hiperacumuladoras (Baker y Brooks, 1989).

Las plantas que acumulan metales en su parte aérea durante un período de tiempo prolongado poseen mecanismos eficientes para detoxificar el metal incorporado o para aislarlos de modo que no interfieran con las funciones metabólicas. Estos mecanismos incluyen la formación de quelatos, biotransformación y compartimentación del metal y mecanismos de reparación de la membrana celular (Salt et al., 1998).

La formación de quelatos de metales en el citosol está vinculada a la presencia en el citoplasma celular de compuestos con alta afinidad por los metales pesados que pueden ligarse a los mismos, secuestrándolos y evitando así su interferencia con el metabolismo celular. Estos potenciales ligantes incluyen algunos aminoácidos, ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido málico, histidina) y dos clases de péptidos ricos en cisteína: las fitoquelatinas y las metaltioninas. La quelación con fitoquelatinas y metaltioninas estaría relacionada con el desvío de los metales hacia vacuolas y su secuestro en raíz, mientras que ligandos como histidinas y citratos parecen estar relacionados con la conducción de los metales hacia el xilema (Clemens et al., 2002), comportándose como facilitadores o acompañantes de los metales pesados e incrementando su translocación hacia la parte aérea.

El movimiento ascendente de los cationes metálicos por el xilema se ve dificultado por la alta capacidad de intercambio catiónica de las paredes celulares del xilema. Por ese motivo, complejos metal-quelante no catiónicos como Cd-citrato y Cu-histidina (Salt et al., 1998) o Ni-histidina (Kramer et al., 1996) facilitarían la llegada de los metales pesados hacia la parte aérea.

Las fitoquelatinas, denominadas por algunos autores como metaltioninas clase III (Rauser, 1990; Cobbett, 2000; Perales-Vela et al., 2006), están constituidas por cadenas cortas de péptidos con la estructura básica $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gli}$, donde n puede tomar valores entre 2 y 11. Su síntesis está mediada por la enzima fitoquelatina sintasa, mientras que las metaltioninas presentes en plantas (metaltioninas clase II) son proteínas codificadas directamente por genes. Las áreas de competencia de fitoquelatinas y metaltioninas en plantas y el motivo de la presencia de uno u otro compuesto no está claro todavía pero podría vincularse a la edad de las plantas, la sensibilidad diferencial a los metales pesados de algunas enzimas vinculadas con la síntesis de glutatión (GSH) o a la característica de esencialidad o no esencialidad de los metales (Perales-Vela et al., 2006).

La síntesis de fitoquelatinas estaría inducida no solo por la presencia de metales pesados, especialmente de Cd, sino también por niveles intracelulares altos de GSH, a partir de cuyas moléculas se sintetizan las fitoquelatinas. Teniendo en cuenta que la biosíntesis de GSH es estimulada por la presencia de especies reactivas del oxígeno como H_2O_2 , es posible que las fitoquelatinas cumplan alguna función importante en la mitigación del estrés oxidativo provocado por los metales pesados (Hirata et al., 2005), además de acomplejar los metales pesados y facilitar su traslado hacia las vacuolas.

Las micorrizas, tanto ectomicorrizas como endomicorrizas vesículo arbusculares, han sido estudiadas en relación a incrementos en la tolerancia a metales pesados, obteniéndose distintos resultados, pero quedando poco claro hasta el momento el modo de acción (Hall, 2002; Schützendübel y Polle, 2002; Shanker et al., 2005). En general, la presencia de micorrizas resulta en una mayor exclusión de los metales pesados, pero en algunos casos se ha observado un aumento en la absorción de metales pesados. En una experiencia con suelos contaminados con U y As, Chen et al. (2006) observaron que la colonización de las raíces del helecho *Pteris vittata* L. por diferentes micorrizas arbusculares provocaba el aumento de la concentración de U en las raíces del helecho pero la concentración de As se mantenía sin diferencias significativas con respecto al helecho no micorrizado. Por otra parte, Ruffykiri et al. (2004) no encontraron diferencias significativas en la concentración de U en raíces de trébol inoculado con el hongo micorrízico *Glomus intraradices*, pero la concentración en la parte aérea de las plantas micorrizadas era menor que en las plantas no micorrizadas, indicando una retención del contaminante en las raíces incrementada por la presencia de las micorrizas.

Gran parte de los conocimientos actuales sobre tolerancia a metales pesados se han desarrollado con el objetivo de diseñar metodologías de remediación. La tolerancia a los metales pesados y el crecimiento rápido de una gran biomasa son requisitos clave para poder utilizar una especie vegetal en remediación. Actualmente, a través de ingeniería genética se han obtenido distintas plantas transgénicas, con mayor capacidad de tolerancia y acumulación de metales pesados. La mayoría de las plantas transgénicas obtenidas sobreexpresan genes involucrados en la biosíntesis de proteínas y péptidos ligandos de metales pesados o genes involucrados en la conversión de los iones tóxicos a formas menos tóxicas (Tong et al., 2004).

Para visualizar lo discutido en esta sección, en la Figura 2 se han resumido los distintos mecanismos a nivel celular que intervienen en la detoxificación y tolerancia a metales pesados en plantas superiores.

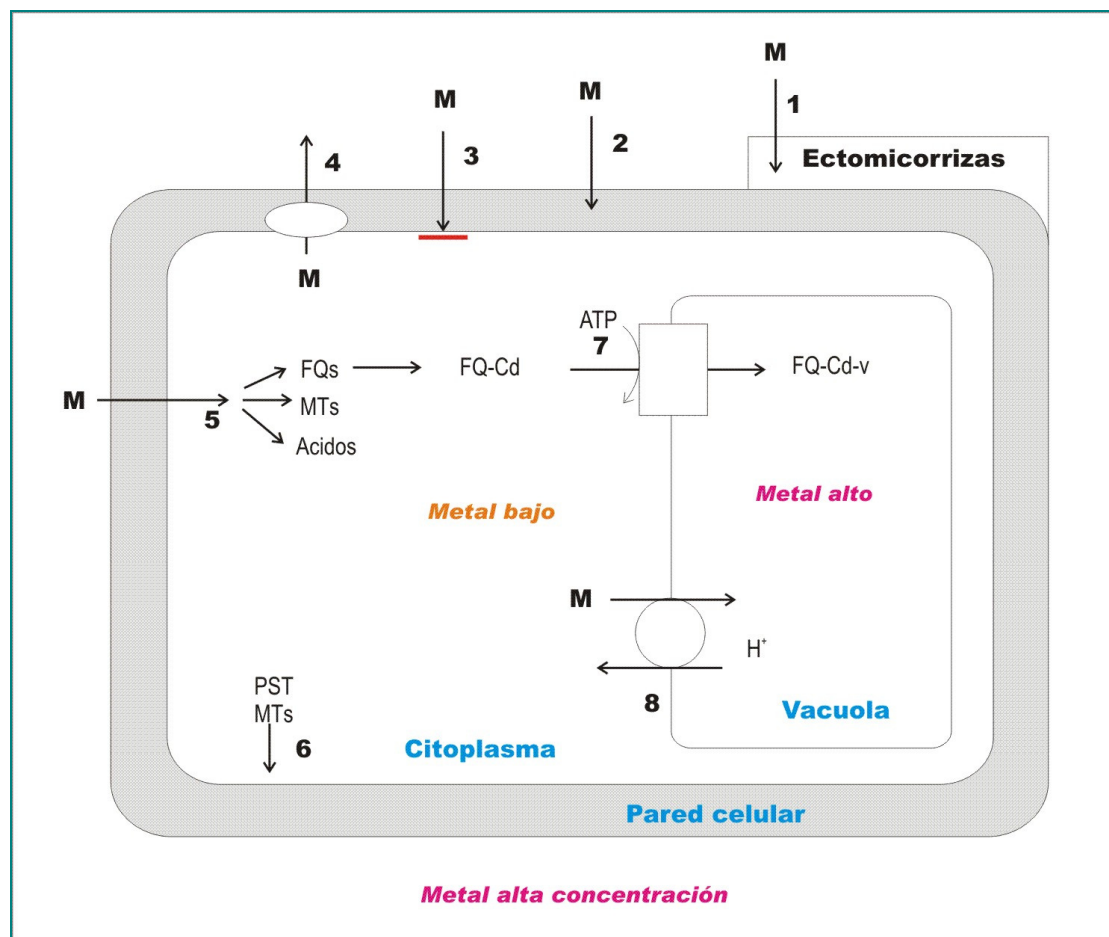


Figura 2 - Mecanismos a nivel celular para la detoxificación y tolerancia a metales pesados en plantas superiores. Adaptado y traducido de Hall (2002).

1. Restricción al movimiento hacia raíces por presencia de micorrizas
2. Ligamiento a la pared celular y a los exudados de la raíz
3. Influjos reducidos a través de la membrana plasmática
4. Eflujo activo hacia el apoplasto
5. Formación de quelatos en el citoplasma (FQ: fitoquelatinas; MT: metalotioninas)
6. Reparación y protección de la membrana plasmática en condiciones de estrés (PST: proteínas de choque térmico; MT: metalotioninas)
7. Transporte de complejos fitoquelatinas-metal hacia vacuola ejemplificado con el transporte de cadmio (Cd)
8. Transporte y acumulación de metales en vacuola

2. EL CASO DEL URANIO

El uranio (U) presenta 3 isótopos naturales radiactivos (^{238}U , ^{235}U y ^{234}U), pero el ^{238}U es el más abundante con una abundancia isotópica de 99,27 %. Es un elemento oxifilo, con gran avidez por el oxígeno, y se lo encuentra en combinación con este último elemento, formando óxidos, complejos de hidróxidos, fosfatos, carbonatos, silicatos, etc. Presenta tres estados de oxidación: U^{+4} ; U^{+5} y U^{+6} , predominando el primero y el último (Gamba, 2002), dado que la formación de U^{+5} se ha observado en estudios de laboratorio pero no tiene estabilidad ni juega un papel importante en medios naturales (Kalin et al., 2005).

El U es un constituyente natural de todos los suelos y la mayoría de las aguas naturales, pero se encuentra en mayor concentración en algunas rocas y minerales, que pueden ser explotados para obtener concentrados de U utilizables en la generación de energía. También se encuentra en distintas formaciones geológicas que dan lugar a explotaciones de otros minerales. El U forma parte de más de 160 minerales que representan el 5 % de todos los minerales conocidos (Kalin et al., 2005). Las rocas fosfóricas utilizadas como materia prima para fertilizantes suelen contener distintos metales pesados (Giuffré de López Camelo et al., 1997) y, en particular, U (Burnett et al., 1996). En consecuencia, los fertilizantes fosfatados pueden tener niveles variables de U (Romero Guzmán et al., 2002; Bonetto, 2006) que son incorporados al suelo con la fertilización.

En suelos en condiciones aeróbicas el U se presenta en el estado de oxidación +VI. Su disponibilidad para las plantas varía en relación con la composición mineralógica, el pH, el estado de oxidación y los otros elementos presentes en el medio.

La solubilidad del U en soluciones de composición química determinada se ha estudiado utilizando distintos modelos de computación y se ha observado que a pH ácidos, menores a 5, el U se encuentra como catión uranilo libre (UO_2^{2+}), en estado de oxidación +VI. A pH neutro se forman hidroxicomplejos de U, mientras que en condiciones alcalinas predominan los carbonatos de U, de alta solubilidad.

En los suelos, el U forma complejos con fosfatos, sulfatos, carbonatos e hidróxidos que favorecen la solubilidad total del U en el medio (Shahandeh y Hossner, 2002). Duquène et al. (2006) encontraron una correlación significativa entre los factores de transferencia del suelo hacia la parte aérea de la planta y la concentración de U en solución, ya sea como ión uranilo o complejos carbonato-U.

En presencia de fósforo (P), se forman complejos de U y P, de la forma $UO_2(HPO_4)_2^{2-}$, muy estables en un rango amplio de pH, entre 4 y 9 (Ebbs et al., 1998; Laroche et al., 2005). Ebbs et al. (1998) considera que la formación de complejos U-P disminuyen la biodisponibilidad del U. Varios estudios han demostrado que el agregado de P, en distintas formas químicas, puede inmovilizar y precipitar el U (Seaman et al., 2001). Sin embargo, a pesar de su escasa solubilidad, los complejos de U y P también contribuirían al U biodisponible (Laroche et al., 2005; Duquène et al., 2006), probablemente por su intervención en la reposición de los cationes uranilo en solución, consumidos por las plantas (Laroche et al., 2005). La reposición de la concentración de metales en la solución del suelo está vinculada con los mecanismos de adsorción, desorción e intercambio.

En suelos aireados, con condiciones oxidantes, el U es adsorbido rápidamente (incluyendo fenómenos de adsorción superficial y precipitación) por la fase sólida del suelo. La adsorción del U aumenta con el aumento del pH del suelo, por el aumento de cargas negativas superficiales sobre la caolinita y la materia orgánica (Willet y Bond, 1995).

En sedimentos con bajo contenido de materia orgánica se ha observado una mayor concentración de U asociada a partículas de menor tamaño, es decir, arcillas y limos (Sowder et al., 2003). En presencia de materia orgánica, la distribución del U y su disponibilidad para las plantas está asociada a la fracción orgánica del suelo (Sowder et al., 2003; Morton et al., 2001).

2.1. Absorción del uranio por las plantas

Como cualquier elemento químico presente en el suelo y en el agua, el U es absorbido normalmente por las plantas pero en cantidades muy pequeñas, y, por lo tanto, es un constituyente normal de los tejidos vegetales a nivel de trazas.

Los primeros trabajos sobre absorción de U por las plantas buscaban estudiar la utilización de algunas plantas como indicadoras de manifestaciones de minerales de U en prospección minera (Pande et al., 1993) y describen la distribución del U absorbido por plantas nativas en zonas con alta concentración natural de U (Moffet y Tellier, 1977; Pande et al., 1993; Saric et al., 1995).

Con el aumento de la preocupación por la remediación de zonas afectadas por residuos de U, se comenzaron a registrar algunos trabajos sobre condiciones o cambios en los sustratos que favorecen la absorción de U en plantas cultivadas, ya

sea en suelos contaminados o en hidroponía, haciendo énfasis en los riesgos de transferencia a la cadena trófica (Vera Tomé et al., 2003) o en la posible utilización de plantas acumuladoras de U en fitorremediación (Huang et al., 1998).

Los suelos de áreas con manifestaciones uraníferas naturales tienen, en muchos casos, condiciones de alcalinidad y aridez que dificultan por sí mismas el crecimiento de vegetales. Sin embargo, no están despobladas de vegetación. Un análisis de la tolerancia a la presencia de U y de la capacidad acumuladora de las plantas nativas de estas áreas puede ser importante para su utilización en tareas de remediación.

La forma de U absorbida por las plantas con mayor facilidad es el catión uranilo libre, predominante a pH 5 – 5,5 (Ebbs et al., 1998). Sin embargo, a otros pHs las plantas pueden absorber igualmente U, aunque el mismo se encuentre menos disponible. Laroche et al. (2005) observaron que *Phaseolus vulgaris* absorbía U de las formas predominantes a diferentes pHs sin distinción relevante y alcanzando valores similares de acumulación de U en plantas a los distintos pHs. Comparando la absorción de distintas especies en suelos ácidos y suelos alcalinos, Shahandeh y Hossner (2002) y Duquène et al. (2006) observaron una acumulación de U en hojas y raíces relativamente mayor en los suelos alcalinos con respecto a los ácidos, atribuyendo este hecho a la presencia de complejos de carbonato de uranilo altamente solubles en los suelos de pH alto.

Dos aspectos destacados en distintos trabajos sobre absorción de U por las plantas son: 1) la posible dependencia de absorción de U con el pH del medio, ya comentada y 2) la acumulación diferencial de U en las raíces con respecto a la parte aérea. El U queda retenido en las raíces y transloca muy poco hacia la parte aérea tanto en cultivos hidropónicos como en suelos (Sela et al., 1988; Ebbs et al., 1998; Tyler y Olson, 2001; Singh et al., 2005).

La adsorción de los metales pesados en la pared celular es una de las formas de retención de elementos tóxicos que podría estar actuando, evitando la entrada a la planta y por lo tanto la translocación a la parte aérea. Sin embargo, Sela et al. (1988), mediante microanálisis con rayos X en *Azolla filiculoides* expuesta a una concentración de U de 10 ppm, demostraron que la acumulación de U era significativamente mayor dentro del citoplasma que en la pared celular.

La concentración de U en la parte aérea de plantas cultivadas en suelo se ve aumentada cuando se adiciona ácido cítrico al suelo (Huang et al., 1998; Ebbs et al.,

1998). Otros compuestos capaces de formar complejos como HEDTA han sido probados pero resultaron menos efectivos en el aumento de la absorción de U.

Recientemente, distintos estudios han mostrado el papel de las micorrizas en la adaptación de las plantas a los metales pesados (Schützendübel y Polle, 2002) y en particular al U (Rufyikiri et al., 2004; Chen et al., 2006). Las micorrizas vesículo arbusculares promueven la inmovilización de U en las raíces y reducen la translocación del U hacia la parte aérea (Rufyikiri et al., 2004; Chen et al., 2005b).

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una de las plantas más estudiada en relación a su acumulación, tolerancia al U y potencial uso en rizofiltración (Dushenkov et al., 1997; Shahardeh y Hossner, 2002; Singh et al., 2005; Blanco Rodríguez et al., 2006). La acumulación de U en girasol se produce fundamentalmente en la raíz donde el factor de bioacumulación en relación a la concentración de U en el agua puede alcanzar a 30.000 (Dushenkov, 2003).

La remolacha (*Beta vulgaris*) es otra de las especies vegetales mencionadas por su capacidad de sobrevivir en medios con U y acumular este elemento en suelos y en cultivos hidropónicos (Ebbs et al., 1998; Shahardeh y Hossner, 2002).

En la Tabla 1 se mencionan algunos de los trabajos recientes sobre distintos aspectos de la dinámica del U en la relación suelo-planta y los efectos fisiológicos y/o bioquímicos que causa la presencia de U en distintas especies vegetales.

2.2. Cambios metabólicos provocados por la presencia de Uranio en plantas superiores

Hasta el momento existe poca información sobre los cambios a nivel celular o molecular debidos a la presencia de U en las plantas o en el medio de cultivo.

La respuesta al estrés oxidativo en plantas expuestas a U y Cd fue estudiado por Vandehove et al. (2006), observándose una estimulación, aunque no significativa, de la actividad enzimática (glutathion reductasa, guaiacol peroxidasa, superóxido dismutasa) en las raíces de *Phaseolus vulgaris* a medida que aumentaba la concentración de los contaminantes. Sin embargo, las raíces expuestas a 1.000 μM U mostraron una reducción significativa en la actividad enzimática.

Tabla 1 - Algunos trabajos publicados sobre distintos aspectos de la relación uranio–especies vegetales.

Especie vegetal	Tema	Condiciones de cultivo	Referencia
<i>Azolla filiculoides</i>	Localización de U en tejido de raíz y hojas	Hidroponía	Sela et al., 1988
<i>Helianthus annuus</i>	Transferencia sustrato-planta	Hidroponía	Blanco Rodríguez et al., 2006
<i>Zea mays, Brassica juncea, Triticum aestivum, Pisum sativa, Lolium perenne</i>		Suelo-macetas	Duquène et al., 2006
Pasturas		Suelo mina - campo	Vera Tomé et al., 2003
<i>Spartina densiflora</i>		Suelo - campo	Martínez-Aguirre et al., 1997
<i>Medicago truncatula</i>		Efecto de micorrizas en la absorción, translocación y acumulación de U	Suelo-arena, en macetas
<i>Hordeum vulgare</i>	Chen et al., 2005b		
<i>Trifolium subterraneum</i>	Suelo en macetas		Rufiyikiri et al., 2004
<i>Pteris vittata</i>			Chen et al., 2006
<i>Agropyron elongatum</i> <i>Larrea sp.</i>	Transporte vertical de U en relación a cobertura vegetal y agregado de biomasa vegetal (<i>Larrea sp.</i>) seca como enmienda	Suelo-columnas	Bonetto, 2006 Bonetto et al., 2006
<i>Helianthus annuus</i> <i>Hibiscus esculentus,</i> <i>Lycopersicon esculentum,</i> <i>Capsicum annus,</i> <i>Raphanus sativus</i>	Concentración de U en distintas partes de las plantas expuestas a niveles contaminantes de U	Suelo-macetas	Singh et al., 2005
<i>Helianthus annuus</i> <i>Brassica juncea</i> <i>Brassica napus,</i> <i>Brassica chinensis</i>	Efecto del ácido cítrico sobre la absorción de U	Suelo-macetas	Chang et al., 2005
<i>Brassica juncea;</i> <i>Brassica chinensis</i>			Huang et al., 1998
<i>Pisum sativum</i> <i>Beta vulgaris</i> <i>Phaseolus acutifolius</i> y otras	Efecto del pH, P y quelantes sobre la absorción de U	Suelo-macetas hidroponía	Ebbs et al., 1998
<i>Trifolium subterraneum</i> <i>Hordeum vulgare</i>	Efecto del P sobre la absorción de U	Suelo en macetas	Rufiyikiri et al., 2006

Especie vegetal	Tema	Condiciones de cultivo	Referencia
<i>Helianthus annuus</i>	Efecto del U sobre el crecimiento y parámetros bioquímicos	Colas de minería-suelo en macetas	Jagetiya y Purohit, 2006
<i>Brassica juncea</i> <i>Helianthus annuus</i> <i>Beta vulgaris</i> <i>Brassica napus</i> , <i>B. oleracea</i> , <i>Zea mays</i> y otras	Acumulación y tolerancia a U en suelos con distintas propiedades	Suelo-macetas	Shahandeh y Hossner, 2002
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Efecto del pH y del P sobre la absorción de U	Hidroponía	Laroche et al., 2005
<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Raphanus sativus</i>	Biodisponibilidad de U	Suelo-macetas	Sheppard y Evenden, 1992
<i>Vaccinium angustifolium</i>		Suelo-campo	Morton et al., 2001
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Efecto del U sobre la actividad enzimática		Vandehove et al., 2006
<i>Helianthus annuus</i>	Rizofiltración	Hidroponía	Dushenkov et al., 1997; Dushenkov, 2003
<i>Brassica juncea</i> <i>Chenopodium amaranticolor</i>		Cultivo de tejido "hairy roots"	Eapen et al., 2003
<i>Festuca rubra</i> ; <i>Phleum pratense</i> ; <i>Phalaris arundinacea</i> ; <i>Agrostis alba</i>	Absorción de U	Suelo-campo	Moffet y Tellier, 1977
<i>Shorea robusta</i> ; <i>Emblica officinalis</i> ; <i>Lagerstroemia parviflora</i>			Pande et al., 1993
<i>Phaseolus vulgaris</i> ; <i>Brassica oleracea</i> ; <i>Lactuca sativa</i> ; <i>Zea mays</i> ; <i>Allium cepa</i> ; <i>Solanum tuberosum</i> ; <i>Spinacia oleracea</i> ; <i>Helianthus annuus</i>			Saric et al., 1995
<i>Pseudokirchneriella sucapitata</i> (alga)	Ensayos de biotoxicidad por U	Ensayos en laboratorio	Antunes et al., 2007
<i>Agrostis capillaris</i>	Absorción de U y otros elementos en función del pH del suelo	Suelo-macetas	Tyler y Olsson, 2001
<i>Brassica juncea</i> <i>Lolium perenne</i>	Fitoextracción/efecto ácido cítrico	Suelo-macetas	Vandehove y Van Hees, 2004
<i>Triticum aestivum</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i>	Asimilación de U	Invernáculo	Gulati et al., 1980

3. TRATAMIENTO DE SUELOS Y AGUAS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS UTILIZANDO MATERIALES BIOLÓGICOS

La biorremediación, utilizando plantas o microorganismos vivos y la bioadsorción, sobre biomasa muerta metabólicamente inactiva de plantas, algas y microorganismos, son metodologías de remediación alternativas o complementarias de técnicas químicas y de ingeniería (Salt, et al., 1998; Ahluwalia y Goyal, 2007), que ofrecen efectividad a costos menores que los tratamientos convencionales, especialmente cuando los niveles de contaminación son bajos y las áreas o volúmenes a descontaminar son extensas.

El potencial uso de plantas y microorganismos para la limpieza tanto de metales pesados derivados de la manipulación del Uranio como de otros radionucleidos se ha estudiado en distintos medios de cultivo y sustratos (Huang et al., 1998; Barkay y Schaefer, 2001), habiéndose llegado en un caso a instalación de un sistema de limpieza de agua contaminada a escala piloto (Dushenkov, 2003).

En la siguiente sección nos limitaremos a explicar las distintas tecnologías de remediación desarrolladas hasta el momento con uso de plantas vivas y los procesos fisiológicos involucrados. Pero un estudio completo sobre la factibilidad de uso de la fitorremediación debería incluir el análisis de las instalaciones necesarias, los tiempos y costes involucrados, así como el estudio de los procedimientos necesarios postcosecha para procesar, reducir y/o almacenar los materiales enriquecidos en metales pesados, potencialmente peligrosos. Sin embargo, muchos de estos temas exceden el área de competencia biológica y es necesario dar lugar a otras áreas del conocimiento como la geología, la geoquímica, la ingeniería, la agronomía, la toxicología y la comunicación.

El desarrollo de sistemas de remediación basados en el uso de microorganismos y/o plantas vivas requiere de estudios interdisciplinarios que permitan estudiar la problemática desde distintos puntos de vista.

3.1. Cultivo de plantas con fines de fitorremediación

La fitorremediación se define como el uso de plantas para remover, degradar, contener o estabilizar contaminantes diversos, como metales pesados, elementos trazas, compuestos orgánicos y radionucleidos, en suelos, sedimentos y aguas (Salt et al., 1998; Padmavathiamma y Li, 2007). Esta definición incluye todos los procesos biológicos, químicos, y físicos influidos por las plantas y su rizosfera, que conducen

a la extracción, secuestro, inmovilización, degradación o metabolismo de contaminantes. Se presentan como técnicas de bajo costo que puede utilizarse *in situ* (Entry et al., 1997; Salt et al., 1998; Dushenkov, 2003), en áreas extensas con niveles bajos de contaminación o como complemento de otras técnicas de remediación.

La fitorremediación puede incluir técnicas para inmovilizar los metales pesados (fitoestabilización), para asegurar la extracción de metales presentes en los suelos y aguas (fitoextracción y rizofiltración), o para permitir la volatilización (fitovolatilización).

Algunos contaminantes metálicos como arsénico (As), mercurio (Hg), y selenio (Se) pueden formar compuestos gaseosos naturalmente. Recientemente se ha explotado esta particularidad para promover la absorción de estos elementos por plantas naturales o genéticamente modificadas que puedan convertirlos biológicamente en formas gaseosas y expulsarlos a la atmósfera (Salt et al., 1998; Padmavathiamma y Li, 2007), dando lugar a una nueva técnica de remediación, la fitovolatilización.

Especies vegetales como arroz, brócoli, repollo, *Astragalus bisulcatus* y alfalfa volatilizan Se en la forma de dimetil selenido o dimetil diselenido (Terry et al., 2000). Las plantas pueden absorber formas inorgánicas como selenato y selenito y formas orgánicas como selenometionina. Hay evidencias que muestran que el proceso completo de absorción de Se inorgánico y reducción a una forma orgánica volátil es posible sólo por la interacción de las plantas con microorganismos de la rizosfera, que serían responsables de la asimilación y reducción del Se inorgánico a formas orgánicas (Salt et al., 1998; Terry et al., 2000).

La volatilización de As como dimetilarsenito ha sido mencionado como un mecanismo de resistencia en algas marinas y, si bien las plantas acumulan As predominantemente en las raíces, podría existir un proceso de biotransformación mediados por plantas y bacterias rizosféricas que incrementaría la tasa de volatilización. En cuanto al Hg, se ha observado su volatilización en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* en donde se ha introducido un gen bacteriano para la síntesis de mercurio reductasa (Salt et al., 1998).

La fitovolatilización es la tecnología de fitorremediación más controvertida por las posibles consecuencias ambientales que derivan de su aplicación. Por un lado, implica la desaparición del contaminante del suelo sin necesidad de

tratamiento posterior, pero esto mismo implica una pérdida de control sobre contaminantes tóxicos que ingresan a la atmósfera y pueden ser distribuidos a través del aire para ingresar al suelo nuevamente por deposición en otros lugares (Salt et al., 1998; Padmavathiamma y Li, 2007).

La fitoextracción implica la absorción y acumulación de metales en partes de las plantas que puedan ser cosechadas fácilmente (parte aérea) y, posteriormente, tratadas, reducidas en volumen y almacenadas. La situación óptima sería la utilización de plantas hiperacumuladoras que desarrollen gran biomasa rápidamente para lograr la limpieza de los suelos en un período acotado de tiempo. Sin embargo, la mayoría de las plantas hiperacumuladoras que naturalmente concentran metales pesados en la parte aérea, desarrollan, en general, una biomasa pequeña. Por estos motivos se han desarrollado dos estrategias de fitoextracción: 1) la fitoextracción natural o continua, donde se utilizan plantas hiperacumuladoras; 2) la fitoextracción químicamente asistida, donde se usan plantas productoras de gran biomasa que son capaces de absorber y translocar los metales cuando su disponibilidad es aumentada por agregado de determinadas sustancias químicas que acidifican el sustrato o forman complejos y quelatos con los metales.

Algunas de las sustancias químicas utilizadas en esta modalidad de fitoextracción son: EDTA (ácido etilen diamino tetra acético), EGTA (ácido etilenglycol O-O'-bis-[2-amino-etil]-N.N.N'-tetra acético), EDDS (etilen diamino disuccinato), EDDHA (ácido etilendiamino di-o-hidroxifenilacético), DTPA (ácido dietilentriaminopenta-acético) y ácido cítrico (Schmidt, 2003; Padmavathiamma y Li, 2007). Hernández-Allica et al. (2007) explican el efecto del EDTA sugiriendo un ingreso no selectivo al apoplasto de las raíces de los complejos EDTA-metal.

Una mayor translocación de complejos EDTA-metal pesados desde las raíces a la parte aérea se ha observado en el caso del Pb, pero el efecto no es tan marcado en el caso de otros metales como Zn y Cd (Vassil et al., 1998; Wenzel et al., 2003; Hernández-Allica et al., 2007).

Sin embargo, existen dudas sobre la inocuidad del agregado de acidificantes o quelantes, que puede afectar a los microorganismos y formar compuestos con los metales pesados no degradables y persistentes en el ambiente. Por otra parte, distintos estudios han demostrado que la efectividad de los quelantes como el EDTA en el incremento de la absorción y translocación de los metales pesados en las plantas es menor que su efecto positivo en la solubilidad o labilidad de los mismos. De esta forma, luego de una aplicación de EDTA, los metales pesados serían

susceptibles de mayor movilidad hacia los horizontes o estratos subsuperficiales del suelo con riesgo de contaminación para el agua subterránea (Lombi et al., 2001; Schmidt, 2003; Wenzel et al., 2003). Por otra parte, el EDTA administrado independientemente de los metales pesados causa por sí mismo síntomas fisiológicos negativos relacionados con la tasa de transpiración y el contenido hídrico (Hernández-Allica et al., 2007), aunque el mencionado autor indica que la conveniencia de uso de este quelante en concentraciones relativas adecuadas que disminuyan los efectos colaterales.

También se han utilizado abonos inorgánicos como sulfato de amonio y otros compuestos de azufre para bajar el pH de los suelos y, así, provocar una mayor solubilidad y disponibilidad de los metales pesados (Schmidt, 2003).

En el caso del U, la acumulación de este metal pesado en la parte aérea está fuertemente restringida, aunque se ha podido incrementar esta acumulación con la adición de ácido cítrico (Huang et al., 1998; Chang et al., 2005). La reducción del pH del suelo, provocada por la adición del ácido cítrico, no explica totalmente la mayor absorción de U por las plantas, ya que la adición de otros ácidos como nítrico o sulfúrico, en la misma proporción que el ácido cítrico (20 mmol kg⁻¹suelo), no incrementa la acumulación en la misma medida (Huang et al., 1998). Chang et al. (2005) consideran que, por lo tanto, la absorción de U se produce directamente en la forma acomplejada. Estos mismos autores comentan dos posibles consecuencias adversas de la adición de ácido cítrico: 1) el aumento de la solubilidad del U y, por lo tanto, del riesgo de lavado hacia capas más profundas del suelo y, 2) la posibilidad de formación a largo plazo de trióxido de U, un compuesto muy estable y difícil de extraer.

La posibilidad de aplicación efectiva de técnicas de fitorremediación por extracción depende del número de años y/o cosechas necesarias para reducir el nivel de contaminantes en el suelo por debajo de los límites admitidos para el uso agrícola (Soriano y Fereres, 2003) o de la factibilidad de destinar las tierras a otros fines como, por ejemplo, parquización (Instituto Tecnológico Geominero de España, 1996). En cualquiera de los casos se requiere de plantas que combinen tolerancia, capacidad acumuladora y gran biomasa, de modo de alcanzar los valores admisibles para cada uso en un período razonable de tiempo.

La remoción de metales pesados de aguas contaminadas puede realizarse mediante la técnica de rizofiltración. En este caso se utilizan generalmente plantas terrestres por poseer un sistema radical más grande, cubierto por pelos radicales

que implica una superficie expuesta extremadamente grande (Padmavathiamma y Li, 2007), pero algunas plantas acuáticas como *Salvinia herzogii*, *Pistia stratiotes* y *Eichornia crassipes* (Maine et al., 2001) o el helecho *Azolla filliculoides* (Oren Benaroya et al., 2004) también son capaces de extraer metales pesados del medio.

El girasol (*Helianthus annuus* L.) y la mostaza (*Brassica juncea* Czern.) son ejemplos de plantas terrestres que han demostrado ser capaces de la limpieza de aguas contaminadas con diferentes metales como Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, y Zn (Dushenkov et al., 1995). El girasol es también tolerante y capaz de extraer U en sus raíces (Dushenkov et al., 1995; Blanco Rodríguez et al., 2006) y se ha logrado instalar un sistema a escala piloto para la descontaminación de aguas contaminadas con U en Ashtabula, Ohio, USA (Dushenkov, 2003).

Una tecnología vinculada con la fitofiltración y la rizofiltración ha sido desarrollada usando biomasa de distintas especies como bioadsorbentes (Ahluwalia y Goyal, 2007; Ekmekyapar et al., 2006). Esta tecnología se basa en las propiedades fijadoras de la pared celular como adsorbente de los metales pesados. Algunas especies de algas como *Sargassum* (alga marrón) y *Chlorella* son efectivas en la remoción de metales pesados como Cr, Cu, Cd y U (Ahluwalia y Goyal, 2007; Kalin et al., 2005; Davis et al., 2003) de aguas contaminadas por bioadsorción y otros mecanismos asociados.

La fitoestabilización utiliza plantas tolerantes a la presencia de metales pesados como cobertura vegetal para estabilizar suelos contaminados, inmovilizar los contaminantes y evitar la diseminación de suelo y partículas contaminadas, especialmente en zonas mineras. La fitoestabilización no intenta extraer los metales pesados sino inmovilizarlos por absorción en las raíces, adsorción sobre las mismas o precipitación en la rizosfera.

Las actividades mineras a cielo abierto generan fuerte impacto en la topografía que requiere una restitución posterior al cierre de la explotación. Durante la explotación se deben trasladar grandes volúmenes de material estéril y con distinto tenor del mineral hasta dejar al descubierto la mena de mineral explotable. En general, los lugares donde se vuelve a acumular el material excavado, denominados escombreras, dejan material de distinta granulometría expuesto a la erosión hídrica y eólica (Instituto Tecnológico Geominero de España, 1996). A largo plazo estas escombreras son colonizadas por plantas nativas, pero los tiempos de revegetación son variables dependiendo de las características ambientales del área, que suelen ser en muchas ocasiones zonas áridas y semiáridas con limitaciones

hídricas y vientos. Es posible ayudar a la estabilización de los sustratos y escombreras con plantas apropiadas, escogidas para tales fines.

La fitoestabilización puede utilizarse incluso como una estrategia para reducir el riesgo de diseminación del material contaminado mientras se mantenga abierta la mina y no se proceda a la remediación definitiva del sitio.

Por último, más recientemente, una nueva tecnología de remediación para metales pesados, incluyendo el Uranio, se ha comenzado a desarrollar utilizando la técnica de cultivo de raíces a partir de la enfermedad provocada en heridas de plantas superiores por la infección con *Agrobacterium rhizogenes*. Esta bacteria gram negativa del suelo transfiere un segmento de DNA (T-DNA) de su plásmido inductor de enraizamiento (Ri) al genoma de la planta infectada. Este T-DNA contiene un conjunto de genes que codifican enzimas para la biosíntesis de auxinas y citoquininas. El nuevo balance hormonal induce la formación de raíces, llamadas "hairy roots", que emergen de la herida (Guillon et al., 2006). La promoción de este enraizamiento en plantas hiperacumuladoras permitiría su uso para extraer Cd, Ni o U (Eapen et al., 2003; Guillon et al., 2006).

II - JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO Y OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

Las plantas autóctonas de las áreas mineras donde la abundancia de determinado metal pesado es elevada, son capaces de tolerar niveles de metales que serían tóxicos para otras plantas y pueden acumular en sus tejidos cantidades importantes del metal predominante, probablemente como resultado de un proceso genético evolutivo de adaptación selectiva.

En las dos últimas décadas se ha profundizado el estudio de la capacidad acumuladora de metales en distintas plantas y la búsqueda de especies vegetales que puedan ayudar a remover el exceso de metales del suelo y de aguas contaminadas. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se han observado distintos cambios metabólicos y/o estructurales relacionados con la tolerancia pero también con el estrés producido por la presencia de los contaminantes.

El U es un caso particular por su alta toxicidad química a bajas concentraciones sumado al riesgo radiológico relativamente débil debido a sí mismo, pero importante en función de los elementos resultantes de su desintegración radiactiva.

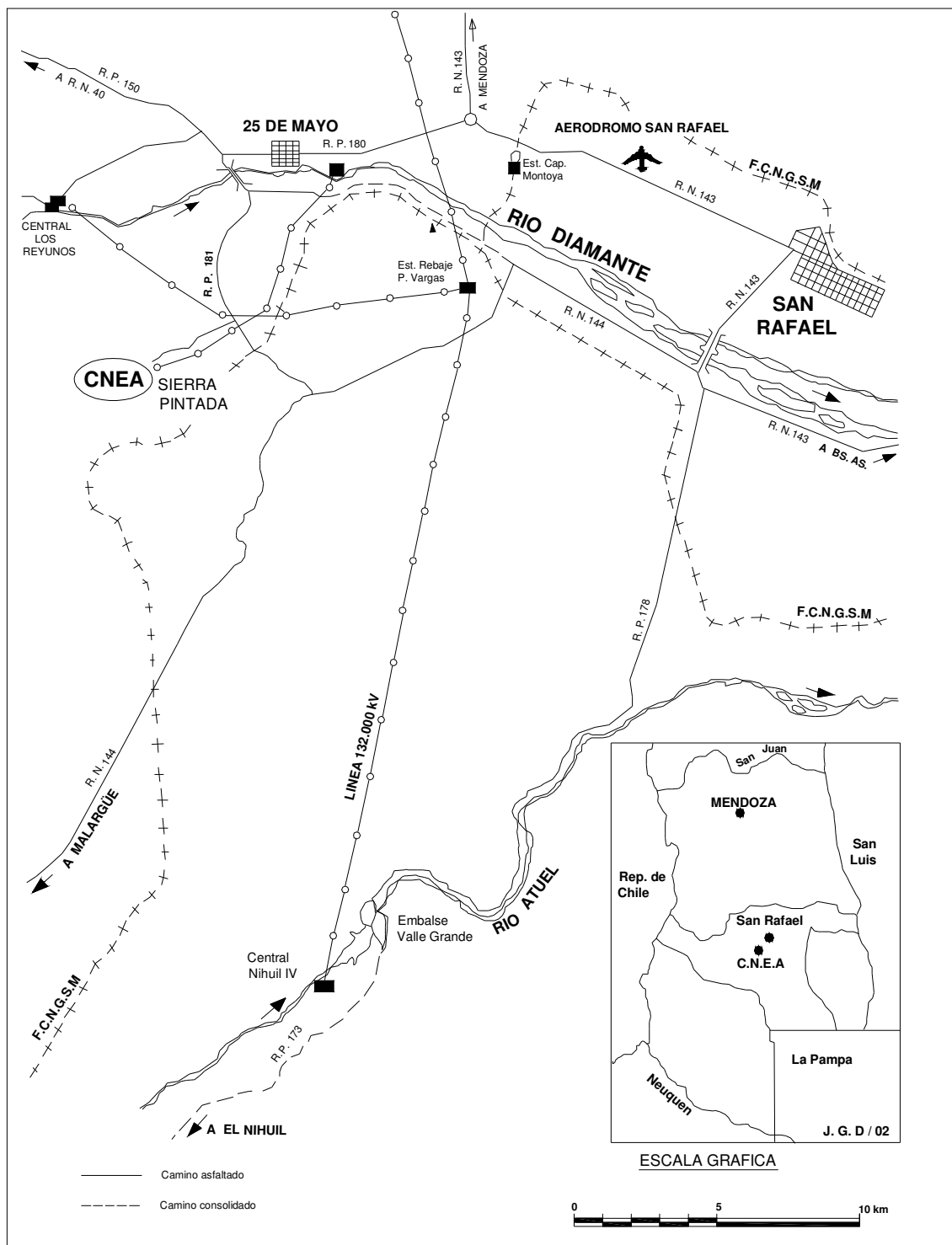
El yacimiento de U de Sierra Pintada se encuentra ubicado en la provincia de Mendoza, en el Oeste de la República Argentina, a 38 km al O de la ciudad de San Rafael (Figura 3). Esta ciudad y su área de influencia cuentan con una población total de 126.000 habitantes y es el polo industrial vitivinícola del sur mendocino. La economía regional se basa en la producción e industrialización de vid, frutas de carozo y olivos. En los últimos tiempos ha progresado la actividad turística relacionada con la presencia de bellezas naturales como el Cañón del Río Atuel y los lagos artificiales de las centrales hidroeléctricas Agua del Toro, Los Reyunos, Valle Grande y El Nihuil.

El clima de la zona es continental semiárido. La temperatura media anual es de 15 °C y la precipitación media anual es de 343 mm. Debido a las bajas precipitaciones, los cultivos se realizan bajo riego.

La explotación minera del yacimiento se inició en 1975 y, desde 1995, se encuentra suspendida su operación. Como consecuencia de la explotación de la mina se realizaron movimientos de grandes volúmenes de suelo y rocas, resultando grandes oquedades correspondientes a las canteras de explotación a cielo abierto y pilas de acopio de roca estéril (sin U), marginales de mineral (con distintos niveles de

Uranio por debajo de la concentración económicamente rentable) y mineral procesado (PRAMU, 2002).

Figura 3 - Ubicación del Complejo Minero San Rafael, en Sierra Pintada, dentro de la Provincia de Mendoza en Argentina. Fuente: PRAMU (2002)



En las zonas excavadas de la mina el agua de lluvia y de escorrentía se acumula y, al estar en contacto con mineral de U, se enriquece en este elemento. La región depende del agua de regadío para el mantenimiento de sus producciones agrícolas y, por lo tanto, los organismos provinciales controlan la calidad y uso del agua en la zona.

Dada la importancia de mantener los recursos naturales y económicos de la región, dentro del Programa de Restitución Ambiental de la Minería del Uranio (PRAMU), se están estudiando distintas metodologías de acuerdo con los niveles de la contaminación con el fin de abordar la restauración ambiental, una vez finalizada la operación de la mina.

En las explotaciones mineras, con independencia del proceso de remediación que deba ser llevado a cabo al cierre de la mina, la vegetación ayuda a estabilizar las partículas de suelo o de marginal de mineral que pueden quedar sueltas y ser acarreadas por el viento diseminando la contaminación. En estos casos, tanto para la vegetación nativa o de aparición espontánea que se instale en el área como para la vegetación potencialmente utilizable en posteriores proyectos de parquización es interesante conocer la resistencia a la toxicidad de las plantas utilizables y los coeficientes de transferencia del metal pesado desde el suelo a las plantas.

En nuestra área de trabajo, el uso de plantas, ya sea para la fitoestabilización del U, evitando su dispersión mientras se procede a tratamientos más drásticos, o para la fitoextracción en aguas y suelos con baja contaminación, es uno de los aspectos a estudiar. Para ello es necesario conocer las posibilidades de las plantas nativas y algunos aspectos fisiológicos de la acumulación de este metal en las plantas.

Este proyecto tiene como objetivo general la contribución al conocimiento sobre la absorción de Uranio en plantas terrestres y sobre su comportamiento en medios contaminados con este metal pesado. Debido a que el comportamiento del U en el suelo es muy complejo por las distintas especies químicas en las que se presenta y los múltiples factores que influyen en su biodisponibilidad, se realizaron estudios en campo y se profundizaron algunos aspectos fisiológicos en condiciones controladas.

Se incluyeron estudios sobre suelos naturales no contaminados, suelos contaminados, modificados por la actividad minera y cultivos hidropónicos con

distintos niveles de contaminación. Estos estudios podrán ser, eventualmente, usados en el desarrollo de sistemas de fitorremediación.

En función del objetivo general planteado, se ha subdividido el presente trabajo en dos objetivos específicos:

1. Estudiar *in situ* la capacidad potencial de absorción de U de algunas especies vegetales de aparición espontánea en un área minera, para su posible uso en programas de fitorremediación o fitoestabilización. Se analizará la acumulación de U y la transferencia de U desde el sustrato al tejido vegetal de distintas especies capaces de colonizar y sobrevivir en sustratos contaminados con distintos niveles de U.

2. Estudiar, en condiciones de hidroponía en laboratorio, la capacidad de acumulación de U de la remolacha roja (*Beta vulgaris*), especie utilizada por diversos autores como modelo por su capacidad de supervivencia en medios contaminados con uranio y por su capacidad de acumulación de este metal pesado en las raíces. Se analizará la tolerancia al U de la remolacha en condiciones de hidroponía, la capacidad extractiva del U por las raíces y su transferencia a la parte aérea, las consecuencias de la contaminación sobre el crecimiento, y los cambios producidos en algunos parámetros fisiológicos como el contenido en pigmentos fotosintéticos, el contenido hídrico relativo, y la actividad ascórbico peroxidasa, relacionada con el estrés oxidativo.

III - MATERIALES Y MÉTODOS

1. TRANSFERENCIA DE URANIO A PLANTAS EN ECOSISTEMAS NATURALES Y MODIFICADOS

1.1. Descripción de las zonas de muestreo y toma de muestras

Las zonas de estudio se encuentran dentro de la región fitogeográfica del Monte, en un sector con características particulares por su relieve, el Bloque de San Rafael, que es un conjunto de serranías de suave declive y alturas que no sobrepasan los 2.300 m.s.n.m (Martínez Carretero, 1999; SAGyP, 1995).

Los suelos son arenosos, pedregosos y sueltos, con escasa estructura y bajo contenido de materia orgánica.

En las zonas no sujetas a alteraciones antropogénicas, tanto al exterior como dentro del Complejo Minero, la vegetación predominante es la estepa arbustiva xerófila, con variaciones en el grado de cobertura vegetal en función de la pendiente, la pedregosidad y la humedad. En términos generales, la flora autóctona está expuesta a condiciones ambientales áridas, con déficit hídrico por las escasas precipitaciones y un alto grado de insolación, que conducen a una tasa elevada de evapotranspiración (Subsecretaría de Medio Ambiente de Mendoza, 2006). La provisión de nutrientes, especialmente N, es también limitada debido a los bajos niveles de materia orgánica.

Se tomaron muestras de suelos y plantas no cultivadas de un total de nueve zonas de muestreo, seis de ellas (numeradas del 1 al 6) seleccionadas dentro del Complejo Minero, y las tres restantes (numeradas del 7 al 9) localizadas al exterior, en áreas con características de suelo y clima similares al área del Complejo Minero.

Las 6 zonas seleccionadas dentro del Complejo Minero fueron:

- 1- escombrera 1
- 2- escombrera 2
- 3- una escombrera de acopio de estériles del mineral de uranio
- 4- una escombrera de marginales del mineral de uranio
- 5- una escombrera de cola de mineral de uranio
- 6- un área cercana sin disturbios por la explotación minera

Las 3 zonas seleccionadas al exterior del Complejo Minero fueron:

- 7- un área de afloramiento natural de Uranio, el afloramiento La Pintada, localizado a 15 km al sur del Complejo Minero
- 8- un campo natural, localizado a 45 km al oeste del Complejo Minero
- 9- un campo natural, en el área denominada Agua de Toro, localizado aguas arriba del Complejo, a 70 km al oeste

Las zonas seleccionadas dentro del Complejo Minero (zonas 1 a 6) son representativas de las distintas actividades realizadas en él y presentan concentraciones variables de uranio en el suelo, desde los niveles de base de la región hasta los resultantes del enriquecimiento en este elemento por depósito de marginales de mineral de U en las escombreras. Las zonas exteriores al Complejo son representativas de un área que no ha estado expuesta a fuentes de contaminación antrópica.

Se realizó un reconocimiento inicial de los puntos de muestreo, comenzando por el más contaminado para detectar las especies vegetales comunes a los distintos ambientes. Se seleccionaron para la toma de muestras y análisis, cuatro especies vegetales: coirón (*Stipa sp.*), chin-chil ó chil-chil (*Tagetes sp.*), y dos especies de jarilla (*Larrea divaricata* y *Larrea nítida*), por ser las especies que se encontraban representadas en la mayoría de los ambientes estudiados.

En la Foto 1 se muestra el talud de una escombrera, donde se puede apreciar que la misma está conformada por piedras de distintos tamaño, recubiertas por una capa poco profunda de suelo, donde crecen las plantas. En primer plano, al pie de la escombrera (Foto 1 A) se pueden observar matas de coirón (*Stipa sp.*), que se muestran con más detalle en las Fotos 1 B y 1 C.

En cada una de las zonas de muestreo se tomaron muestras de las especies vegetales elegidas y del horizonte más superficial del suelo situado en las inmediaciones de las plantas, como se muestra en la Foto 2.

Cada muestra de suelo estuvo formada por 6 submuestras tomadas en distintos puntos alrededor de la planta. Las muestras de material vegetal estuvieron compuestas por la planta entera en el caso de las herbáceas. En el caso de las jarillas se cosecharon ramas de la parte aérea en distintas posiciones y se descalzó parcialmente la planta para tomar las muestras de raíces.

En las Foto 2 y 3 se puede observar el aspecto general de una planta de jarilla, la morfología de las hojas de *L. divaricata* y *L. nítida*, y de *Tagetes minuta*.

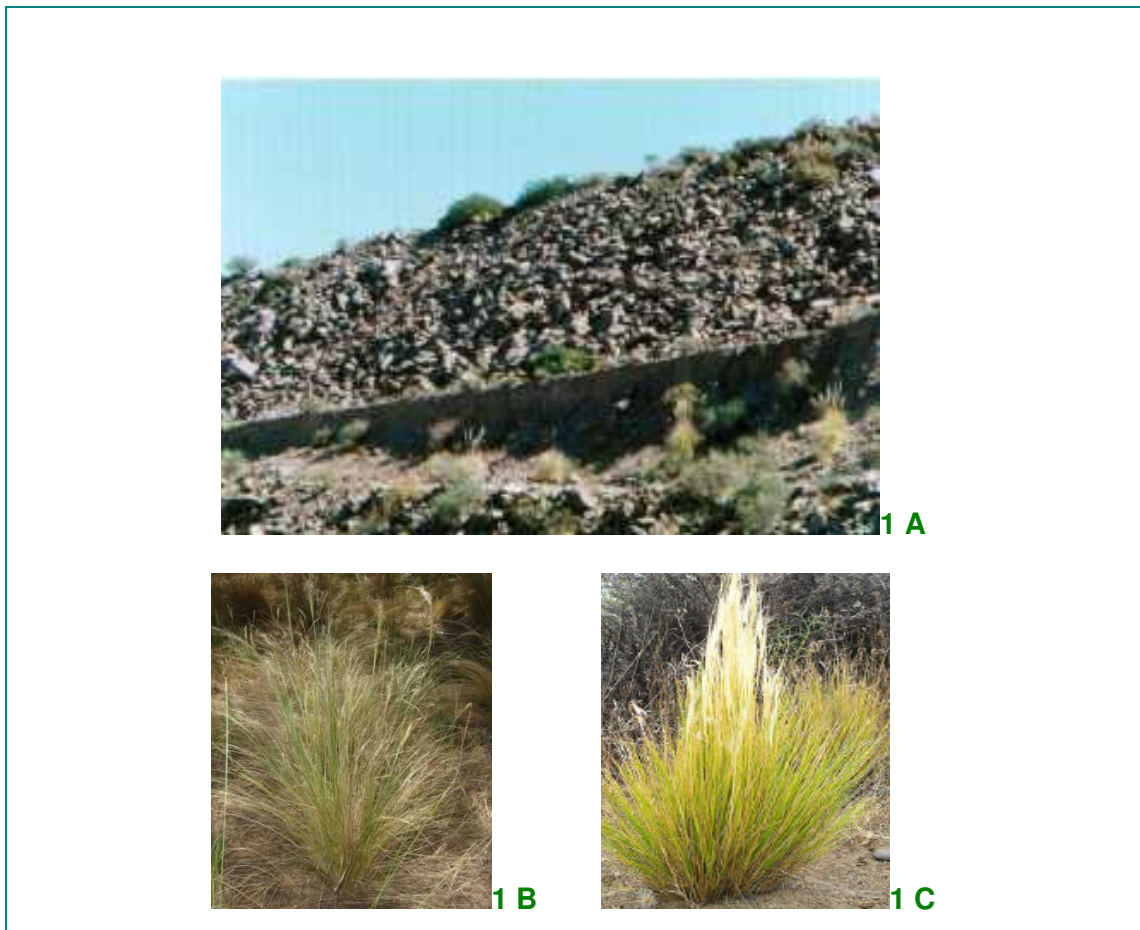


Foto 1 - Talud de una escombrera (1 A), vegetación de la zona y detalle de matas de coirón (1 B y 1 C).



Foto 2 - Planta de jarilla y diferencias morfológicas de las hojas de las dos especies de jarilla estudiadas.

A la izquierda: planta de jarilla entera. Las dos especies de jarilla analizadas tienen un aspecto general similar, pero son fácilmente distinguibles por sus hojas, a la derecha, arriba: *Larrea divaricata*; abajo: *Larrea nitida*. La foto fue tomada en el momento del muestreo de suelo y planta. El dibujo de ramas y hojas fue adaptado de Ruiz Leal (1972).



Foto 3 - Rama de chil-chil (*Tagetes minuta*). Imagen adaptada de Visintin y Bernardello (2005).

Una vez en el laboratorio, las muestras de suelo se secaron al aire, se tamizaron y se procesaron para determinar el pH, y el contenido en nitrógeno total, fósforo total y extraíble, y materia orgánica.

El material vegetal cosechado se seccionó, separando la parte aérea (hojas y tallos) de las raíces, y se lavó con agua destilada para eliminar partículas de suelo o posibles contaminantes externos. Posteriormente, las muestras se secaron en estufa, a 70 ± 2 °C hasta peso constante y se molieron en molino ultracentrífugo.

1.2. Procedimientos analíticos

1.2.1. Determinación del contenido en uranio total

Las determinaciones de U total en material vegetal y suelo se llevaron a cabo por fluorimetría (Centanni, 1956), previa digestión de la muestra con mezcla ternaria de ácidos (HNO_3 , HF y HClO_4) en microondas, retomando con HNO_3 . Se utilizó un fluorímetro Scintrex-UA-3-Uranium Analyser (Laboratorio de Geoquímica, Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina), calculando la concentración de U en tejido vegetal y suelo a partir de las lecturas de las muestras, previa y posteriormente al agregado de un patrón de U.

1.2.2. Determinación del contenido en nitrógeno total

Las determinaciones de N total en planta y en suelo se llevaron a cabo por el método de Kjeldahl modificado (Axmann et al., 1990; FAO/OIEA, 2001). Con este propósito se colocó 0,5 g de material vegetal o suelo molidos en un tubo de digestión, se agregó 8 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado y media pastilla (Kjeltab Merck, MR) de mezcla catalizadora y se realizó la digestión a 380 °C durante 4 horas en un aparato digestor conectado a un aspirador de gases. Una vez digerida, la muestra fue destilada en medio alcalino, logrado con adición de HONa 32 %, y el NH_3 desprendido fue recogido en 20 ml de HCl (0,1 N para material vegetal y 0,05 N para suelo). El N total destilado fue valorado por titulación por retroceso del HCl no consumido.

1.2.3. Determinación del contenido en fósforo del suelo

El P extraíble fue determinado luego de una extracción con bicarbonato de sodio, NaHCO_3 0,5 N a pH 8,5 Olsen y Sommer (1982). La extracción se realizó con una muestra de 2,5 g de suelo, a la que se añadió una espátula de carbón activado y 50 ml de NaHCO_3 0,5 N. Luego de una agitación mecánica de media hora, se filtró inmediatamente.

El contenido de P en el filtrado se determinó por el método de Murphy y Riley (1962). El reactivo utilizado se preparó en el día a partir de la disolución de ácido ascórbico en una solución de molibdato de amonio y tartrato de antimonio y potasio preparada con anterioridad (solución M), en una proporción 0,528 g de ácido ascórbico por cada 100 ml de solución. La reacción colorimétrica se llevó a cabo en matraces aforados de 25 ml con 4 ml de reactivo y 2 ml del filtrado de la muestra de suelo. Simultáneamente se realizó una curva de calibración en el rango 0 - 0,5 $\mu\text{gP}\cdot\text{ml}^{-1}$. Se leyó el color desarrollado después de 10 minutos en espectrómetro Hitachi UV 1.100 a 880 nm.

Para la preparación de 1 L de solución M se diluyeron 70 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) en 500 ml de agua destilada, 6 g de molibdato de amonio en 200 ml de agua destilada y 0,137 g de tartrato de antimonio y potasio en 50 ml de agua destilada. Se mezclaron estas tres soluciones y se llevaron a volumen.

1.2.4. Determinación del contenido en materia orgánica del suelo

La materia orgánica (MO) del suelo fue cuantificado por el método de Walkley y Black, que consiste en la oxidación de la materia orgánica con dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en medio sulfúrico, y la valoración del exceso de dicromato no utilizado en la oxidación con solución ferrosa, según Jackson (1976) y López Rita y López Melida (1990).

Con este propósito, 2 g de suelo (recomendado para suelos con valores esperados de carbono orgánico bajos) se colocaron en un erlenmeyer con 10 ml de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1 N, se mezcló, se añadió 20 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, se mezcló y se dejó actuar los reactivos durante 30 minutos. Se diluyó con agua hasta un volumen de 200 ml, se agregó 10 ml de ácido fosfórico 85 %, 0,2 g de NaF y 30 gotas de difenilamina. La valoración del dicromato que permaneció en la disolución sin ser utilizado en la oxidación de la materia orgánica se realizó con una solución de

sulfato ferroso amónico 1N. Simultáneamente se realizó un ensayo de valoración en blanco (sin suelo) de la misma forma.

Los resultados se calculan mediante la ecuación:

$$\% \text{ MO} = 10 [1 - (T/S)] \times 1,34$$

en donde S es la valoración del blanco, en ml de disolución ferrosa; T es la valoración de la muestra, en ml de disolución ferrosa, y el factor 1,34 es un factor que tiene en cuenta el peso miliequivalente de carbono (C), la correspondencia entre C y materia orgánica, y un factor de recuperación de la materia orgánica (o eficiencia de extracción) del 77 % (Jackson, 1976).

1.2.5. Medida del pH del suelo

El pH del suelo fue medido en una suspensión de suelo en agua con una relación 1: 2,5. Para ello, 10 g de suelo fueron suspendidos en 25 ml de agua dentro de un vaso de precipitados, se agitó la suspensión durante 30 minutos con agitador recíproco. Se midió el pH introduciendo un electrodo en la suspensión suelo-agua recién agitada.

1.3. Indicadores de transferencia y translocación

La transferencia suelo-planta del uranio fue calculada a partir del factor de bioacumulación (FB_S), como:

$$FB_S = \frac{\text{concentración de U en parte aérea o raíz [mgU.kg}^{-1} \text{]}}{\text{concentración de U en el sustrato [mgU.kg}^{-1} \text{]}}$$

El porcentaje de uranio translocado o factor de translocación, FT, (Singh y Agrawal, 2007) fue calculado como:

$$FT (\%) = \frac{\text{concentración de U en parte aérea [} \mu\text{gU.g}^{-1} \text{]}}{\text{concentración de U en raíces [} \mu\text{gU.g}^{-1} \text{]}} \times 100$$

2. TRANSFERENCIA DE URANIO A PLANTAS EN CONDICIONES CONTROLADAS

2.1. Material vegetal

Los estudios se realizaron en plantas de remolacha roja (*Beta vulgaris*). Las semillas, de la variedad comercial Asgrow Wonder de Florensa Argentina, se germinaron en oscuridad en bandejas con arena. Al emerger, las plántulas se trasladaron a una cámara de cultivo a $24,0 \pm 1,5$ °C, con un fotoperíodo de 16 horas de luz blanca y una humedad relativa de $70,0 \pm 4,5$ %. Tras alcanzar el estadio de dos hojas, las plántulas se transplantaron, según el experimento a desarrollar, a macetas conteniendo 1,2 ó 4 litros de solución nutritiva Hoagland (ver Tabla 2 para su composición). Excepto en el experimento que se indica, en todos los casos se mantuvo la fuente de fósforo en la solución nutritiva con el fin de simular la composición del agua contaminada que se acumula en una zona minera de extracción de uranio.

Tabla 2 - Composición de la solución nutritiva utilizada para el ensayo (Hoagland y Arnon, 1938).

Especie química	Concentración
Ca(NO ₃) ₂	5 mM
MgSO ₄	2 mM
KH ₂ PO ₄	1 mM
KNO ₃	5 mM
ZnSO ₄	0,76 μM
CuSO ₄	0,32 μM
H ₃ BO ₃	46 μM
MnCl ₂ .4H ₂ O	9,14 μM
MoO ₃	0,33 μM
Citrato de Fe	0,5 % (1 ml L ⁻¹ sol.nutritiva)

Para lograr el sostén de las plántulas se utilizó una placa de tergopor agujereada, a la que además se le hizo un orificio central más grande para realizar los muestreos de solución nutritiva y se le colocó un precinto para poder levantar la placa sin tocar la solución contaminada ni deteriorar las plantas (Foto 4). La solución se mantuvo en aireación mediante aireadores de pecera.



Foto 4 - Plántulas de remolacha colocadas en los recipientes con la solución hidropónica.

Cuando las plantas alcanzaron un desarrollo de seis hojas, se reemplazó la solución hidropónica por solución nutritiva preparada de igual modo pero con la incorporación de uranio, como nitrato de uranilo ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$), en la concentración requerida según el tratamiento.

El pH de la solución hidropónica fue similar en todas las macetas, siendo $5,97 \pm 0,05$ al inicio del ensayo y $6,11 \pm 0,21$ al final del mismo.

A lo largo del ensayo se mantuvo el volumen de los recipientes mediante el agregado de agua destilada cuando fue necesario.

2.2. Diseño experimental

El diseño experimental seguido varió entre los experimentos del modo descrito a continuación para cada uno de ellos.

EXPERIMENTO 1. Influencia de la aplicación exógena de uranio en el crecimiento de plantas de remolacha y en su patrón de acumulación en los tejidos.

Se utilizaron 480 plantas, distribuidas a razón de 20 plantas por maceta de 4 litros de capacidad, para un total de seis (6) tratamientos y cuatro (4) repeticiones por tratamiento (80 plantas por tratamiento).

Los tratamientos ensayados fueron:

- Testigo sin plantas, con el nivel mínimo de U (1 mgU.L^{-1})
- Testigo con plantas, sin U
- Cuatro concentraciones de U: 1, 2, 3 y 5 mgU.L^{-1} , con plantas.

Periódicamente se tomaron muestras de las soluciones nutritivas y se midió el volumen de agua transpirado. Las plantas se cosecharon a los 15 días desde el inicio del tratamiento con uranio.

EXPERIMENTO 2. Efecto del anión fosfato en la acumulación de U y en la tolerancia de plantas de remolacha

Se utilizaron un total de 48 plantas, creciendo en macetas de 1,2 litros de capacidad, a razón de 3 plantas por maceta. Se ensayaron un total de 4 tratamientos y 4 repeticiones por tratamiento (12 plantas por tratamiento). Los tratamientos aplicados fueron:

C: Control con P, solución Hoagland completa, sin U

C – P: Control sin P, solución Hoagland sin P, sin U

U + P: Solución Hoagland completa con P, con $3,3 \text{ mgU.L}^{-1}$

U – P: Solución Hoagland sin P, con $3,3 \text{ mgU.L}^{-1}$

Las plantas se cosecharon a los 7 días desde el inicio del tratamiento.

EXPERIMENTO 3. Estudio del efecto del tiempo de exposición y la capacidad de recuperación de las plantas de remolacha al estrés por uranio. Medida de algunos parámetros fisiológicos

Se emplearon 220 plantas, creciendo en macetas de 1,2 L a razón de 5 plantas por maceta, con un total de 20 plantas por muestreo. Se ensayaron cinco tiempos de exposición 0, 2, 5, 7 y 10 días a una concentración de uranio de 3,3 mgU.L⁻¹, cosechándose las plantas tras esos días de permanencia en la solución con uranio. Con la finalidad de evaluar la capacidad de recuperación de las plantas tratadas, dos lotes de plantas con 4 macetas cada uno, incubadas durante 5 días con la solución con uranio arriba indicada, se traspasaron a solución nutritiva sin uranio. Estas plantas se cosecharon a los 2 y 5 días de retirado el U de la solución. Paralelamente se prepararon macetas control con plantas creciendo con solución nutritiva sin adición de Uranio en cada fecha de muestreo. Un esquema del ensayo se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3 - Esquema temporal del Experimento 3 en donde se muestran los tratamientos aplicados y los días de muestreo. Entre paréntesis se indican los días de permanencia de las plantas en la solución nutritiva tras la retirada del uranio del medio.

Tratamiento	Abreviatura	Número de Macetas	Día del muestreo desde el inicio del tratamiento				
			0	2	5	7	10
Control	Control	20	0	2	5	7	10
Con U siempre	+ / + U	16		2	5	7	10
Con U / sin U	+ / - U	8			Cambio de solución	7(2)	10 (5)

Tras los experimentos, las plantas cosechadas se seccionaron en raíz y parte aérea. Las raíces se lavaron con agua destilada y se secaron con papel absorbente. Posteriormente se pesaron ambas partes para determinar su peso fresco y se

secaron en estufa a 65 ± 2 °C hasta alcanzar un valor constante para obtener su peso seco. Finalmente, las muestras se molieron en molino ultracentrífugo, tamizándose a través de una malla de 2 mm.

Para los análisis que lo requirieron, las hojas frescas, una vez pesadas, se fraccionaron en unidades de 150 mg, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -20 °C para su posterior uso.

2.3. Evapotranspiración y toma de muestras de la solución nutritiva

La medida de la evapotranspiración y la toma de muestras de la solución hidropónica para su análisis se realizaron en el Experimento 1.

La evapotranspiración de las plantas fue estimada sustrayendo la pérdida promedio de agua de los recipientes sin plantas al consumo total de agua en los recipientes con plantas (Vassil et al., 1998; Hernández-Allica et al., 2007).

El consumo de agua diario por evapotranspiración (volumen de agua evapotranspirado por día) fue calculado dividiendo la cantidad de agua perdida por evapotranspiración entre dos fechas de muestreo consecutivas por el número de días transcurridos entre muestreos.

Se tomaron muestras de la solución hidropónica (10 ml de solución por muestra) al inicio del ensayo y a los 1, 6, 9, 13 y 15 días tras la incorporación del uranio. Las muestras se tomaron después de la restitución del agua consumida para poder referir los análisis posteriores a un volumen común.

2.4. Procedimientos analíticos

2.4.1. Determinación de fosfatos y de uranio

2.4.1.1. Obtención del extracto

El material molido de raíces y parte aérea fue sometido a una digestión nítrico perclórica. La técnica de digestión fue adaptada de las metodologías descritas por López Rita y López Melida (1990) y Ebbs et al. (1998). Para la digestión se pesó una alícuota de material vegetal (0,5 g en el caso de parte aérea y entre 0,2 y 0,5 g en el caso de las raíces, según la cantidad de material disponible). A cada muestra se le

agregó 10 ml de ácido nítrico concentrado, se dejó una noche y luego se calentó lentamente hasta 180 °C. Se continuó el calentamiento a esta temperatura hasta que se redujo el volumen a aproximadamente la mitad y las muestras se aclararon. Se enfrió y se agregó 2 ml de ácido perclórico, llevando nuevamente a 220 °C hasta digestión completa. Luego de enfriar se llevó a volumen con agua destilada en matraz de 25 ml y se separaron las alícuotas para las determinaciones de P y U.

2.4.1.2. Análisis del contenido de fosfatos

La determinación de fosfatos en la solución nutritiva y en el tejido vegetal (parte aérea y raíces) se realizó mediante el método colorimétrico del complejo vanadomolibdofosfórico (Jackson, 1976). Para ello se colocó 5 ml de solución nutritiva ó 1 ml del extracto de la digestión del material vegetal en un matraz aforado de 50 ml, se agregó 10 ml de reactivo vanadomolibdato y se completó el volumen del matraz con agua destilada. Al cabo de 10 minutos de reacción se midió el color desarrollado en espectrofotómetro Hitachi UV-1100 a 440 nm. Simultáneamente, y siguiendo el mismo procedimiento, se trazó una curva de calibración que cubrió un rango de concentraciones de P entre 0 y 20 µgP.ml, utilizando disoluciones de una solución patrón de P de 50 µgP.ml.

El reactivo vanadomolibdato se preparó como se describe a continuación. Se preparó la solución A disolviendo 25 g de molibdato amónico en 400 ml de agua. Luego se preparó la solución B disolviendo 1,25 g de metavanadato amónico en 300 ml de agua caliente, y agregando, una vez que la disolución anterior se enfrió, 250 ml de ácido nítrico concentrado. Cuando la solución B se enfrió hasta la temperatura ambiente, la solución A se vertió sobre ella y el conjunto resultante se diluyó hasta 1 litro con agua destilada.

2.4.1.3. Análisis del contenido de uranio

En los extractos de parte aérea y en las muestras de la solución hidropónica, el U fue determinado por fluorimetría láser en un equipo Scintrex UA-3, utilizando patrones certificados por OIEA (Organismo Internacional de Energía Atómica).

En los extractos de las raíces el U fue determinado por el método de absorción molecular o del dibenzoilmetano (DBM). Para ello se tomó 2 ml de extracto

o de agua, se le agregó 3 ml de solución saturada de nitrato de sodio más 5 ml de solución de HNO₃ 9M y 10 ml de fosfato de tributilo al 25 % en tetracloruro de carbono. Luego de agitar 1 minuto, se tomó 2 ml de la fase orgánica, se le agregó 2 ml de buffer (piridina al 50 % en etanol) y 2 ml de solución de DBM (solución al 1 % en etanol). Luego de llevar a 10 ml de volumen con etanol, se midió la absorbancia a 404 nm. Paralelamente se procesan blancos y muestras de U natural para curva de calibración (Tomellini, 2004, comunicación personal).

2.4.2. Determinación del nitrógeno total

Las determinaciones de N total en la parte aérea se realizaron por digestión y destilación Kjeldahl modificada, según Axmann et al., 1990 y FAO/IAEA, 2001, como se describió en la sección 1.2.2. del Capítulo III – Materiales y métodos.

En las raíces no se determinó N por no contar con material suficiente para la realización de dos digestiones independientes.

2.4.3. Contenido hídrico relativo

A primera hora de la mañana se cortaron cuidadosamente con bisturí un total de 3 hojas del tallo. Se pesó cada hoja de inmediato en una balanza de precisión, obteniéndose el peso fresco (Pf) y se colocó en un recipiente con agua destilada, con el pecíolo sumergido durante 24 horas a 4 °C en oscuridad. Al cabo de este tiempo, se volvió a pesar, obteniéndose el peso turgente (Pt). Luego se secó en estufa a 65 °C durante 48 horas y se volvió a pesar en seco (Ps).

El contenido hídrico relativo (CHR) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{CHR (\%)} = \left[\frac{\text{Pf} - \text{Ps}}{\text{Pt} - \text{Ps}} \right] \times 100$$

2.4.4. Determinación del contenido en pigmentos fotosintéticos

Una muestra de 150 mg de hoja congelada fue homogeneizada con 5 ml de acetona 100 % (Lichtenthaler, 1987), en oscuridad, para evitar la descomposición de los pigmentos fotosintéticos. Inmediatamente después de la extracción se colocó el extracto en una cubeta para realizar la determinación cuantitativa de los distintos pigmentos en espectrofotómetro. Se leyó la absorbancia a las siguientes longitudes de onda: 661,6; 644,8 y 470 nm.

Con los datos de Absorbancia (A) y las siguientes ecuaciones (Lichtenthaler, 1987) se calcularon los porcentajes de clorofila *a* (Clor_a), clorofila *b* (Clor_b), clorofila *a* + *b* (Clor_{a+b}), carotenoides totales (Car_(x+c)), en extractos de hoja con acetona 100 %:

$$\text{Clor}_a = 11,24 A_{661,6} - 2,04 A_{644,8}$$

$$\text{Clor}_b = 20,13 A_{644,8} - 4,19 A_{661,6}$$

$$\text{Clor}_{(a+b)} = 7,05 A_{661,6} + 18,09 A_{644,8}$$

$$\text{Car}_{(x+c)} = (1000 A_{470} - 1,9 \text{Clor}_a - 63,14 \text{Clor}_b) / 214$$

Estas ecuaciones se basan en los coeficientes de absorción específicos de cada uno de los pigmentos, que varían en función del solvente y concentración del mismo utilizado en la extracción.

Las concentraciones de pigmento obtenidas se expresaron en microgramos por mililitro (µg/ml) de la solución de extracto vegetal. Posteriormente se relacionaron los valores obtenidos al peso fresco de la alícuota de hoja utilizada en cada medición, expresándolos finamente en microgramos por gramo (µg/g).

Se calculó también la variación (V) o porcentaje de reducción o incremento del contenido de las clorofilas *a* y *b* en las plantas tratadas con U con respecto al contenido en hojas de las plantas control al inicio de la experiencia. La ecuación utilizada para el cálculo de variación de clorofila *a* (VClor_a) fue:

$$\text{VClor}_a (\%) = \frac{\text{Clor}_a U_n - \text{Clor}_a \text{Control}_0}{\text{Clor}_a \text{Control}_0} \times 100$$

en donde: Clor_aU_n es el contenido de clorofila *a* en las hojas de plantas expuestas a U durante *n* días; y Clor_aControl₀ es el contenido de clorofila *a* de las plantas antes del agregado de U.

La variación de clorofila *b* (VClor_b) fue calculada con la misma ecuación reemplazando los valores de Clor_a por los correspondientes de Clor_b.

2.4.5. Extracción y determinación de la actividad ascórbico peroxidasa

En la extracción del enzima ascórbico peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) se siguió el método descrito por Arbona (2005). Se partió de 150 mg de tejido fresco y

homogeneizado a 4 °C con mortero y maza en buffer fosfato sódico 50 mM pH 7,1, al que se adicionó ascorbato sódico 1mM y EDTA 0,1 mM. El homogeneizado se filtró por tela de muselina y se centrifugó a 15.000 rpm, 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se diluyó en la proporción 1:5 con el tampón de extracción antes de la determinación de su actividad.

La determinación de la actividad específica del enzima se realizó según el método descrito por Asada (1984), que se basa en la medición espectrofotométrica de ascorbato a 290 nm y la disminución de su concentración por oxidación a dehidroascorbato (DHA) en presencia de H₂O₂ y la enzima APX.



La actividad enzimática que produce la oxidación de 1 μmol de ascorbato por minuto se consideró una unidad de APX (Arbona et al., 2003). Los resultados se expresaron en unidades de APX por concentración de proteínas.

2.4.6. Determinación de la cantidad de proteína soluble

La cantidad de proteína soluble en los extractos enzimáticos se cuantificó por el método de Bradford (1976), utilizando BSA ("bovine serum albumine") como solución estándar. Se siguió el método reseñado por el fabricante del reactivo (Bio-Rad Protein Assay) en el que un volumen final de 0,1 ml del extracto convenientemente diluido reaccionó con 5 ml del reactivo Coomassie Brilliant Blue G-250, diluido 1:4. Tras 5 minutos para la estabilización del color, se midió la absorbancia a 595 nm, interpolándose los valores en una curva patrón de BSA comprendida entre 20 y 140 μg de proteína.

2.5. Indicadores de transferencia y tolerancia

El factor de transferencia medio de cultivo-planta o factor de bioacumulación en hidroponía (FB_H) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{FB}_H = \frac{\text{concentración de U en parte aérea o raíz [mgU.kg}^{-1} \text{]}}{\text{concentración de U en la solución [mgU.L}^{-1} \text{]}}$$

El porcentaje de U transportado desde las raíces a la parte aérea fue calculado para cada réplica como:

$$\text{U translocado (\%)} = \frac{\text{U total acumulado en parte aérea [mgU]}}{\text{U total acumulado en raíces [mgU]}} \times 100$$

El índice de tolerancia (IC), que relaciona la biomasa promedio desarrollada por plantas expuestas a contaminación con respecto a plantas crecidas sin contaminación, se calculó como:

$$\text{IC (\%)} = \frac{\text{Biomasa media en plantas con tratamiento de U [g]}}{\text{Biomasa media en plantas control [g]}} \times 100$$

Se adaptó el concepto de “grado de inhibición de crecimiento” (GIC) de Leita et al. (1993), basado en las diferencias de desarrollo de materia seca en parte aérea debido a contaminantes externos, a nuestras condiciones de trabajo para calcular dicho parámetro con biomasa fresca promedio de cada tratamiento de parte aérea y raíces.

$$\text{GIC (\%)} = \frac{\text{Biomasa plantas control} - \text{Biomasa plantas tratadas con U}}{\text{Biomasa plantas control}} \times 100$$

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando los procedimientos para análisis de varianza del programa STATISTICA 6.0. Cuando se constataron diferencias significativas entre medias, éstas se separaron utilizando el test de LSD de Fisher o el test de Tukey, según se indique en el texto.

IV - RESULTADOS

1. BIOACUMULACIÓN DE URANIO EN CONDICIONES DE CAMPO

Las especies vegetales cuyas muestras se analizaron en el presente trabajo se hallaron en suelos naturales y en sustratos relativamente artificiales constituidos por suelo, residuos de rocas con distinto tenor de U y material de construcción de caminos. Estos sustratos cubren la parte superior de las llamadas escombreras, constituidas por desechos de la actividad minera que necesita retirar el material sin U o con niveles bajos de este elemento para llegar hasta la veta de mineral comercialmente explotable. Las escombreras se han ido colonizando por especies locales de aparición espontánea que subsisten en un medio con condiciones de escasa profundidad de sustrato, baja fertilidad y baja retención de agua.

Los suelos o sustratos superficiales de las escombreras y explanadas presentaron valores de pH alcalino (de 8 a 9), bajo contenido de materia orgánica (0,13 a 0,34 %) y de P extractable Olsen (2,3 a 3,6 $\mu\text{g P g}^{-1}\text{suelo}$). El estrato superficial de material fino es poco profundo, entre 10 y 20 cm. Estas características sumadas a una precipitación media anual de 350 mm, hacen posible la colonización natural solamente a determinadas especies adaptadas a las condiciones adversas imperantes. Sobre estas condiciones adversas generales se agrega en algunos lugares niveles de concentración de U elevadas.

La concentración de U en los suelos sin disturbar varió entre 1,8 y 3,1 $\mu\text{gU g}^{-1}\text{suelo}$, equivalente a 1,8 y 3,1 $\text{mgU kg}^{-1}\text{suelo}$, según la nomenclatura de unidades que se use. Estos valores corresponden a los niveles basales de U en la zona. Donati y Gallucci (1984) analizaron suelos del área de San Rafael, encontrando valores entre 1,5 y 3,7 $\mu\text{gU g}^{-1}\text{suelo}$. En suelos de Estados Unidos, el nivel promedio de U es de 1,8 $\text{mgU kg}^{-1}\text{suelo}$ (NCRP, 1984) y en suelos urbanos superficiales de las cinco ciudades más importantes de Gran Bretaña este valor oscila entre 0,75 y 5,50 $\text{mgU kg}^{-1}\text{suelo}$ (British Geological Survey, 1997). Van Britsom et al. (1995) mencionan que en la corteza terrestre el valor de U promedio es de 4 ppm (4 $\mu\text{gU g}^{-1}\text{suelo}$).

En la escombrera de colas de mineral de U (zona 5), la concentración de U se elevó a 386 $\mu\text{gU g}^{-1}\text{suelo}$, en el punto de mayor contaminación muestreado.

El Complejo Minero Fabril CMFSR y sus alrededores presenta una vegetación baja arbustiva leñosa cuyas especies predominantes son las jarillas, *Larrea divaricata* y *Larrea nitida* (Donati y Gallucci, 1984). En los suelos no disturbados del área de Sierra Pintada la vegetación más representativa está constituida por gramíneas (*Stipa*

sp., *Setaria sp.*, *Elymus erianthus*, *Tridens pilosa*), leguminosas (*Prosopis sp.*, *Zuccagnia punctata*, *Adesmia sp.*, *Cercidium australe*); nyctagináceas (*Wedelia incarnata*); zygotifiláceas (*Larrea sp.*); cactáceas (*Opuntia sp.*); solanáceas (*Lycium sp.*, *Nicotiana noctiflora*, *Fabiana viscosa*); compuestas o asteráceas (*Eupatorium patens*, *Baccharis sp.*, *Senecio sp.*, *Grindelia pulchella*, *Chuquiraga incana*); caparidáceas (*Atamisquea emarginata*); verbenáceas (*Verbena seriphioides*); umbelíferas (*Asteriscium glaucum*), según Donati y Gallucci (1984).

En las escombreras con contaminación intermedia se encontraron ejemplares de romerillo colorado (*Eupatorium buniifolium*, *Asteraceae*); monte negro (*Bougainvillea spinosa*, *Nyctaginaceae*); chilca (*Baccharis salicifolia*, *Asteraceae*) además de las especies seleccionadas para tomar muestras y analizar. En el Afloramiento La Pintada también se encontraron ejemplares de romerillo colorado y de chañar brea (*Cercidium australe* o *Cercidium praecox*).

En todos los puntos de muestreo se encontraron plantas que habitaban el lugar, pero la presencia y densidad de las distintas especies vegetales no fue igual en todos los puntos. La única especie vegetal que se encontró en todos los puntos de muestreo fue el coirón (*Stipa sp.*). El chil-chil (*Tagetes minuta*) estuvo bien representado en las escombreras, independientemente del tenor de U, pero no así en los suelos naturales, salvo en el afloramiento natural de U (Tabla 4).. Las dos especies de jarilla (*Larrea nitida* y *Larrea divaricata*) estuvieron representadas en los suelos naturales y en los ambientes con niveles bajos de U en suelo. Al tratarse de arbustos requieren una profundidad de suelo mayor a la desarrollada en las escombreras.

Tabla 4 - Presencia de las especies vegetales escogidas en las diferentes zonas de muestreo.

Lugar de muestreo	Distancia al CMFSR	Concentración de U	Presencia de especies vegetales escogidas			
	km	µgU g ⁻¹ suelo	<i>Stipa</i> sp.	<i>Tagetes minuta</i>	<i>L.nítida</i>	<i>L. divaricata</i>
Agua de Toro (zona 9)	70 km al O	2,5	++	-	+	+
Campo natural (zona 8)	45 km al O	1,8	++	-	++	-
Punto de referencia no contaminación, alejado de las escombreras (zona 6)	Dentro del Complejo	1,8	++	-	+	+
Afloramiento La Pintada (zona 7)	15 km al S	3,1	++	+	+	+
Escombrera de estériles de mineral (zona 3)	Dentro del Complejo	7,1	++	++	+	-
Escombrera 1 (zona 1)	Dentro del Complejo	13,3	++	++	-	+
Escombrera 2 (zona 2)	Dentro del Complejo	32,5 – 64,4	++	+	-	-
Escombrera de marginales de minerales (zona 4)	Dentro del Complejo	180 - 282	++	+	-	-
Escombrera de colas de mineral (zona 5)	Dentro del Complejo	386	+	-	-	-

++ (n >1 ejemplar por metro cuadrado)

+ (n=1 ejemplar por metro cuadrado)

- ausente

CMFSR: Complejo Minero Fabril San Rafael

En la Tabla 5 se muestran las concentraciones de Uranio en tejido vegetal de la parte aérea y radicular de las cuatro especies vegetales en los puntos de muestreo donde cohabitaban.

Tabla 5 - Concentración de uranio en biomasa aérea y radicular de distintas especies vegetales en relación con el contenido de Uranio en el suelo que cohabitaban.

Suelo	<i>Stipa sp.</i>		<i>Tagetes minuta</i>		<i>Larrea nitida</i>		<i>Larrea divaricata</i>	
	p. aérea	Raíz	p. aérea	Raíz	p. aérea	Raíz	p. aérea	Raíz
$\mu\text{gU g}^{-1}$	$\mu\text{gU g}^{-1}$							
1,8	0,07	0,16	--	--	0,08	0,02	0,10	0,03
2,5	0,05	0,18	--	--	0,03	0,03	0,03	0,05
3,1	0,21	0,33	0,09	0,08	0,06	0,16	0,05	0,06
7,1	1,15	3,72	0,19	7,37	0,50	46,00	--	--
13,3	1,70	8,13	0,70	5,31	--	--	0,75	18,72

Las cuatro especies vegetales elegidas para el muestreo mostraron valores de concentración de uranio superiores en la raíz que en la parte aérea. El U queda retenido en las raíces y la translocación hacia la parte aérea está restringida tanto en cultivos hidropónicos como en suelos (Ebbs et al., 1998; Tyler y Olson, 2001).

Tanto la *L. nitida* como la *L. divaricata* mostraron niveles muy bajos de U en la parte aérea y en raíz cuando crecían en suelos con niveles basales de U. Al aumentar la concentración de U en suelo, el nivel de este metal en las raíces de las dos especies aumentó considerablemente. En el caso de *L. nitida*, la raíz acumuló entre seis y siete veces más U que el presente en el suelo, evaluado por la relación de concentraciones en cada ámbito, mientras que en la parte aérea sólo se encontraba una centésima parte del U registrado en la raíz. Sin embargo, estas especies no se encontraron en suelos altamente contaminados.

El coirón se encontró presente en todos los puntos de muestreo, incluyendo suelos con concentraciones altas de U, hasta $386 \mu\text{gU g}^{-1}$. La concentración de U en tejido vegetal se mantuvo baja y en valores relativamente proporcionales al nivel de U

en el suelo, en los suelos con concentraciones de U menores o iguales a $7,1 \mu\text{gU g}^{-1}$. A medida que el nivel de U en los suelos fue aumentando, el contenido de U en el coirón fue incrementándose también, hasta que se verificó una caída brusca primero en parte aérea (en suelos con más de $70 \mu\text{gU g}^{-1}$) y luego en raíz (Figuras 4 y 5).

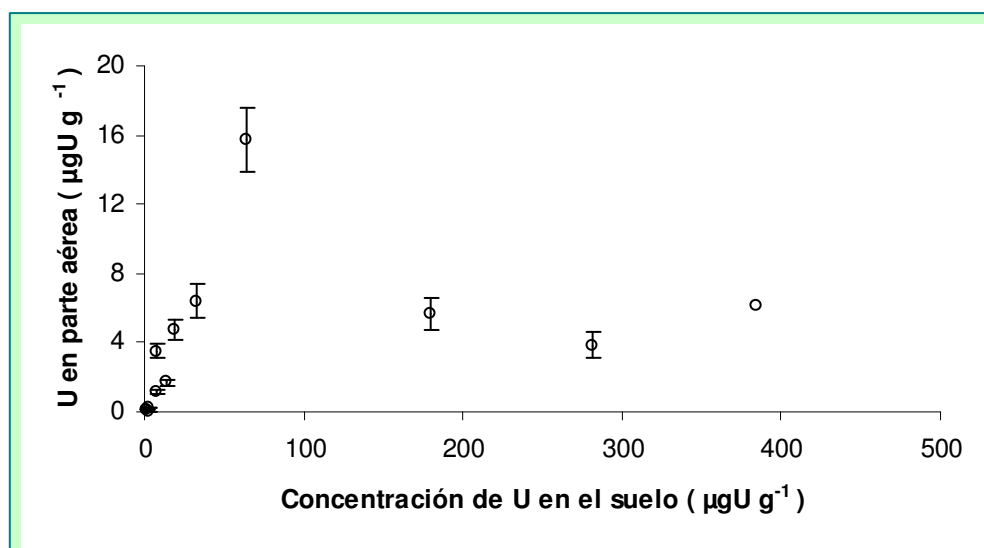


Figura 4 – Concentración de uranio en la parte aérea de coirón (*Stipa sp.*) en relación con el contenido de uranio del suelo que habitan.
Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3 repeticiones)

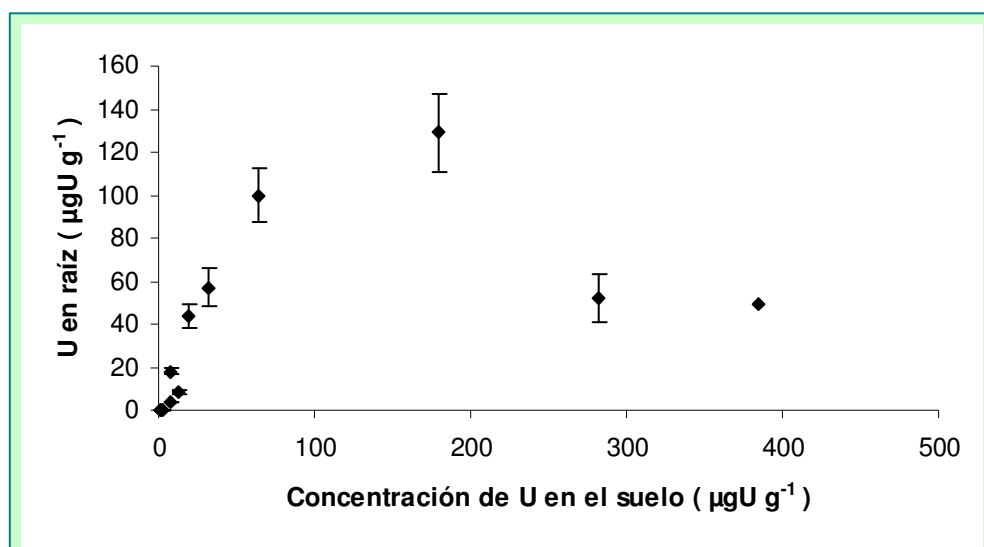


Figura 5 - Concentración de uranio en la raíz de coirón (*Stipa sp.*) en relación con el contenido de uranio del suelo que habitan.
Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=3 repeticiones)

A pesar de la restricción a la translocación antes mencionada para todas las especies vegetales estudiadas, la relación de concentraciones de U en parte aérea con respecto a la concentración de U en raíz, equivalente al factor de translocación (Singh y Agrawal, 2007), alcanzó al 65,5 % aproximadamente para la concentración de U en raíz de coirón más baja (Figura 6). A medida que la concentración de U en raíz aumentó, esta relación disminuyó indicando que habría un valor máximo de concentración de U admitido en la parte aérea.

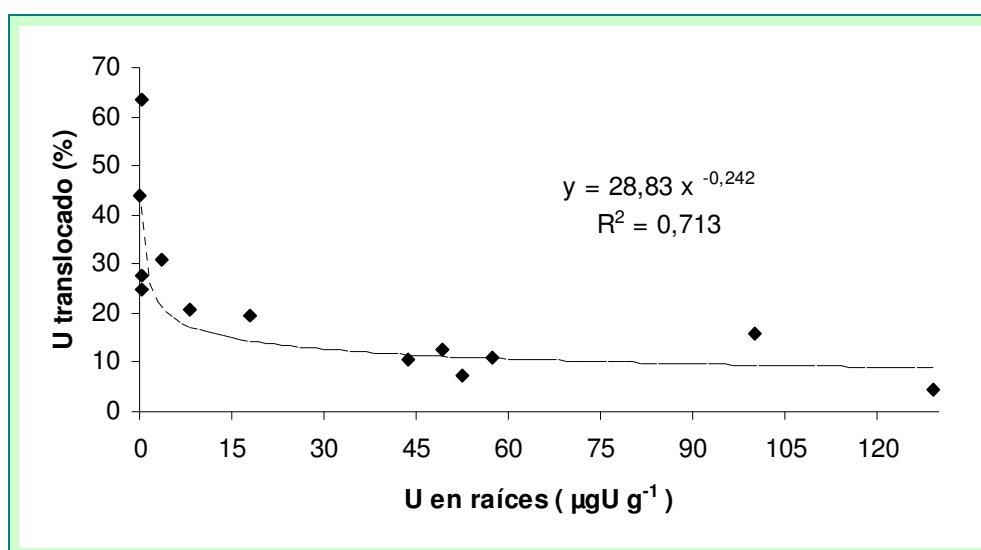


Figura 6 - Porcentaje de uranio de la raíz translocado hacia la parte aérea en relación con la concentración de uranio en raíces de coirón (*Stipa sp.*) creciendo sobre suelos con distintos niveles de uranio.

El coeficiente de transferencia del suelo a la planta, factor de concentración o factor de bioacumulación (FB_s), calculado como la relación de concentraciones en planta y en suelo, fue mucho menor en la parte aérea que en la raíz. Mientras que las raíces llegaron a acumular cerca de 2,3 veces más U que lo que se encontraba en el suelo, los factores de concentración en la parte aérea fueron menores a 0,5 (Figura 7). Como comparación se puede decir que el factor de acumulación del nitrógeno en las mismas plantas alcanzó valores entre 27 y 40 (% N en parte aérea / % N en suelo).

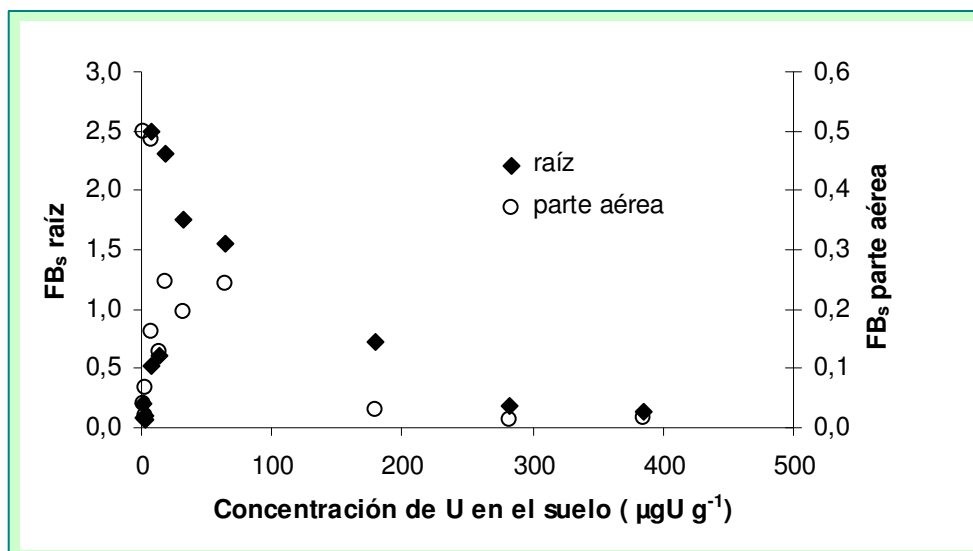


Figura 7 – Factor de bioacumulación (FB_s) de uranio en raíz y parte aérea de coirón (*Stipa sp.*).

Los valores del FB_s en raíces indican que el coirón no concentra este metal a concentraciones bajas de U en el suelo, dentro de los niveles basales habituales en los suelos de la zona. En estos casos el factor de transferencia del suelo a las raíces se mantiene por debajo de 1. En condiciones donde se encuentra un nivel bajo de U pero más elevado que el valor basal, el factor de concentración se eleva. Pero a medida que la contaminación aumenta este factor va disminuyendo, indicando un límite a la absorción indiscriminada del U.

2. TOLERANCIA Y ACUMULACIÓN DE URANIO EN UN CULTIVO HIDROPÓNICO DE REMOLACHA (*Beta vulgaris*)

2.1. Acumulación de uranio en remolacha expuesta a distintas concentraciones de uranio

2.1.1. Cambios en la solución de cultivo

El consumo de agua durante los 15 días de duración del ensayo fue alto en todos los recipientes con plantas, variando desde un 50 a un 77 % del volumen inicial de solución. Fue necesario reponer el agua consumida para asegurar que las raíces de las plantas se mantuvieran dentro de la solución nutritiva y para evitar un efecto salino secundario debido al enriquecimiento de la solución en elementos o sales que no se perdieran por volatilización o fueran consumidos por las plantas. Por otra parte, desde el punto de vista metodológico, este procedimiento resultó ventajoso para poder referir las concentraciones de los elementos medidos (U y P) en los distintos muestreos a un mismo volumen, igual en todos los recipientes.

Se podrían mencionar dos causas principales de consumo de agua: la evaporación directa y la evapotranspiración de las plantas.

La evaporación directa de agua pudo ser medida en los recipientes sin plantas, donde la pérdida de agua fue pequeña comparada con la observada en los recipientes con plantas (Tabla 6). Después de descontar el volumen de agua extraído en cada muestreo, la diferencia entre el consumo total de agua en los recipientes con y sin plantas se puede considerar producto de la evapotranspiración de las plantas (Vassil et al., 1998; Hernández-Allica, et al., 2007).

Las plantas en situación de estrés debido al contaminante consumieron menos agua y, en consecuencia, la evapotranspiración fue mayor en las plantas cultivadas en la solución nutritiva que no contenía U agregado. Ahora bien el efecto negativo en el consumo de agua fue más marcado durante los primeros días de exposición al U.

Si se calcula el consumo promedio diario de agua por evapotranspiración se observa que hubo diferencia significativa entre el consumo de agua de las plantas que crecieron sin U y las que lo hicieron en presencia del contaminante durante los primeros 9 días. Para periodos más largos, la diferencia va disminuyendo

fundamentalmente porque hay una estabilización en el consumo de las plantas sin U y una recuperación paulatina de las plantas con U (Figura 8).

Tabla 6 - Reposición de agua durante el ensayo en relación con la concentración inicial de uranio en la solución nutritiva de un cultivo hidropónico de remolacha roja (*Beta vulgaris*).

U agregado mgU L ⁻¹	Días después del agregado de Uranio Volumen de agua consumido (ml)					
	3	6	9	13	15	Total
Con plantas 0	538 ± 72	590 ± 72	560 ± 37	848 ± 62	486 ± 44	3020 ± 138
1	373 ± 84	450 ± 80	388 ± 47	687 ± 44	414 ± 77	2313 ± 197
2	309 ± 60	433 ± 63	372 ± 51	625 ± 117	387 ± 76	2128 ± 200
3	348 ± 85	454 ± 86	414 ± 76	692 ± 88	432 ± 20	2340 ± 190
5	391 ± 81	447 ± 81	420 ± 79	684 ± 160	417 ± 59	2359 ± 200
Sin plantas 1	71 ± 43	78 ± 33	31 ± 16	77 ± 46	71 ± 34	327 ± 76

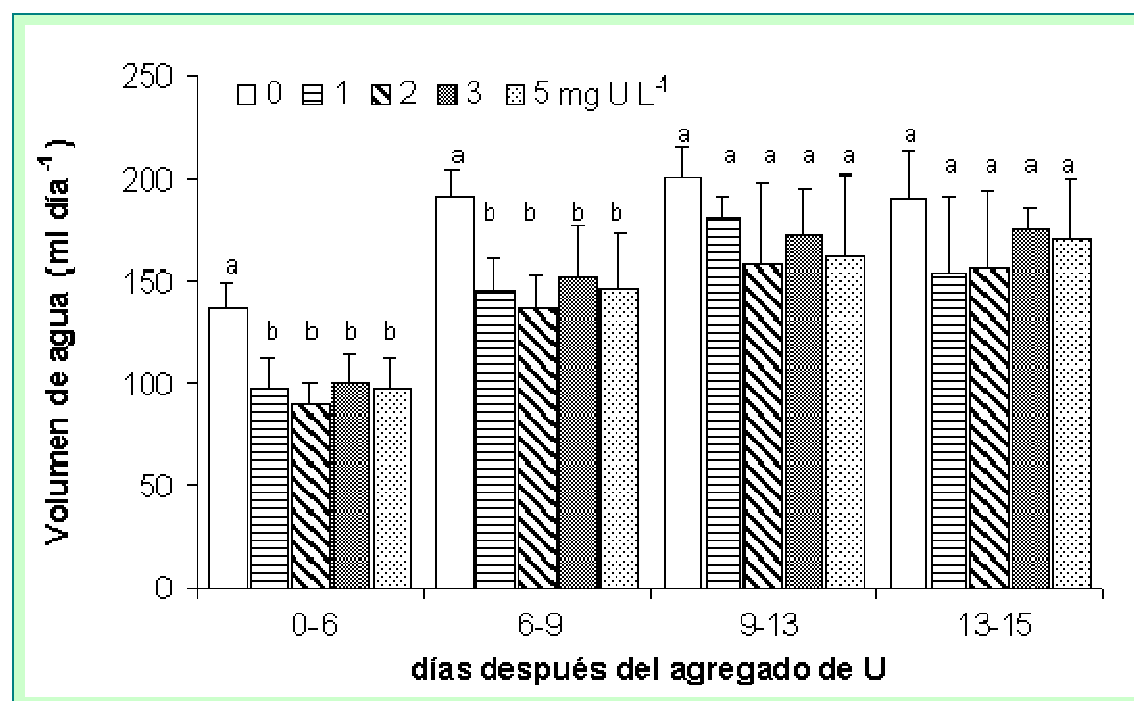


Figura 8 - Evolución del consumo diario de agua por evapotranspiración.

Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=4 repeticiones). Letras iguales dentro del mismo período de tiempo indican que no hay diferencia significativa entre medias (Test LSD de Fisher).

2.1.2. Evolución de la concentración de uranio y fósforo en la solución nutritiva durante el periodo de exposición al contaminante

La concentración de U en la solución nutritiva disminuyó drásticamente, durante las primeras 24 horas (Figura 9), cuando más del 99 % del U agregado en cada tratamiento no pudo ser medido en la solución.

Sin embargo, la desaparición de U de la solución de cultivo no puede atribuirse exclusivamente a absorción por parte de las plantas, ya que en los recipientes sin plantas también se registró una caída importante de la concentración de U, probablemente por la adsorción del U sobre las paredes del recipiente o por formación de precipitados insolubles. Al pH de la solución de cultivo ($6,11 \pm 0,21$) el U forma complejos estables con el P, además de complejos hidroxil-U, que disminuirían las especies de U totalmente solubles (Ebbs et al., 1998). En la Figura 10 se muestra la caída en la concentración de U en los recipientes que contenían 1 mgU L^{-1} inicial en presencia de plantas y sin ellas.

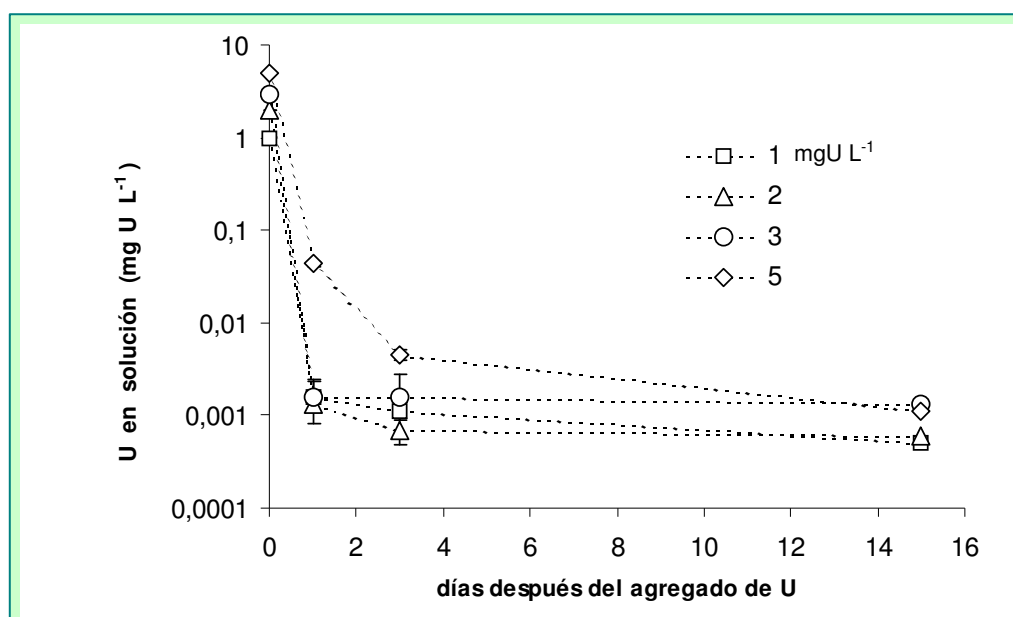


Figura 9 - Concentración de uranio en la solución nutritiva de un cultivo hidropónico de *Beta vulgaris* en función del tiempo transcurrido después del agregado de distintas concentraciones del contaminante.

El uso de una escala semilogarítmica permite apreciar mejor la forma de las curvas a pesar de la gran caída registrada en la concentración.

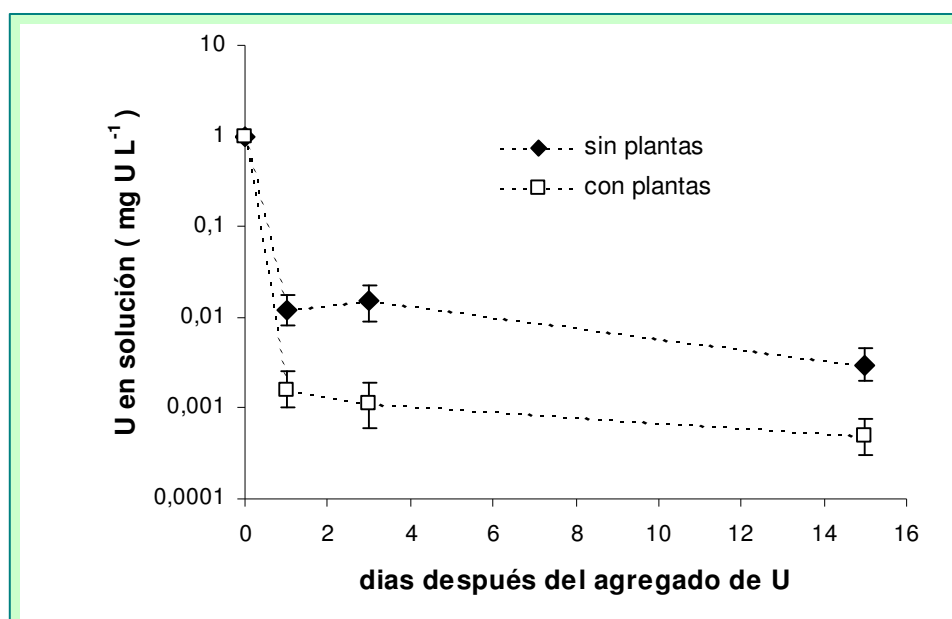


Figura 10 - Concentración de uranio en la solución nutritiva en función del tiempo transcurrido luego del agregado del contaminante, en presencia o ausencia de *Beta vulgaris*.
Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=4 repeticiones).

La concentración de P no disminuyó en el tratamiento sin plantas. En los recipientes con plantas se registró un descenso de la concentración de P similar para todos los tratamientos, debido al consumo de este elemento por las plantas. A los 15 días, no se observaron diferencias en la concentración final de P en ninguno de los recipientes con plantas independientemente del nivel de U inicial (Figura 11).

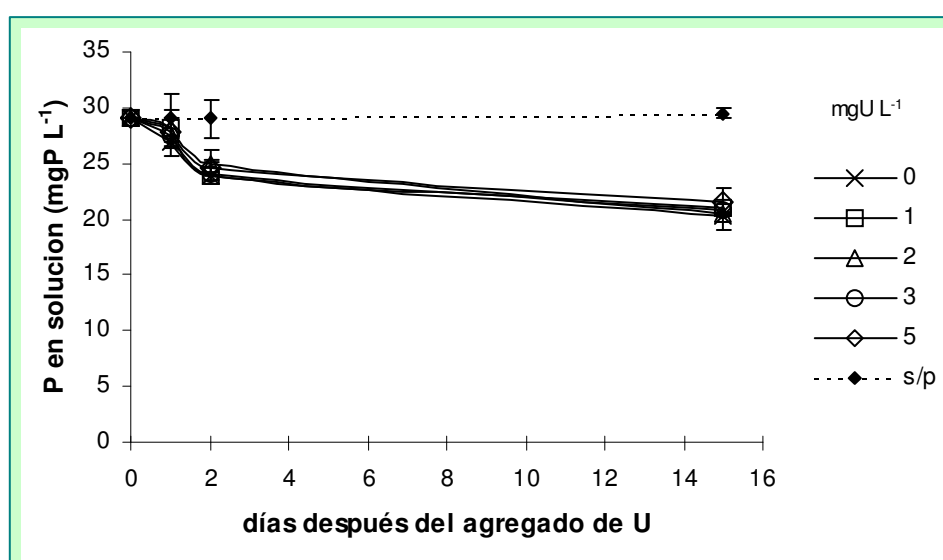


Figura 11 – Evolución de la concentración de fósforo en la solución nutritiva.
El tratamiento s/p corresponde a recipientes sin plantas, con 1 mgU L⁻¹ en solución nutritiva .
Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n= 4 repeticiones).

2.1.3. Desarrollo del cultivo y biomasa vegetal

La biomasa acumulada por la remolacha expuesta durante 15 días a la presencia de U fue menor que la alcanzada por la remolacha cultivada sin U (Tabla 7), pero solamente se registraron diferencias significativas en la biomasa seca de parte aérea y raíz (y en consecuencia en la biomasa seca total) entre los tratamientos sin U y con 2 mgU L^{-1} . Aunque no hubo diferencia significativa entre el testigo y las plantas que crecieron a concentraciones mayores, de 3 y 5 mgU L^{-1} , la estructura de las plantas con U era más abierta y las hojas diferían en el aspecto general y el color con las plantas sin U (Foto 5).



Foto 5 - Plantas de remolacha (*Beta vulgaris*), tras 15 días de exposición a concentraciones de uranio de 0, 1, 2, 3 y 5 mgU L^{-1} .

El porcentaje de materia seca con respecto a la biomasa fresca fue similar en todos los tratamientos, variando de 5,5 a 5,6 %. Tampoco se registraron diferencias significativas en la relación “Biomasa de raíz / Biomasa de parte aérea” (Tabla 7).

Tabla 7 - Biomasa, porcentaje de materia seca y relación entre biomasa de raíz y parte aérea en un cultivo hidropónico de *Beta vulgaris* con distintas concentraciones iniciales de uranio.

U agregado	Biomasa fresca	Biomasa seca			Porcentaje de materia seca	Relación* Raíz/Parte aérea
	Total	Parte aérea	Raíz	Total		
mgU L ⁻¹	g	g			%	
0	113 a	5,7 a	0,57 a	6,3 a	5,5 a	0,10 a
1	93 a	4,7 a	0,48 a	5,2 a	5,5 a	0,10 a
2	90 a	4,5 a	0,44 a	4,9 a	5,5 a	0,10 a
3	96 a	4,8 a	0,47 a	5,3 a	5,5 a	0,10 a
5	94 a	4,7 a	0,51 a	5,2 a	5,6 a	0,11 a
<i>Análisis de varianza (P < 0,05)</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	<i>ns</i>

Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa entre medias.
*Esta relación fue calculada basándose en los datos de biomasa seca.

2.1.4. Contenido de nitrógeno y fósforo

Como evaluación del estado nutricional de las plantas se analizó la concentración de N y P. En la parte aérea la concentración de N tuvo tendencia a disminuir en las plantas creciendo con U, pero sólo fue significativamente menor en las plantas creciendo en la solución con 3 mgU L⁻¹. La concentración de P, en cambio, aumentó en la parte aérea de las plantas crecidas en el medio con U. En raíz, la concentración de P aumentó significativamente en las plantas con el mayor nivel de U (Tabla 8).

Si se calcula el P total acumulado, multiplicando la concentración promedio de P en cada parte de las plantas por la biomasa promedio alcanzada se observa que la acumulación total de P es mayor sólo para los niveles de U agregado más altos (Tabla 8). A bajas concentraciones de U se produce, en realidad, una disminución del P acumulado tanto en parte aérea como en raíz como consecuencia de un menor desarrollo de la biomasa vegetal, no estadísticamente significativo, como ya se mencionó.

Tabla 8 - Nitrógeno y fósforo en tejido de *Beta vulgaris* creciendo en un cultivo hidropónico con distintas concentraciones de uranio.

Uranio agregado	Nitrógeno		Fósforo				
	Concentración	Acumulado*	Concentración		Acumulado*		
	Parte aérea		Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz	Total
mgU L ⁻¹	%	mg N	mg P g ⁻¹	mg P g ⁻¹	mg P		
0	4,7 a	267,9	7,4 c	10,4 b	42,2	5,9	48,1
1	4,6 a	216,2	7,9 cb	10,7 b	37,1	5,1	42,3
2	4,6 ab	207,0	8,7 ba	10,6 b	39,1	4,7	43,8
3	4,4 b	211,2	9,0 a	10,3 b	43,2	4,8	48,0
5	4,5 ab	211,5	9,6 a	13,6 a	45,1	6,9	52,1
LSD (P<0,05)	0,2	*	1,1	1,7	*	*	*

Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa entre medias. Test LSD de Fisher.

* Valor promedio de nitrógeno y fósforo acumulados en los tejidos vegetales

2.1.5. Acumulación de uranio en parte aérea y raíz

Al tratarse de un elemento natural, el U se encuentra en el agua (y en el suelo) en cantidades trazas. Por este motivo, en la solución a la que no se había agregado U, se midió una concentración de 0,0002 mgU L⁻¹ (0,2 ppb). Las plantas que crecieron en esta solución nutritiva sin agregado de U presentaron concentraciones de U en parte aérea y raíz a nivel trazas, con valores significativamente menores que en las plantas crecidas con U (Tabla 9).

En las remolachas que crecieron en presencia de U, la incorporación de este metal en la raíz aumentó significativamente llegando a una concentración de entre tres y cuatro ordenes de magnitud mayor que en la plantas sin agregado de U (Tabla 9).

En la parte aérea, la concentración de U en plantas crecidas con U fue significativamente más alta que en las plantas sin U, pero la incorporación de U en el tejido vegetal fue baja y muy variable, incluso respecto a lo observado en raíces, como puede apreciarse al comparar las barras de error mostradas en la Figura 12 a y la Figura 12 b.

Tabla 9 - Concentración de uranio en el tejido vegetal de parte aérea y raíz de *Beta vulgaris* creciendo en un cultivo hidropónico con distintas concentraciones de uranio.

Uranio inicial	U en parte aérea	U en raíz
mgU L ⁻¹	µgU g ⁻¹	mgU g ⁻¹
0,0002	0,26 b	0,002 e
1	0,66 a	4,4 d
2	0,64 a	9,1 c
3	0,67 a	13,0 b
5	0,67 a	26,4 a
LSD (P<0,05)	0,26	3,6

Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa entre medias. Test LSD de Fisher.

A medida que se incrementó la concentración de U en el medio de cultivo, la concentración del elemento en la parte aérea tendió a alcanzar un valor máximo, constante, mientras que la concentración de U en raíz aumentó en forma proporcional sin alcanzar un valor máximo dentro del rango de concentraciones estudiadas (Figura 12 a y b).

La ecuación de la curva que describe la concentración de U en tejido vegetal en función de la concentración en el medio es del mismo tipo tanto en raíz como en parte aérea, y es equivalente a la utilizada por otros autores para relacionar las concentraciones de radiactividad del U en plantas y sustrato (Martínez-Aguirre et al., 1997; Blanco Rodríguez et al, 2006). Esta ecuación puede generalizarse como:

$$CU_p = f CU_s^b \quad (1)$$

en donde CU_p y CU_s son la concentración de U en la planta y en el sustrato, respectivamente; b y f son parámetros a determinar en función del sustrato y la especie vegetal, siendo $0 \leq b \leq 1$. Cuando $b = 1$, se verifica una relación lineal y f es igual al factor de transferencia.

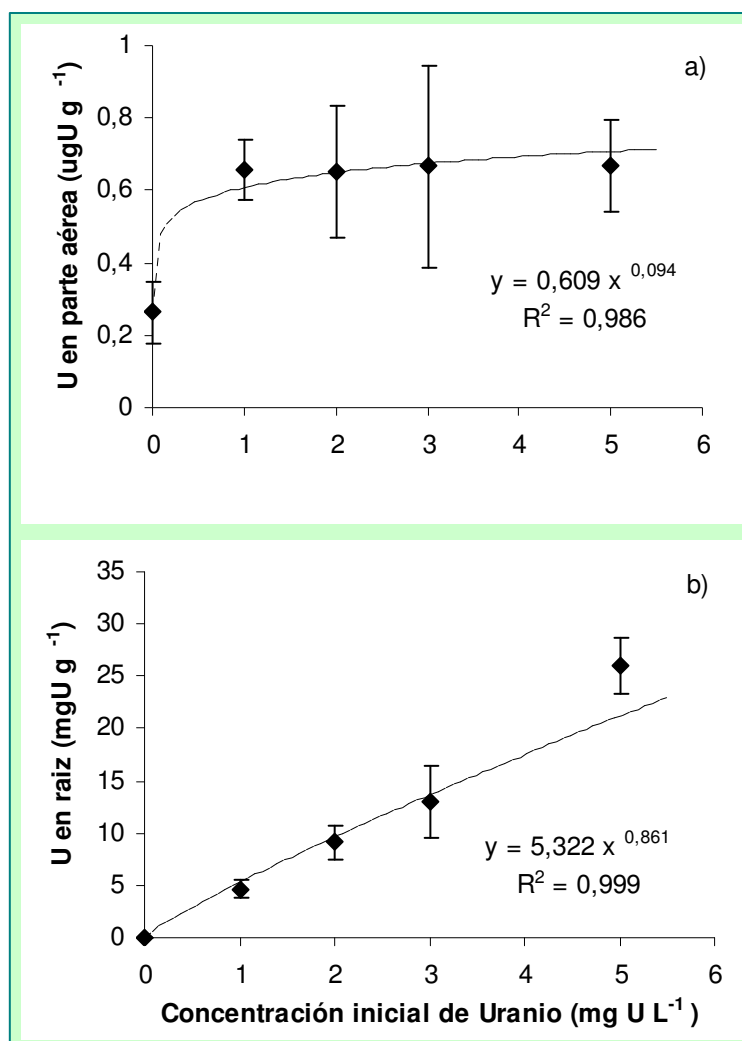


Figura 12 - Concentración de uranio en tejido vegetal, parte aérea (a) y raíz (b), de *Beta vulgaris* en relación con la concentración de la solución hidropónica donde fue cultivada.

Las barras de error corresponden al error estándar (n= 4 repeticiones).

El contenido total de U acumulado en las plantas cosechadas (Tabla 10) siguió el comportamiento ya observado en la concentración de U, observándose una acumulación muy baja de U en parte aérea sin diferencia significativa entre las plantas crecidas en el medio con U agregado. En raíz la acumulación de U es tres órdenes de magnitud mayor que el registrado en parte aérea, con excepción de las plantas cultivadas en solución nutritiva sin agregado de U.

Tabla 10 - Uranio total acumulado en la parte aérea y en la raíz de *Beta vulgaris* en relación con el uranio total agregado.

Uranio total agregado	Parte aérea	Raíz	Total
mg U	µg U total	mg U total	mg U total
0	1,4 b	0,001 e	0,002 e
4	3,1 a	2,4 d	2,4 d
8	2,9 a	4,0 c	4,0 c
12	3,2 a	6,0 b	6,0 b
20	3,2 a	14,0 a	14,0 a
LSD (P<0,05)	1,2	1,1	1,1

Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa entre medias. Test LSD de Fisher

2.1.6. Indicadores de tolerancia, toxicidad y capacidad de bioacumulación de uranio

En las plantas no contaminadas se observó un nivel de U en parte aérea compatible con una translocación moderada de este elemento. Sin embargo, en las plantas que crecieron en el medio contaminado se verificó una fuerte restricción al ingreso de U en la parte aérea de la planta. El porcentaje de U translocado no superó el 0,2 % del total de U acumulado en las raíces de las plantas que crecieron en el medio contaminado (Figura 13). Además, el porcentaje de U translocado disminuyó a medida que el contenido de U en raíz aumentó, observándose una estrecha relación de tipo asintótica (Figura 13).

El índice de tolerancia, definido como la relación entre la biomasa promedio de plantas crecidas en medio contaminado con metales pesados y la biomasa promedio de plantas crecidas sin contaminación (Salt et al., 1998; Shahaneh y Hossner, 2002), es un indicador de los efectos adversos del metal pesado sobre el crecimiento vegetal y de la capacidad del vegetal para superarlos. Aunque, como se mostró en la Tabla 7, la biomasa alcanzada en plantas cultivadas con y sin U no fue significativamente diferente, se observó en las plantas crecidas en el medio con U una tendencia a la reducción de biomasa total de 74 a 85 % (Tabla 11). Se calculó también el índice de tolerancia basándose en el contenido de N en la parte aérea, considerando que el N es un indicador del nivel nutricional, proteico y fisiológico. Los índices de tolerancia

calculados sobre la base del contenido de N son del mismo orden que los obtenidos considerando la biomasa total (Tabla 11).

Coincidente con los bajos porcentajes de translocación de U hacia la parte aérea, el factor de bioacumulación en hidroponia (FB_H) en biomasa aérea, de plantas crecidas en presencia de U, fue siempre menor a 1. Por otra parte, como el contenido de U en hojas y tallos se mantuvo en valores sin diferencia significativa, el FB_H bajó a medida que aumentaba la concentración en la solución de cultivo (Tabla 11). En la misma Tabla se observa que el FB_H en raíz, en cambio, fue muy alto, indicando que la raíz de la remolacha puede concentrar el U entre 4.324 y 5.373 veces el contenido de este contaminante en la solución de cultivo. Por otra parte si, a partir de los valores registrados en la Tabla 9, se calcula el FB_H para las plantas no contaminadas, se observa que la remolacha puede concentrar el U presente a nivel de trazas en el agua, alcanzando un FB_H promedio de 1.300 en la parte aérea y 10.000 en las raíces.

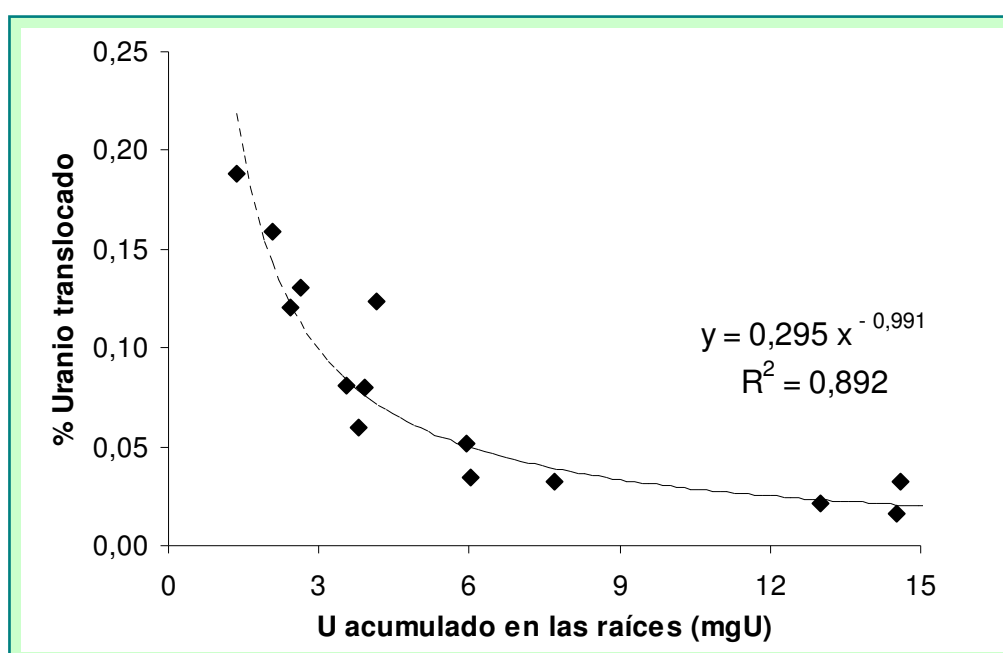


Figura 13 - Porcentaje de uranio de la raíz translocado hacia la parte aérea en relación con el contenido total de uranio en raíces de *Beta vulgaris*, creciendo en un cultivo hidropónico con distintas concentraciones de uranio.

Tabla 11 – Índices de tolerancia (IC) y factor de bioacumulación (FB_H) de uranio en plantas de remolacha (*Beta vulgaris*), en un cultivo hidropónico con distintas concentraciones iniciales de uranio

Uranio agregado mgU L ⁻¹	IC		FB _H *	
	Biomasa total %	Nitrógeno total en parte aérea %	Parte aérea	Raíz
1	82	81	0,66	4.429
2	74	77	0,33	4.562
3	85	80	0,22	4.324
5	83	80	0,13	5.273

*FB_H calculado como la relación entre mgU.kg⁻¹ tejido vegetal y mgU.L⁻¹ de solución de cultivo.

2.1.7. Recuperación del uranio agregado

La recuperación de U en las plantas alcanzó el 70 % del U agregado en la solución nutritiva con la concentración de U más elevada. En las otras concentraciones, la recuperación varió entre el 50 y el 60 % (Tabla 12). De este U recuperado en las plantas, la mayoría se encontraba en las raíces.

Tabla 12 - Recuperación de uranio en la solución de cultivo y en las plantas de remolacha (*Beta vulgaris*) después de 15 días de exposición a distintas concentraciones de uranio.

Uranio total agregado mg U	Recuperación en solución %	Recuperación en plantas %
4	0,06	60
8	0,03	50
12	0,05	50
20	0,02	70

Al final de la experiencia la concentración de U en la solución de cultivo había disminuido mucho y la recuperación en solución fue muy pequeña (Tabla 12), aun cuando se incluyó el contenido de U en el agua de lavado de las raíces en el cálculo de recuperación. Entre el 30 y 40 % del U no fue recuperado ni en la solución ni en las plantas, probablemente debido a la formación de compuestos que acomplejan al U, provocando su insolubilidad y precipitación.

2.2. Efecto del fósforo en la acumulación de uranio y en la tolerancia de remolacha

La exclusión del P del medio de cultivo no produjo diferencia significativa en la biomasa aérea de las plantas en ausencia de U (Tabla 13), aunque se observó una tendencia no significativa al atraso en la aparición de nuevas hojas (Figura 14).

El agregado de U a la solución completa de Hoagland, conteniendo P como fosfato de potasio, condujo también a un número menor de hojas que las plantas control, pero no significativa estadísticamente. En cambio, la presencia de U en ausencia del anión fosfato fue determinante de una serie de síntomas de toxicidad como falta de crecimiento, marchitez y caída de hojas, que obligaron a una cosecha anticipada de las plantas con respecto al ensayo antes descrito (Sección 2.1). Efectivamente las plantas estuvieron en contacto con U solamente 7 días, al cabo de los cuales, las plantas con U a las que se les había quitado la provisión de P mostraron un número de hojas significativamente menor que el resto de los tratamientos (Figura 14). La biomasa seca de la parte aérea de estas plantas fue más pequeña y la relación peso seco de raíz / peso seco de parte aérea más elevada, asociada a la mayor concentración de U en parte aérea (Tabla 13).

Tabla 13 - Efecto de la presencia del anión fosfato en el medio de crecimiento sobre la biomasa y la absorción de uranio en plantas de remolacha roja.

Tratamiento	Biomasa seca*		Relación de biomasa**	Concentración de Uranio	
	Parte aérea	Raíz		Parte aérea	Raíz
	----- mg -----			$\mu\text{g U g}^{-1}$	mg U g^{-1}
C (-U +P)	731 a	75 a	0,10 b	0,26 c	0,001 c
-U -P	765 a	84 a	0,10 b	0,29 c	0,001 c
+U +P	788 a	82 a	0,10 b	0,83 b	11,90 a
+U -P	544 b	91 a	0,17 a	1,66 a	9,23 b
LSD (P< 0.05)	159	34	0,03	0,38	2,51

*Biomasa de 12 plantas por tratamiento

** Relación de biomasa seca de raíz / biomasa seca de parte aérea

Tratamientos: C: control (sin U y con P); -U -P: solución hidropónica sin P ni U; +U +P: con U y P; +U -P: con U, sin P. Concentración de U en el medio de cultivo: $3,3 \text{ mgU L}^{-1}$.

Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa entre medias. Test LSD de Fisher.

La absorción de U fue significativamente más alta en las plantas que crecieron en el medio con agregado de U tanto en ausencia como en presencia de P. Pero la concentración de U fue menor en ausencia de P, con una relación entre concentración en raíces y concentración en la solución (FB_H) de 2.800 en lugar del valor de 3.600 registrado para las plantas que crecieron siempre con P.

La concentración de U en raíces fue mucho más alta que en la parte aérea tanto en presencia o ausencia de P, con una relación porcentual del U en parte aérea con respecto al U en raíz (factor de translocación) de 0,007 % en las plantas con P y 0,018 % en las plantas sin P. La mayor concentración de U en la parte aérea de las plantas sin P podría indicar un fallo en la restricción a la translocación o que la ausencia de P en el medio impide la formación de compuestos secuestradores de U en raíces, ya sea en el interior de las mismas o externamente, sobre la pared celular.

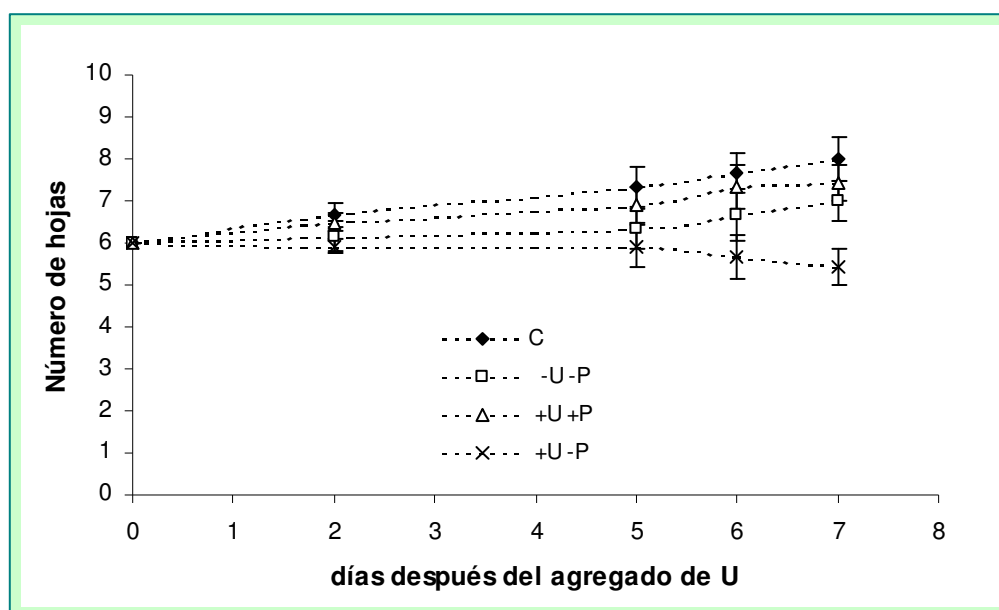


Figura 14 - Efecto de la presencia del anión fosfato y de uranio en el medio de crecimiento sobre la aparición de nuevas hojas en remolacha roja.

Tratamientos:

C: control, con P y sin agregado de U;

-U -P: solución hidropónica sin P ni U;

+U+P: con U y P;

+U -P: con U, sin P. Concentración de U en el medio de cultivo: $3,3 \text{ mgU L}^{-1}$.

Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=12).

2.3. Efecto del tiempo de exposición al uranio sobre el crecimiento, contenido hídrico, niveles de pigmentos fotosintéticos y actividad enzimática

2.3.1. Acumulación de biomasa vegetal

En la Figura 15 se muestra la evolución del peso fresco de la parte aérea (Figura 15 a) y raíz (Figura 15 b) a lo largo del tiempo de cultivo de las plantas de remolacha sin U y expuestas a una concentración de U de 3,3 mgU.L⁻¹.

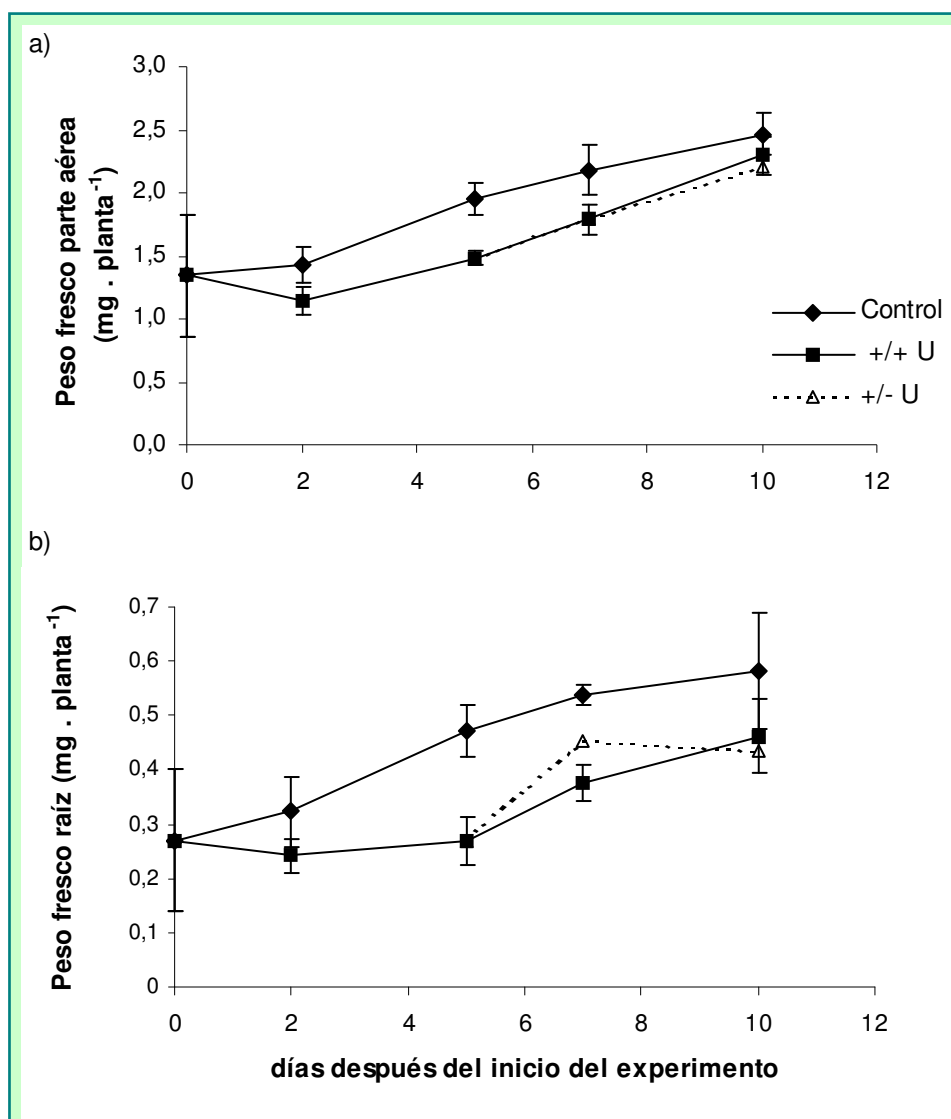


Figura 15 - Variaciones de peso fresco de parte aérea y raíz de remolacha roja sometida a los distintos tratamientos en el transcurso de ensayo.

Control: plantas en solución Hoagland completa sin U; +/+U: plantas en solución Hoagland con agregado de U; +/-U: plantas crecidas en presencia de U durante los primeros 5 días y regresadas en el día 5 a un medio sin uranio.

Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=20).

El agregado de U provocó una disminución en la acumulación de biomasa durante los primeros días de exposición. Esta disminución de biomasa fue significativa a los dos días de agregado el contaminante en la parte aérea (Tabla 14), mientras que en las raíces el descenso de la biomasa fresca no fue significativo en los primeros días (Tabla 15), debido a una gran variabilidad en este parámetro. A los 5 días ya se observó una biomasa de raíces significativamente menor en las plantas expuestas a U.

Tabla 14 - Efecto del agregado de uranio y de su posterior eliminación en el medio de cultivo sobre el peso fresco de la parte aérea de remolacha roja.

Tratamiento	Tiempo de crecimiento (días)				
	0	2	5	7	10
	Peso fresco por planta (mg planta ⁻¹)				
Control	1,35	1,42 a	1,96 a	2,18 a	2,47 a
+ / + U		1,14 b	1,48 b	1,79 b	2,29 a
+ / - U				1,79 b	2,21 a

Tratamientos: Control: plantas en solución Hoagland completa sin U; +/+U: plantas en solución Hoagland con agregado de U; +/-U: plantas crecidas en presencia de U durante los primeros 5 días y regresadas en el día 5 a un medio sin uranio.
Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa entre medias (P<0,05). Test de Tukey.

Tabla 15 - Efecto del agregado de uranio y de su posterior eliminación en el medio de cultivo sobre el peso fresco de raíces de remolacha roja.

Tratamiento	Tiempo de crecimiento (días)				
	0	2	5	7	10
	Peso fresco por planta (mg planta ⁻¹)				
Control	0,27	0,32 a	0,47 a	0,54 a	0,58 a
+ / + U		0,24 a	0,27 b	0,37 c	0,46 ab
+ / - U				0,45 b	0,43 b

Tratamientos: Control: plantas en solución Hoagland completa sin U; +/+U: plantas en solución Hoagland con agregado de U; +/-U: plantas crecidas en presencia de U durante los primeros 5 días y regresadas en el día 5 a un medio sin uranio.
Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa entre medias (P<0,05). Test de Tukey.

Al final del experimento (10 días), no hubo diferencias significativas en el peso fresco de parte aérea ni de raíces entre tratamientos con y sin U. Este resultado es compatible con los mostrados en la Tabla 7 para el primer experimento descrito, donde se no se observó diferencia significativa de la biomasa aérea o de raíces después de 15 días de exposición a distintas concentraciones de U.

Con respecto a la posible recuperación de las plantas al retirar el uranio del medio (Tratamiento + / - U), no se observó un efecto positivo claro. En la parte aérea el peso fresco acumulado no llegó a igualar al de las plantas control sin uranio y fue similar al alcanzado por las plantas creciendo en un medio con U. En raíces, la biomasa aumentó a los dos días de retirado el contaminante, pero esa primera recuperación no se mantuvo en el tiempo, observándose siempre valores de acumulación de biomasa de raíces más bajos que el control sin U (Figura 15 y Tablas 14 y 15).

La disminución de la biomasa vegetal en los primeros días de exposición al U se ve reflejada también en el grado de inhibición del crecimiento (GIC), que alcanza el 43 % en raíces y al 24 % en parte aérea a los cinco días de tratamiento (Tabla 16). A los 10 días el GIC continúa siendo alto (21 %) en raíces expuestas al U, remarcando que la ausencia de diferencias significativas en la biomasa acumulada se debe fundamentalmente a la variabilidad de los datos que, a su vez, podrían ser causa de una respuesta diferencial por las distintas plantas a la intoxicación.

Tabla 16 - Grado de inhibición del crecimiento en plantas de remolacha expuestas a uranio.

Parte de la planta	Tiempo de exposición (días)			
	2	5	7	10
	Grado de inhibición de crecimiento (%)			
Parte aérea	20	24	18	7
Raíz	25	43	31	21

2.3.2. Contenido hídrico relativo

El contenido hídrico relativo de las hojas de remolacha también se vio afectado por la presencia de U (Figura 16 y Tabla 17). En los primeros días de

exposición al contaminante se observó una fuerte disminución del contenido hídrico relativo que se comenzó a recuperar a los 7 días.

Cuando se retiró el U del medio de cultivo se observó la recuperación del contenido hídrico a los 7 días de ensayo, 2 días después de retirar el U del medio, alcanzando un valor intermedio al presentado entre las plantas control y las plantas bajo el tratamiento con (+/- U). Sin embargo, la gran variabilidad observada en las mediciones en estas plantas (ver barras de error en la Figura 16) enmascaró la significación del resultado. Si se realiza una comparación entre los valores de las plantas control y las plantas con U siempre (+/+ U) se observa que el contenido hídrico de las plantas control es siempre mayor a un nivel de significación de $P \leq 0,05$.

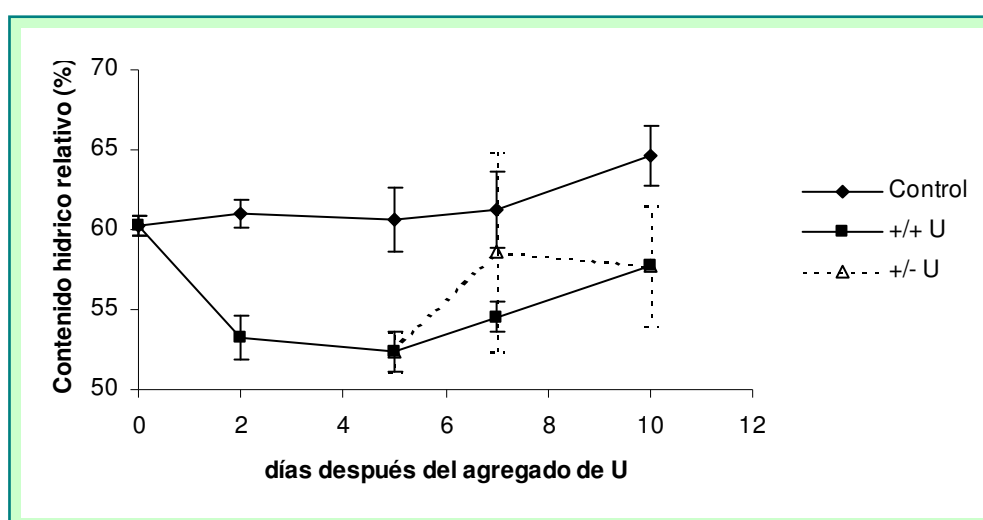


Figura 16 - Contenido hídrico relativo en hojas de remolacha roja expuesta a uranio, comparado con plantas control sin agregado de contaminante.

Tratamientos: Control: plantas en solución Hoagland completa sin U; +/+U: plantas en solución Hoagland con agregado de U; +/-U: plantas crecidas en presencia de U durante los primeros 5 días y regresadas en el día 5 a un medio sin uranio. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n= 4 repeticiones).

El efecto positivo de la eliminación del contaminante del medio no progresó en el tiempo. A los 10 días de ensayo, las plantas control, crecidas permanentemente sin U, mostraron una tendencia a aumentar su contenido hídrico relativo en hojas, mientras que las plantas recuperadas del medio contaminado mostraron un ligero descenso, lo que resultó en una diferencia significativa en el contenido hídrico relativo, con un valor medio más alto en las plantas control.

Tabla 17 - Efecto del agregado de uranio y de su posterior eliminación en el medio de cultivo sobre el contenido hídrico relativo en hojas de remolacha roja.

Tratamiento	Tiempo de crecimiento (días)				
	0	2	5	7	10
	Contenido hídrico relativo (%)				
Control	60	61 a	61 a	61 a	65 a
+ / + U		53 b	52 b	55 b	57 b
+ / - U				59 a	58 b

Tratamientos: Control: plantas en solución Hoagland completa sin U; +/+U: plantas en solución Hoagland con agregado de U; +/-U: plantas crecidas en presencia de U durante los primeros 5 días y regresadas en el día 5 a un medio sin uranio.

Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa entre medias ($P < 0,05$). Test de Tukey.

2.3.3. Contenido de pigmentos fotosintéticos en las hojas

En las hojas de las plantas control, sin U, la concentración total de clorofilas, $Clor_{(a+b)}$, aumentó a medida que las plantas crecieron (Tabla 18 y Figura 17), correspondiendo a la necesidad de cubrir una demanda fotosintética mayor a medida que la planta crece y requiere más fotosintatos. Tras el agregado de U y hasta después del día 7, las plantas no modificaron su concentración total de clorofila, que si bien aumentó a los 10 días de la incubación, se mantuvo por debajo de los niveles presentes en las plantas control que crecieron sin uranio (Tabla 18).

Tabla 18 - Contenido de clorofila total a + b, $Clor_{(a+b)}$, en hojas de remolacha roja (*Beta vulgaris*) en relación al tratamiento recibido y al tiempo de cultivo transcurrido.

Tratamiento	Tiempo de crecimiento (días)				
	0	2	5	7	10
	$Clor_{(a+b)}$ ($mg\ g^{-1}$ PF)				
Control	0,77	0,89 a	0,99 a	1,15 a	1,19 a
+ / + U		0,72 b	0,70 b	0,70 c	1,01 b
+ / - U				0,86 b	0,96 b

Tratamientos: Control: plantas en solución Hoagland completa sin U; +/+U: plantas en solución Hoagland con agregado de U; +/-U: plantas crecidas en presencia de U durante los primeros 5 días y regresadas en el día 5 a un medio sin uranio. PF: peso fresco.

Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa entre medias ($P < 0,05$). Test de Tukey.

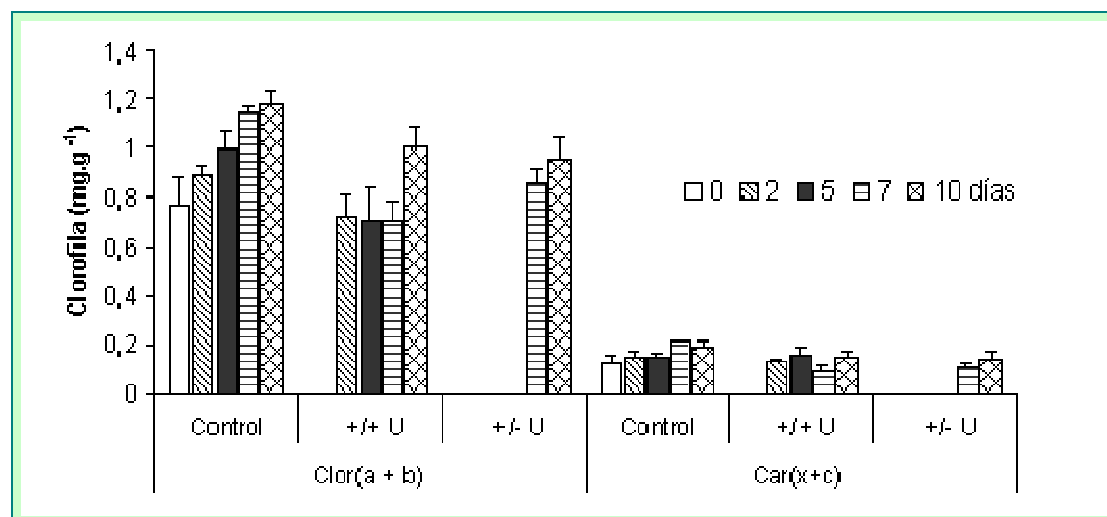


Figura 17 – Contenido de clorofila, $Clor_{(a+b)}$, y pigmentos carotenoides, $Car_{(x+c)}$, en hojas de remolacha roja (*Beta vulgaris*) en relación al tratamiento recibido y al tiempo de exposición a uranio.

Tratamientos: Control: plantas en solución Hoagland completa sin U; +/+U: plantas en solución Hoagland con agregado de U; +/-U: plantas crecidas en presencia de U durante los primeros 5 días y regresadas en el día 5 a un medio sin uranio. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n= 4 repeticiones)

La concentración de los pigmentos carotenoides $x + c$, $Car_{(x+c)}$, no sufrió una disminución significativa durante los primeros días de crecimiento en medio con uranio, pero a los 7 días del tratamiento hubo un descenso, manteniéndose la diferencia significativa hasta el final del ensayo (Figura 17 y Tabla 19).

Tabla 19 - Contenido de pigmentos carotenoides totales $x + c$, $Car_{(x+c)}$, en hojas de remolacha roja (*Beta vulgaris*) en relación al tratamiento recibido y al tiempo de cultivo transcurrido.

Tratamiento	Tiempo de crecimiento (días)				
	0	2	5	7	10
	$Car_{(x+c)}$ (mg g⁻¹ PF)				
Control	0,13	0,15 a	0,15 a	0,21 a	0,19 a
+ / + U		0,13 a	0,16 a	0,09 b	0,15 b
+ / - U				0,11 b	0,14 b

Tratamientos: Control: plantas en solución Hoagland completa sin U; +/+U: plantas en solución Hoagland con agregado de U; +/-U: plantas crecidas en presencia de U durante los primeros 5 días y regresadas en el día 5 a un medio sin uranio. PF: peso fresco. Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa entre medias (P<0,05). Test de Tukey.

En las Tablas 20 y 21 se muestran los valores de las concentraciones de clorofila *a* y *b*, respectivamente.

Tabla 20 - Contenido de clorofila *a*, Clor_a, en hojas de remolacha roja (*Beta vulgaris*) en relación al tratamiento recibido y al tiempo de cultivo transcurrido.

Tratamiento	Tiempo de crecimiento (días)				
	0	2	5	7	10
	Clor _a (mg g ⁻¹ PF)				
Control	0,48	0,59 a	0,61 a	0,71 a	0,76 a
+ / + U		0,48 b	0,46 b	0,34 c	0,58 b
+ / - U				0,47 b	0,57 b

Tratamientos: Control: plantas en solución Hoagland completa sin U; +/+U: plantas en solución Hoagland con agregado de U; +/-U: plantas crecidas en presencia de U durante los primeros 5 días y regresadas en el día 5 a un medio sin uranio. PF: peso fresco.
Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa entre medias (P<0,05). Test de Tukey.

Tabla 21 - Contenido de clorofila *b*, Clor_b, en hojas de remolacha roja (*Beta vulgaris*) en relación al tratamiento recibido y al tiempo de cultivo transcurrido.

Tratamiento	Tiempo de crecimiento (días)				
	0	2	5	7	10
	Clor _b (mg g ⁻¹ PF)				
Control	0,29	0,30 a	0,38 a	0,38 a	0,43 a
+ / + U		0,24 b	0,24 b	0,34 a	0,43 a
+ / - U				0,39 a	0,39 a

Tratamientos: Control: plantas en solución Hoagland completa sin U; +/+U: plantas en solución Hoagland con agregado de U; +/-U: plantas crecidas en presencia de U durante los primeros 5 días y regresadas en el día 5 a un medio sin uranio. PF: peso fresco.
Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa entre medias (P<0,05). Test de Tukey.

La presencia de Uranio en el medio de cultivo redujo tanto los niveles de clorofila *a* como de clorofila *b*, aunque con distinta magnitud. Mientras el efecto reductor sobre la clorofila *a* se mantiene durante todo el ensayo (Tabla 20), el contenido de clorofila *b* aumenta después del séptimo día de exposición al U y se llega a contenidos similares a los presentes en las plantas control (Tabla 21).

Sin embargo, si se estudia la variación (V_{Clor_a} y V_{Clor_b} , respectivamente) temporal (incremento o reducción) del contenido de las clorofilas *a* y *b* después del agregado de U, con respecto al contenido inicial de clorofilas en las hojas, se puede observar que se produjo una pérdida inicial mayor de la clorofila *b*, seguida por pérdida de la clorofila *a* y una posterior recuperación de ambas clorofilas (Figura 18).

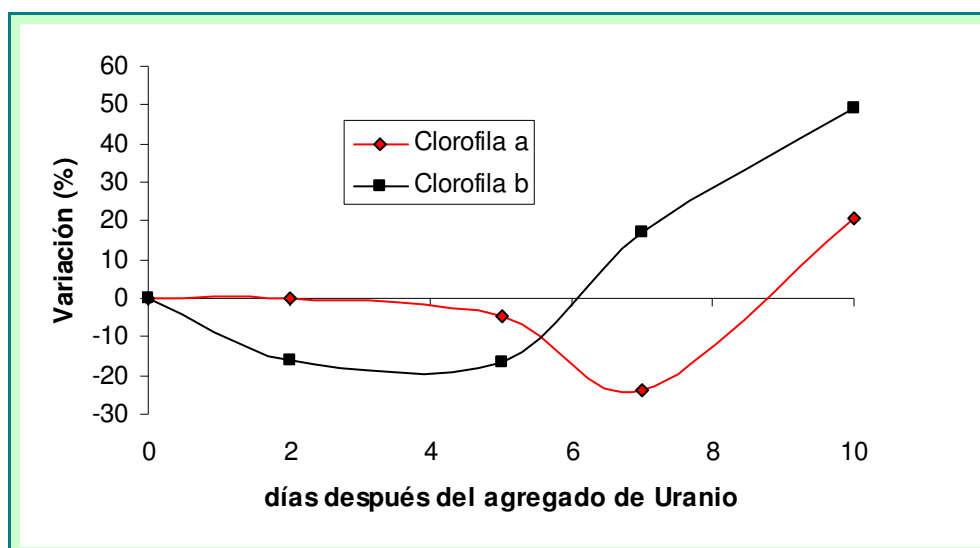


Figura 18 - Variación porcentual de las clorofilas *a* y *b* después del agregado de uranio, en función del tiempo de ensayo transcurrido.

El efecto negativo del U en los niveles de pigmentos fotosintéticos no es revertido totalmente por la eliminación del contaminante, ya que si bien se observó un aumento de la concentración de todos los pigmentos fotosintéticos tras el paso de las plantas a un medio no contaminado, no se llegó a los niveles presentes en las plantas control (Figura 17, Tablas 18 y 19), permaneciendo la concentración total de clorofilas *a+b* en valores entre 19 y 25 % más bajos que el control y los pigmentos carotenoides, con una reducción entre 26 y 45 %. Sin embargo, la falta de recuperación en las clorofilas totales se debe exclusivamente a valores menores de clorofila *a*, ya que los niveles de clorofila *b*, una vez eliminado el contaminante del medio, no presenta diferencias significativas con los de las plantas control.

2.3.4. Actividad del enzima ascórbico peroxidasa

La actividad del enzima ascórbico peroxidasa (APX) se vio significativamente aumentada inmediatamente después del agregado de U en el medio de cultivo, con una ligera disminución en el día quinto de la experiencia y un nuevo aumento al prolongarse el estrés provocado por la presencia del U (Tabla 22 y Figura 19). Las plantas control mantuvieron una actividad enzimática similar a lo largo del ensayo.

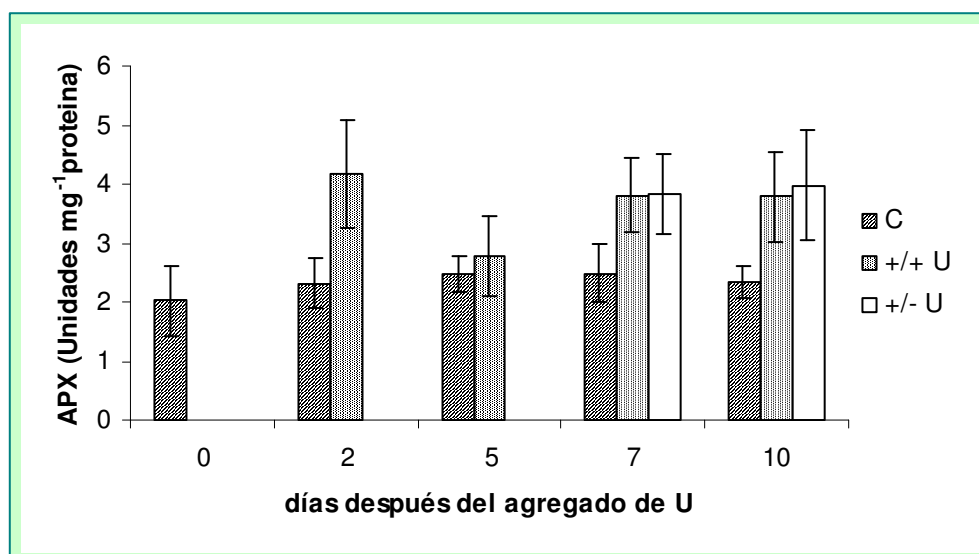


Figura 19 - Actividad del enzima ascórbico peroxidasa en hojas de remolacha roja (*Beta vulgaris*) en relación al tratamiento recibido y al tiempo de exposición a Uranio.

Tratamientos: Control: plantas en solución Hoagland completa sin U; +/+U: plantas en solución Hoagland con agregado de U; +/-U: plantas crecidas en presencia de U durante los primeros 5 días y regresadas en el día 5 a un medio sin uranio. Las barras de error corresponden a la desviación estándar (n=4 repeticiones).

Tabla 22 - Análisis estadístico de la actividad ascórbico peróxidasa (APX) en hojas de remolacha roja (*Beta vulgaris*) en relación al tratamiento recibido y al tiempo de cultivo transcurrido.

Tratamiento	Tiempo de crecimiento (días)				
	0	2	5	7	10
	APX (Unidades mg ⁻¹ proteína)				
Control	2,03	2,32 b	2,47 a	2,49 b	2,33 b
+ / + U		4,18 a	2,78 a	3,81 a	3,78 a
+ / - U				3,82 a	3,98 a

Tratamientos: Control: plantas en solución Hoagland completa sin U; +/+U: plantas en solución Hoagland con agregado de U; +/-U: plantas crecidas en presencia de U durante los primeros 5 días y regresadas en el día 5 a un medio sin uranio. Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencia significativa entre medias (P<0,05). Test de Tukey.

La eliminación del contaminante del medio de cultivo no logró ejercer un efecto de disminución de la actividad enzimática, probablemente porque la situación de estrés podría estar relacionada con el U ya incorporado a la planta o adsorbido a la pared celular de las raíces que se mantendría en el sistema planta-medio de cultivo.

V - DISCUSIÓN

1. TOLERANCIA Y BIOACUMULACIÓN DE URANIO EN CONDICIONES DE CAMPO

El movimiento de suelo y rocas producido durante la explotación minera así como la creación de las escombreras con materiales de distinta granulometría, significan la aparición de nuevas superficies o sustratos sin cobertura que pueden ser colonizados por especies vegetales pioneras, comenzando una sucesión primaria inducida por el hombre (Martínez-Ruiz et al., 2001).

Los suelos del área de estudio son suelos de montaña, rocosos, intercalados con Paleortides Típicos (en los interfluvios) y Torrifluvents Típicos (en los sectores cercanos a los cauces de agua), moderadamente susceptibles a la erosión hídrica y eólica (Hudson et al., 1990). Las características climáticas del predio minero corresponden a las del Piedemonte Andino, seco, escasa precipitación y árido (Donati y Gallucci, 1984). Estas características hacen más difícil la revegetación o colonización espontánea de las escombreras.

La elección de especies vegetales de las que se tomaron muestras en este estudio fue realizada en función de su presencia en las zonas contaminadas y el muestreo no fue exhaustivo en cuanto al número de especies vegetales en áreas no contaminadas. Específicamente en la escombrera más contaminada se muestrearon todas las especies vegetales presentes (sólo coirón), mientras que en las áreas de suelo no disturbado se buscaron únicamente las especies ya prefijadas por su presencia y, evidentemente, tolerancia al U en las áreas con contaminación intermedia. Sin embargo, los distintos puntos de muestreo correspondieron también a sustratos y escombreras armadas en diferentes momentos de la explotación minera y con tiempos de liberación para la colonización espontánea diferentes. Por lo tanto, existen al menos dos factores que están influyendo en la presencia de especies vegetales: por un lado la posible toxicidad del U, claramente marcada en los sustratos de mayor contaminación por la menor cobertura vegetal y, por otro lado, el tiempo transcurrido desde el inicio de la sucesión de revegetación. En condiciones de hábitat extremos la recuperación hasta el estado final es lenta tanto en tiempo como en cambio de especies vegetales. En sustratos de minas de Uranio, el tiempo de revegetación está también relacionado con el tamaño del sustrato y es más rápida cuando los residuos que conforman el sustrato han sido rotos y presentan una granulometría menor (Martínez-Ruiz et al., 2001).

La presencia de *Tagetes minuta* en sustratos de las escombreras contaminados pero no en los suelos naturales (Tabla 4) podría estar relacionada con

la secuencia de la sucesión, ya que esta planta nativa de América del Sur, es considerada una especie pionera, con gran afinidad por sustratos disturbados (Ghersa y León, 1999; Visintin y Bernardello, 2005). Esta especie, conocida en Mendoza como “chil-chil” (Ruiz Leal, 1972; Subsecretaría de Medio Ambiente de Mendoza, 2006) y en otras partes de Argentina como “Chinchilla” (Campos, 1998; Visintin y Bernardello, 2005) produce terpenoides y tiofenos (Gil et al., 2002) que son biocidas y defienden a la planta de predadores pero que también serían metabolitos relacionados con la tolerancia al estrés en plantas invasoras de ambientes degradados (Guglielmini et al., 2007).

Las dos especies de jarilla son muy frecuentes en los suelos naturales de la región. Aunque es habitual encontrarlas en suelos pedregosos, el gran tamaño de los materiales que conforman el sustrato de las escombreras y la escasa profundidad de material fino podría dificultar el crecimiento radical de estas especies arbustivas. Ruiz Leal (1972) menciona la detección de U en las cenizas de jarilla y la ocurrencia de *Larrea cuneifolia* (especie emparentada con las estudiadas) en el yacimiento uranífero Los Chañares, en la Sierra Pintada, cerca del lugar de toma de muestras en el presente trabajo. Sin embargo, este autor no indica el nivel de U en el suelo o en las plantas. Tanto *L. nitida* como *L. divaricata* estuvieron presentes solamente en sustratos con concentraciones bajas de U (Tabla 4) pero sus raíces muestran los valores más altos de concentración de U (Tabla 5). Si estas plantas no fueran tolerantes al U y no tuvieran mecanismos de exclusión suficientemente eficientes, el U podría ingresar al tejido vegetal provocando daños por toxicidad, impidiendo su prosperidad en medios altamente contaminados.

El coirón es un pasto duro de amplia distribución en ambientes áridos y semiáridos de Argentina, evidentemente tolerante al U. Se lo encontró en los suelos naturales y en todas las escombreras incluyendo las escombreras de colas de mineral, con un sustrato de granulometría más fina pero con mayor contaminación. Si bien la concentración de U en parte aérea y raíz de coirón aumentó a medida que se incrementaban los niveles de U en el sustrato, no se registró una relación lineal entre concentraciones de U en tejido vegetal y en el sustrato para todo el rango de valores de U en suelo analizados, como asumen distintos autores (Sheppard y Sheppard, 1985; Martínez-Aguirre et al., 1997; Vera Tomé et al., 2003) que debería producirse para aplicar el concepto de transferencia suelo-planta constante. En nuestro caso la relación puede considerarse lineal para concentraciones de U en suelo menores de 70 $\mu\text{gU g}^{-1}$ de suelo. En realidad, esta falta de linealidad está documentada para el U

natural y, por lo tanto, el factor de transferencia, o factor de bioacumulación, no es constante, siendo más alto cuando la concentración de U en el sustrato es más baja (Martínez-Aguirre et al., 1997; Vera Tomé et al., 2003; Duquène et al., 2006). Sin embargo, la hipótesis de linealidad entre la concentración de U en tejido vegetal y la concentración de este contaminante en el medio de cultivo se verifica en cultivos hidropónicos de girasol (Blanco Rodríguez et al., 2006) y esa relación se acerca a la linealidad, dentro de cierto rango de concentración de U en la solución de cultivo, en remolacha, como veremos más adelante.

En toda la bibliografía comentada anteriormente el factor de transferencia (o TF, del inglés "Transfer Factor") fue calculado como la relación entre la concentración de radioactividad en tejido vegetal y la concentración de radioactividad medida en el sustrato. Shahandeh y Hossner (2002) utilizan el término coeficiente de bioacumulación para referirse a la relación de las concentraciones químicas media de U en planta y en suelo o agua. En el presente trabajo el U también fue determinado químicamente y utilizamos el término de factor de bioacumulación en suelo o FB_S , para las plantas crecidas sobre suelos o sustratos sólidos. Los coeficientes de bioacumulación y los valores de FB_S son comparables con los de TF, ya que se trata de un parámetro sin unidades calculado a partir de variables que tienen una equivalencia conocida. Efectivamente, como se trata de U natural, existe una relación definida entre concentración química y radioactividad, de modo que 1 μg de U natural tiene una radioactividad total de 0,02442 Bq (NCRP, 1984).

El FB_S en raíz y parte aérea de coirón fue bajo, con valores más altos en el suelo natural no contaminado. En parte aérea el FB_S fue siempre menor a 1 mostrando ausencia de bioacumulación. Los valores de FB_S en raíz y parte aérea se encuentran dentro del rango de coeficientes de bioacumulación observado por Shahandeh y Hossner (2002) para distintas especies vegetales cultivadas en macetas, pero en parte aérea fueron más altos al TF calculado en base a la relación de radioactividad observado por Vera Tomé et al. (2003) en especies herbáceas en campo y por Vandenhove y Van Hees (2003) para raigrás (*Lolium perenne*) en macetas. Sin embargo, es necesario recordar que la comparación directa de bioacumulación calculada en los distintos trabajos tiene un valor relativo, limitado a suelos con concentraciones similares de U, ya que, salvo cuando se cumpla la hipótesis de linealidad anteriormente discutida, el FB_S o TF es dependiente de la concentración de U en el sustrato, siendo más alta en sustratos con bajo contenido de U.

Los valores más altos de concentración de U medidos en coirón fueron de 16 $\mu\text{g U g}^{-1}$ en parte aérea y 140 $\mu\text{g U g}^{-1}$ en raíz.

A bajas concentraciones de U en la raíz se observó que el U detectado en la parte aérea representaba un importante porcentaje, entre el 20 y el 65 %, del U presente en la raíz (Figura 7). A niveles altos de contaminación en el sustrato, cuando el U en raíces aumenta, el U permanece en la raíz siendo translocado en una proporción menor (menor al 10 %) hacia la parte aérea.

Es evidente que la translocación de U hacia la parte aérea es relativamente importante sólo cuando el U se encuentra en el sustrato a nivel de trazas, como ocurre en suelos naturales analizados. Independientemente de la concentración de U en el suelo, los niveles de U acumulado en la parte aérea son muy bajos. Estos resultados coinciden con los hallados por diversos autores en distintas especies vegetales y en distintas condiciones de cultivo (Huang et al., 1998; Morton et al., 2001; Shahandeh y Hossner, 2002; Chen et al., 2006).

El modelo clásico conocido para explicar los mecanismos de tolerancia a los metales pesados en plantas superiores se basa en dos estrategias básicas: la exclusión y la acumulación (Baker, 1981; McGrath et al., 2001). La falta de acumulación de U en la parte aérea y un factor de translocación menor a 1 ubicarían al coirón, *Stipa sp.*, dentro del grupo de plantas tolerantes al U, porque sobreviven en sustratos con alto contenido de este elemento, pero con una estrategia de tolerancia basada en la exclusión, con restricción al transporte del U hacia la parte aérea, como la mayoría de las especies vegetales estudiadas por distintos autores. El chil-chil, *Tagetes minuta*, también es tolerante al U por los lugares que habita y seguramente también basa su tolerancia en la exclusión pero su análisis debiera ser profundizado para conocer mejor su comportamiento. A la vista de los datos obtenidos en ambas especies (Tabla 5, Figuras 6 y 7) en donde, para suelos con concentraciones moderadas de U este contaminante se acumula en la raíz, se podría producir una compartimentación en vacuolas o "secuestro" del contaminante mediante unión a fitoquelatinas en vacuolas o citosol de las células córtex, acumulándose el U en dicho órgano y limitando su translocación a la parte aérea.

Como el presente estudio constituyó el análisis de las plantas de aparición espontánea en distintos puntos de muestreos, no hemos podido realizar una comparación de la biomasa desarrollada en el mismo lapso de tiempo por las distintas especies vegetales estudiadas en relación al nivel de contaminación en el sustrato. Por lo tanto, no es aplicable la utilización del índice de tolerancia más

utilizado, la relación entre las biomásas promedio de plantas crecidas en medio contaminado y no contaminado (Baker et al., 1994; Shahandeh y Hossner, 2002; Jagetiya y Purohit, 2006). Por otra parte, los síntomas de fitotoxicidad en plantas parecen desarrollarse a muy distintas concentraciones de U en suelo, dependiendo de las propiedades del suelo y no sólo de la especie vegetal, sino también de su variedad. Así, por ejemplo, para un mismo cultivo, trigo, Gulati et al. (1980) reportaron una disminución en la producción de biomasa a valores tan bajos como 3 mgU kg^{-1} , que estarían muy cerca de los valores de base de la mayoría de los suelos argentinos, mientras que Shahandeh y Hossner (2002) presentaron una serie de especies vegetales, entre las que se encuentra el trigo, con índice de tolerancia del 100 % en un suelo contaminado con $100 \text{ mg U(VI) kg}^{-1}$.

Sin embargo, como se comentó en la sección de Resultados, a concentraciones en el suelo entre 70 y $100 \text{ } \mu\text{gU g}^{-1}$ se observó un cambio en la acumulación de U en el cuerpo vegetal de coirón, que podría estar indicando un nivel de toxicidad mayor para la planta, que necesita evitar la entrada del contaminante. Precisamente este mismo nivel de contaminación fue encontrado por Shahandeh y Hossner (2002) como desencadenante de síntomas de toxicidad en suelos calcáreos con pH alcalinos como los presentes en las zonas de muestreo del presente trabajo.

La falta de acumulación de U en la parte aérea dificultaría cualquier programa de remediación de suelos en base a la fitoextracción, que requeriría de especies vegetales hiperacumuladoras que concentren más de $1.000 \text{ mgU kg}^{-1}$ en biomasa aérea (Shahandeh y Hossner, 2002), al igual que se requiere para el tratamiento de otros metales (McGrath et al., 2001), para lo que se considera necesario en algunos casos llegar a una concentración mínima en parte aérea del 1 % (Cunningham et al., 1997; Padmavathiamma y Li, 2007).

2. TOLERANCIA Y ACUMULACIÓN DE URANIO EN CULTIVOS HIDROPÓNICOS DE REMOLACHA

2.1. Recuperación del uranio en los distintos compartimentos del sistema planta-medio de cultivo

La rápida desaparición del U de la solución hidropónica podría deberse a dos procesos concomitantes: 1) la formación de complejos relativamente insolubles del U con otros componentes del sistema, especialmente P; y 2) a la absorción e incorporación del U a las plantas. Es necesario también considerar la posibilidad de adsorción de los metales pesados sobre las paredes de los recipientes (Ebbs et al., 1998; Maine et al., 2001).

Los procesos físico-químicos mencionados (formación de complejos y adsorción) no fueron cuantificados directamente en este trabajo, pero una prueba indirecta de su ocurrencia es la desaparición del U de la solución en los recipientes donde no se cultivaron plantas. La presencia de P pudo haber propiciado la precipitación y adsorción de U, tal como lo puede hacer con el Pb (Dushenkov et al., 1995).

De hecho, una metodología en estudio para la remediación de U de aguas subsuperficiales y suelos contaminados es la aplicación de compuestos y materiales ricos en P como la hidroxiapatita (Seaman et al., 2001; Simon et al., 2004; Raicevic et al., 2006) y el fitato, un compuesto orgánico natural (Seaman et al., 2003), que reducen la movilidad del U, inmovilizándolo y reduciendo su biodisponibilidad.

Si bien en la solución Hoagland, utilizada como medio de cultivo en el presente trabajo, el P fue agregado en una forma química más sencilla como el fosfato monopotásico (KH_2PO_4), pueden producirse distintas interacciones entre P y U, dependiendo del pH del medio.

En aguas naturales el U forma complejos con carbonatos, hidróxidos, sulfatos, fosfatos, fluoruros y, posiblemente, silicatos (Langmuir, 1978). En las condiciones de pH registrado en la solución hidropónica ($6,11 \pm 0,21$), en presencia de P, la formas más frecuentes en las que se encuentra el U son los hidróxidos de U y los complejos $\text{UO}_2\text{HPO}_4^0$ y $\text{UO}_2(\text{HPO}_4)_2^{2-}$ (Langmuir, 1978; Ebbs et al., 1998), siendo el complejo con P mencionado en último término el más estable dentro del rango de pH 4-7,5, incluyendo medios acuosos de soluciones nutritivas como la de Johnson (Ebbs et al., 1998), similar a la utilizada en este trabajo. La formación de complejos estables con los fosfatos implica la aparición de complejos relativamente insolubles y/o

precipitables y la reducción de la concentración de iones uranilo libres, que constituyen la forma más biodisponible (Ebbs et al., 1998; Laroche et al., 2005). Por este motivo, en algunos trabajos se ha propuesto la exclusión del P de las soluciones donde se estudie la factibilidad de la rizofiltración para el tratamiento de agua. Sin embargo, el P es un componente normalmente presente en las aguas contaminadas con U y, por lo tanto, es importante conocer la capacidad de las plantas para acumular o capturar U en su presencia. Por otra parte, como se discutirá más adelante, (apartado 2.2.), la presencia de P ayuda a disminuir los efectos de toxicidad y permite un mejor desarrollo de las plantas.

La remoción de U por procesos no biológicos mediados por plantas fue calculada de forma indirecta mediante la diferencia entre la concentración de U agregado inicialmente y el remanente en la solución sin plantas al final de la experiencia, que en nuestro caso alcanzó al 99 % del U agregado. Sin embargo, cuando se colocaron plantas en una solución con la misma concentración inicial de U y se cuantificó analíticamente la presencia de U en las plantas, se observó una recuperación de U en tejido vegetal del 59,5 %. Es decir, las plantas incorporaron o adsorbieron U que no se encontraba en solución o que, en su ausencia, hubiera formado complejos insolubles o sufrido precipitación con otros solutos. Esta situación demuestra que las raíces de las plantas pueden interferir o intervenir en los procesos físico-químicos, modificando la proporción de U precipitado o insoluble y compitiendo con estos procesos. Laroche et al. (2005) adjudicaron esta situación a la capacidad de las raíces para actuar como ligantes fuertes, promoviendo la disociación de compuestos P-U y la incorporación subsiguiente del U en las plantas. Vandenhove et al., (2007) sugirieron que, aunque las formas más biodisponibles sean los uranilos libres y los complejos carbonato-U, en algunos casos los complejos fosfato-uranilo pueden también ser absorbidos por las plantas.

La alta capacidad de absorción de la superficie radical, que es una combinación de procesos físico-químicos como quelación, intercambio iónico y precipitación de iones metálicos, sería la responsable de la remoción inicial rápida de los metales pesados en sistemas hidropónicos de rizofiltración con plantas terrestres (Dushenkov et al., 1995). La capacidad de intercambio catiónico de la pared celular de las raíces varía en las distintas especies vegetales en función de los sitios de adsorción disponibles, es decir, de los grupos carboxílicos ($R-COO^-$) y los aniones fijados (Marschner, 1993), sobre los que se podrían fijar los cationes uranilo (Dushenkov et al., 1997). Pero, la pared celular de las raíces tendría un número finito

de sitios de adsorción y enlace, con una capacidad de retención máxima limitada (Hall, 2002), y es posible llegar a una situación de saturación de los sitios de adsorción. Si esto hubiera ocurrido, la asociación de U con el P pudo haber provisto un nuevo medio de secuestrar el U, manteniendo al contaminante fuera del citoplasma. Esta asociación U-P pudo ocurrir sobre la superficie radical o en el espacio libre aparente, el espacio intercelular donde tienen lugar el intercambio catiónico, la formación de complejos y otros procesos mediados por componentes de la pared celular.

Los exudados de la raíz también contribuyen al acomplejamiento de los contaminantes, reduciendo su absorción. Según Dushenkov et al. (1995) la precipitación de Pb en raíces como fosfato de Pb insoluble que se produce en sistemas hidropónicos, estaría mediado por la misma raíz, probablemente a través de la liberación de exudados, ya que las raíces muertas no tienen esta capacidad y sólo pueden retener una cantidad menor de contaminante relacionada con los sitios de adsorción estructurales disponibles, como el ácido poligacturónico.

Nuestras plantas, fundamentalmente las raíces, retuvieron hasta el 70 % del agregado en el caso de la concentración más alta ensayada (5 mgU L^{-1}). Dushenkov et al. (1997) mostraron una recuperación en raíces del 95 % del U ingresado (1 mgU L^{-1}) en un sistema piloto de rizofiltración con distintas variedades de girasol, siendo más alta la remoción de U por las raíces a pH 5 que a pH 7.

2.2. Acumulación de Uranio en plantas y transferencia sustrato-tejido vegetal

Como hemos discutido anteriormente, la detección de U en raíces no es una prueba irrefutable de la absorción de U y su incorporación al interior celular, ya que podría incluir el U fuertemente ligado en el espacio libre aparente y que no fuera removido por el lavado de las raíces tras la cosecha. Sin embargo, en los dos experimentos donde se midió el U incorporado a la parte aérea, la presencia de cantidades de U en dichos órganos significativamente más altas en las plantas contaminadas que en las plantas control no contaminadas indicarían un aumento en la incorporación de U al interior celular de las raíces y su posterior transporte hacia la parte aérea. Esta mayor incorporación pudo haber sido limitada o pudo ocurrir un nuevo secuestro del contaminante incorporado a las plantas, ya que la translocación

observada fue muy baja y el porcentaje de U translocado disminuyó a medida que la acumulación de U en raíz aumentaba, tendiendo a un valor mínimo.

El secuestro en vacuolas o la quelación mediada por fitoquelatinas en el citoplasma son mecanismos de detoxificación para los metales que logran penetrar la membrana celular (Salt et al., 1998; Hall et al., 2002; Tong et al., 2004) y en los que puede intervenir también el P. La precipitación extra e intracelular de fosfatos (Salt et al., 1998), la formación de fitatos (Van Steveninck et al., 1992) y los depósitos metal-P en la pared celular (Vázquez et al., 1999) son mecanismos descritos en la bibliografía como estrategias para el almacenamiento vacuolar o el secuestro citoplasmático de metales. Recientemente, Günther et al. (2003) utilizaron fluorescencia inducida por láser y espectroscopia de absorción de rayos X para determinar la especiación del U incorporado dentro del tejido vegetal de lupino, indicando que se encontraba en forma hexavalente, mayoritariamente como fosfato de uranilo (VI) ligado a los grupos fosforilos.

La ausencia de P en el medio de cultivo provocó una disminución en la incorporación de U en las raíces en relación a las plantas cultivadas en presencia de U y P, pero la acumulación de U siguió siendo importante y significativamente mayor a la registrada en plantas en medio no contaminado. En la parte aérea, en cambio, se acumuló una proporción relativamente mayor de U en ausencia de P. Como ya se discutió, para algunos autores la presencia de P disminuye la biodisponibilidad del U mientras que para otros, las plantas pueden utilizar o captar U de distintas fuentes relativamente insolubles, ya sea por competencia directa como ligante o porque la concentración de U en solución se va reponiendo, a partir de la disolución de los complejos de baja solubilidad, a medida que el U desaparece de la solución por la absorción de las plantas (Laroche et al., 2005).

En nuestro trabajo la mayor acumulación de U en las raíces de las plantas cultivadas en presencia del anión fosfato, indicaría que no hubo disminución de la disponibilidad de U en presencia de P. Sin embargo, como el U que llegó a la parte aérea fue menor podría pensarse en una menor incorporación de U al interior celular debido a menor disponibilidad de este elemento. Pero también puede deberse a una restricción diferente a la translocación o una acumulación mayor del elemento tóxico en los tejidos senescentes como postulan Wenzel et al. (2003) como estrategia de tolerancia a la presencia de distintos metales como Pb, Cu y Zn. Más que una contradicción, nuestros resultados pueden estar reflejando un conjunto de procesos en los que estarían incluidos los procesos de adsorción sobre las raíces y los aniones

asociados, el secuestro del U por parte de compuestos fosfatados extra e intracelular y, fundamentalmente, la situación de estrés a qué están sometidas las plantas.

En las plantas que crecieron en la solución nutritiva completa, con agregado de U, se observó un factor de bioacumulación (FB_H) en parte aérea menor a 1, pero en raíces el FB_H tuvo un valor promedio para las distintas concentraciones de U agregado de 4.647, con un valor mínimo de 4.324 y un máximo de 5.273. Estos valores son similares a los observados por Dushenkov et al. (1997), en raíces de girasol cultivado en una solución hidropónica a pH 7, pero más altos que los reportados por Blanco Rodríguez et al. (2006) también para girasol en hidroponía.

El FB_H en las raíces de remolacha se mantuvo relativamente constante en un rango de concentración de U en el sustrato bastante amplio, de 1 a 5 mgU L⁻¹, indicando una relación entre las concentraciones en sustrato y raíces cercanas a la linealidad en ese rango.

2.3. Crecimiento de las plantas e índices de tolerancia o toxicidad

En los distintos ensayos realizados se pudo observar que la remolacha es capaz de tolerar la presencia de U por un tiempo relativamente prolongado, hasta 15 días. La mayoría de los ensayos descritos en la bibliografía en relación a tolerancia de distintas especies a la presencia de metales pesados en sistemas de cultivo controlados, como hidroponía, hacen referencia a estudios a largo plazo cuando el cultivo se extiende hasta 10 días y a corto plazo en estudios de pocas horas. Evidentemente en cada caso la información obtenida es distinta y a veces tiene un alcance diferente.

El presente trabajo muestra que, al menos en el caso del U y con una solución nutritiva completa, si se realizan ensayos que duren entre 10 y 15 días pueden no observarse diferencias significativas en la biomasa total acumulada. Sin embargo, a tiempos más cortos, la biomasa alcanzada por las plantas crecidas con U es menor que las plantas control sin contaminante en el medio de cultivo. Esta situación puede atribuirse por un lado a la variabilidad de respuesta al U pero también podría ocurrir una toxicidad inicial aguda que puede ser compensada parcialmente por mecanismos fisiológicos que permitan a la planta enfrentar el estrés provocado por el contaminante. Kochian et al. (2002), estudiando los mecanismos de resistencia al Al, sugieren que en plantas de maíz tolerantes al Al habría un nivel constitutivo de

resistencia sobre el que se activan otros mecanismos cuando el Al está presente en el medio. Estos mismos autores mostraron que la exposición al Al provoca reducción del crecimiento de las raíces de sorgo durante los primeros días de exposición, pero tras 4-6 días de exposición las raíces de las plantas resistentes tienen un crecimiento relativo igual o mayor a las plantas control.

El grado de inhibición de crecimiento (GIC) más alto se registró al quinto día de exposición al U y fue, en general, comparativamente menor al informado por Jagetiya y Purohit (2006), en base a materia seca alcanzada por girasol creciendo sobre colas de mina de U. Estos autores no informan los niveles de U en el sustrato como para realizar una comparación en cuanto a nivel de contaminación en cada caso. De cualquier modo, los resultados obtenidos en la parte experimental en campo de este trabajo y los disponibles en la literatura indican que el comportamiento de las plantas frente a metales pesados es diferente en suelos y en cultivos hidropónicos. Las concentraciones de U en suelos que desencadenan síntomas de toxicidad parecen ser más bajas que las soportadas por las plantas en medio acuoso, pero esta primera impresión se puede deber a que, en esta comparación, no se tiene en cuenta la concentración de U en la solución del suelo en equilibrio con la fase sólida del suelo.

Por otra parte, si en lugar de comparar la biomasa alcanzada por las plantas en medio contaminado con la obtenida en las plantas control, se considerara las respectivas tasas de crecimiento por unidad de tiempo, se llegaría a valores de inhibición de crecimiento mayores. Efectivamente, al día 5 de tratamiento, las plantas crecidas con U tenían igual biomasa de raíces que las plantas muestreadas al azar al comienzo de la experiencia. Por lo tanto su tasa de crecimiento fue 0. Las plantas control, en cambio, muestran un aumento en su biomasa radical del 74 % en 5 días. Si se realiza el mismo cálculo con el crecimiento ocurrido en la parte aérea la situación es un poco menos dramática pero igualmente interesante, observándose un crecimiento del 10 % para las plantas tratadas con U y del 45,5 % para las plantas control.

Jagetiya y Purohit (2006) atribuyeron la inhibición del crecimiento, tanto en raíz como en parte aérea de girasol expuesto a colas de mineral de U, a la pérdida de turgor celular y la reducción de la extensibilidad de la pared celular, como ocurre en presencia de otros metales como Cd (Poschenreider et al., 1989) y Cu (Maksymiec et al., 1995). La inhibición de la fotosíntesis vía acumulación de carbohidratos también estaría relacionada con la inhibición del crecimiento provocada por distintos metales

como Cu, Ni, y Cd (Maksymiec, 2007). Este último autor sugiere que los metales pesados inducen una cascada de señales que conducen a cambios conectados con la extensión celular, mencionando también que la producción de etileno en condiciones de estrés, incluyendo el caso del Cu, puede aumentar la rigidez de la pared celular seguida por inhibición del crecimiento.

El cambio de la solución de cultivo contaminada por una sin U agregado, no produjo una recuperación clara de las plantas como mostró Llamas (2005) para intoxicación con Ni y Cd en arroz.

En ausencia de P, los síntomas de toxicidad al U fueron muy evidentes, con marchitez de las hojas y posterior caída de las mismas. Los valores numéricos de descenso de la biomasa acumulada que se presentan, incluso pueden no reflejar fielmente el mal estado de las plantas porque en el peso de plantas se incluyó las hojas obviamente marchitas pero que aún no habían caído. La caída de hojas comenzó entre los 4 y 5 días de exposición al U.

Debido a la disminución de biomasa en la parte aérea, la relación entre la biomasa en raíces con respecto a la biomasa en parte aérea se vio incrementada. El efecto fitotóxico, por lo tanto, fue mayor en la parte aérea que en las raíces y estuvo acompañado con un incremento en el transporte de U desde la raíz hacia la parte aérea, que al no ser retenido en las raíces interferiría con procesos metabólicos esenciales.

2.4. Efecto del Uranio sobre algunos parámetros fisiológicos y bioquímicos

Existen muy pocos trabajos que hayan registrado los cambios fisiológicos y/o bioquímicos que ocurren en plantas cultivadas en medios contaminados con U ya sean suelos o cultivos hidropónicos. Recientemente, algunos trabajos estudiaron las alteraciones de los procesos fotosintéticos (Pradines et al., 2005; Jagetiya y Purohit, 2006) y el estrés oxidativo provocados por la presencia de U (Vandenhove et al., 2006). Las relaciones hídricas, que se ven muy afectadas en presencia de distintos metales pesados, tampoco han sido estudiadas en plantas contaminadas con U.

La evapotranspiración y el contenido hídrico relativo de las plantas de remolacha se vieron reducidos por la presencia de U en la solución nutritiva de cultivo, especialmente inmediatamente después del agregado de U al medio.

La reducción de la evapotranspiración es uno de los efectos fitotóxicos provocados por los metales pesados y se produce por distintos factores entre los que se puede mencionar: alteraciones en el crecimiento y las funciones de las raíces, cierre de los estomas, disminución del potencial osmótico y del mantenimiento de la turgencia en hojas, inhibición de la absorción y el transporte de agua por bloqueo de los canales de agua (Barceló y Poschenrieder, 1990; Menon et al., 2005; Hernández-Allica et al., 2007).

Como resultado de las alteraciones en el contenido hídrico y el balance de agua se puede generar estrés hídrico, aún en condiciones de adecuada disponibilidad de agua. El aspecto de marchitez que se observó en las plantas de remolacha expuestas al U en ausencia de P es compatible con esta situación de estrés hídrico aparente, seguramente acompañado por otros daños a nivel celular.

Todos los pigmentos fotosintéticos de las hojas de remolacha se redujeron en las plantas crecidas en medio con U, pero el contenido del conjunto de las clorofilas $a + b$ se vio más afectado que los carotenos totales $x + c$. El efecto negativo sobre el contenido de clorofila, como se observó en el presente trabajo, ha sido comentado como uno de los efectos tóxicos de la presencia de metales pesados en el medio de cultivo, habiendo una variedad de respuestas documentadas. Jagetiya y Purohit (2006) observaron reducción en el contenido de clorofila a y b en girasol cultivado en macetas con suelos adicionado con distintas cantidades de colas de mineral de U. Otros autores mostraron alteraciones en el contenido de los pigmentos fotosintéticos, con mayor incidencia tóxica de los metales pesados en alguno de los componentes en particular, como disminución de clorofila a (Rai y Tripathi, 2008), incremento de los pigmentos carotenoides (Singh y Agrawal, 2007), mayor pérdida de la clorofila b que a (Ebbs y Uchi, 2008), variaciones en la relación de clorofilas a/b , con tendencia al incremento (Èšsnienė et al., 2004) o al descenso (Oncel et al., 2000).

Las plantas de remolacha mantuvieron el nivel de clorofila a inicial, antes del agregado de U al medio, en los primeros cinco días de exposición al U. La concentración de clorofila b , en cambio, disminuyó en esos primeros días, es decir que se registró una pérdida neta de clorofila b inicial. Ebbs y Uchi (2008) sugirieron que la reducción de clorofila b podría permitir el mantenimiento del nivel de clorofila a , por conversión de clorofila b a clorofila a , y así compensar parcialmente la inhibición de la síntesis de clorofila y el daño sobre la fotosíntesis provocada por los metales pesados. Una situación similar podría explicar nuestros resultados en el cultivo de remolacha, donde podría haber ocurrido degradación de clorofila a , pero con

reposición a expensas de la clorofila *b*, como mecanismo de protección al proceso de fotosíntesis.

Luego de 5-7 días de aplicado el U, los niveles de ambos tipos de clorofila comenzaron a crecer, aunque las hojas de las plantas de remolacha contaminadas nunca lograron alcanzar los valores de clorofila *a* presentes en las plantas control de su misma edad.

La síntesis de clorofila está inhibida en presencia de metales pesados por varios factores. Algunos metales pesados como Cd y en menor medida, Pb, pueden interferir, por bloqueo de grupos sulfhidrilos S-H, en la formación de enzimas (complejo protoclorofil reductasa y ácido aminolevulínico) que intervienen en la síntesis de clorofila (Oncel et al., 2000). Además, el ión central Mg^{2+} de la molécula de clorofila puede ser sustituido por distintos metales pesados, entre los que se han identificado a Hg, Cu, Cd, Ni, Zn, y Pb, generándose una molécula de clorofila con un metal pesado como ión central (Clor-[MP]), en lugar de Mg^{2+} (Clor-[Mg]). Las Clor-[MP] son menos eficientes en la producción de fluorescencia y en la capacidad de liberación de electrones (Küpper et al., 2006), produciendo por lo tanto, alteraciones de la fotosíntesis.

Diferentes autores han mostrado que los metales pesados provocan daño oxidativo en las plantas expuestas a su presencia, induciendo la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés "reactive oxygen species"). Sin embargo, la respuesta del sistema de enzimas antioxidantes, que permitiría la eliminación de los radicales libres formados, varía con la especie vegetal, el tejido analizado, el metal contaminante y las condiciones de estudio. Este mecanismo de protección celular sería constitutivo tanto en plantas resistentes como sensitivas (Meharg, 2005), pero la exposición a distintos metales desencadenaría una mayor actividad enzimática en plantas acumuladoras (Wang et al., 2008) o en poblaciones de áreas con niveles altos de metales como Cu (Ke et al., 2007). Vandenhove et al. (2006) estudiaron enzimas de estrés oxidativo en *Phaseolus vulgaris* expuesta a concentraciones entre 0 y 1.000 μM de U durante 7 días y no observaron diferencias significativas en la actividad enzimática salvo reducción de la actividad de la glutatión reductasa (GR) en el medio de mayor contaminación.

La enzima analizada en las hojas de remolacha, la ascórbico peroxidasa, APX, actúa conjuntamente con la catalasa (CAT) para eliminar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) proveniente de la acción de la superóxido dismutasa (SOD) sobre el O_2^- (Asada, 1984; Qureshi et al., 2007). Si bien el H_2O_2 se genera fundamentalmente

en mitocondrias y cloroplastos, SOD y APX pueden estar presentes también en los peroxisomas y glioxisomas (Dixit et al., 2001), habiéndose observado también isoformas de APX citosólico en plántulas de maíz expuestas a Cd y Hg (Rellán-Alvarez et al., 2006). En los cloroplastos la APX utiliza el ácido ascórbico como dador de hidrógeno para reducir el H₂O₂ a agua. La APX actúa también en el ciclo del glutatión-ascorbato con la GR, participando del ciclo de generación de las formas reducida y oxidada de glutatión.

En las hojas de remolacha, la actividad de la APX se incrementó significativamente cuando las plantas fueron expuestas al contaminante y su nivel de actividad se mantuvo alto aún cuando el U fue retirado del medio. Incrementos de la actividad APX fueron observados por Dixit et al. (2001) en hojas y raíces de pera expuestas a Cd, por Qureshi et al. (2007) en plantas expuestas a Pb durante períodos prolongados (60-120 días), y por Ke et al. (2007) en una población ecofisiológicamente adaptada a suelos de minas de Cu.

3. FACTIBILIDAD DEL USO DE PLANTAS TERRESTRES PARA FITORREMEDIACIÓN

La fitoextracción de metales requiere de plantas hiperacumuladoras que concentren el metal en la parte aérea de la planta para su fácil recolección y tratamiento (McGrath et al., 2002; Padmavathiamma y Li, 2007).

La escasa translocación del U desde las raíces hacia la parte aérea observada en todas las especies vegetales estudiadas en este trabajo, coincidentemente con los resultados observados en todas las especies vegetales analizadas por distintos autores, dificultaría la limpieza de los suelos contaminados con U por fitoextracción natural.

La fitoextracción asistida con uso de abonos o compuestos químicos que favorezcan la asimilación y translocación del U podría ser una alternativa (McGrath et al., 2002; Vandehove y Van Hees, 2004) a explorar, pero el uso de ácido cítrico puede estimular la migración del U hacia la napa de agua subterránea (Chang et al., 2005) sino es activamente extraído por las plantas. Por otra parte, las experiencias de fitoextracción, natural o asistida, conocidas en distintos ambientes, con distintos metales y especies vegetales, indican que se requieren entre 10 y cientos de ciclos de cultivo para la limpieza de ciertas áreas contaminadas (Soriano y Fereres, 2003; Méndez y Maier, 2008), lo que haría difícil su aplicación.

Las especies identificadas como tolerantes al U y capaces de colonizar las escombreras contaminadas en Sierra Pintada poseen, en cambio, un importante valor para su uso en fitoestabilización de los sustratos, una técnica de fitorremediación especialmente utilizada para prevenir la movilidad y migración de los contaminantes. El factor de bioacumulación (FBs) en parte aérea < 1 y la baja tasa de translocación raíz-parte aérea son, en este caso, deseables para no tener que realizar un manejo especial de la parte aérea y para evitar la transferencia a otros componentes de la cadena trófica (Conesa et al., 2006; Padmavathiamma y Li, 2007; Méndez y Maier, 2008).

El uso de especies autóctonas o de aparición espontánea en las escombreras de residuos de minas puede facilitar la revegetación e implantación del cultivo en las áreas contaminadas, ya que el uso de especies cultivables o seleccionadas en invernadero requiere de una posterior adaptación al clima y condiciones edáficas de la zona.

Sin embargo, debido a las duras condiciones climáticas, especialmente por el régimen de lluvias, y edáficas registradas en la zona de estudio, Sierra Pintada, la cobertura vegetal de aparición espontánea también deja manchones de suelo desnudo, que sólo se cubrieron parcialmente después de varios años de colonización de las áreas disturbadas, como ocurre normalmente en zonas áridas (Conesa et al., 2007). Para acelerar el proceso de revegetación podría mejorarse el bajo contenido registrado de nutrientes esenciales, como N y P, incorporando alguna enmienda correctiva (Wong, 2003), preferiblemente orgánica, ya que la baja proporción de arcillas y materia orgánica dificultaría la retención de fertilizantes inorgánicos en la capa superficial del suelo y se perdería la mayor parte por percolación. El abono orgánico podría, además, reducir la biodisponibilidad de los contaminantes metálicos en las colas de mina, aliviando la toxicidad (Méndez y Maier, 2008).

La especie vegetal que se encontró en los ambientes más contaminados, el coirón, presenta una biomasa aérea reducida que no cubre fácilmente el suelo. Pero, la relación de la densidad de raíces subsuperficiales en proporción a la biomasa aérea es alta y esta característica puede favorecer la absorción y retención de metales pesados (Keller et al., 2003), al menos en las raíces. Además las matas de coirón ofrecen un obstáculo a la migración horizontal de partículas de suelo, constituyendo zonas de deposición de partículas de suelos provenientes de la erosión eólica en otros sectores del área. La fitoestabilización es, en definitiva, una estrategia de contención de la contaminación, donde la canopia de las plantas permiten reducir

los efectos de la erosión eólica y las raíces ayudan a prevenir la erosión hídrica y el lavado hacia capas más profundas del sustrato (Méndez y Maier, 2008).

La fitoestabilización de los sustratos en las escombreras generadas durante la actividad minera es una estrategia utilizable no sólo como remediación final, sino también mientras se opera la mina para evitar la erosión del suelo desnudo y la consecuente dispersión de la contaminación. Mientras la mina no sea cerrada definitivamente, la revegetación directa de todas las escombreras mitiga los efectos ambientales adecuadamente, pero para un cierre definitivo y rehabilitación de los suelos contaminados es necesario considerar el destino que se le dará al área. Aún en el caso de actividades recreativas puede ser necesario colocar una capa inerte sobre las áreas más contaminadas y suelo no contaminado por encima de esta capa aislante de la contaminación para proceder a la revegetación final (Tordoff et al., 2000). En particular, en el Complejo Minero, en Sierra Pintada, este procedimiento parece ser imprescindible en la escombrera más contaminada, donde sólo el coirón puede sobrevivir desarrollando una cobertura vegetal escasa, insuficiente para la contención definitiva de la contaminación.

Otra de las técnicas de fitorremediación que aparece como factible de aplicar a la limpieza de aguas contaminadas con U es la rizofiltración, en especial cultivando girasol en hidroponía (Dushenkov, 2003; Wong, 2003).

A pesar de que algunas plantas acuáticas son capaces de acumular metales pesados (Maine et al., 2001; Suñe et al., 2007; Rai y Tripathi, 2008) y, en particular U (Hafez y Ramadan, 2002), se prefieren las plantas terrestres para rizofiltración de contaminantes porque sus raíces ofrecen una superficie de contacto con la solución contaminada extremadamente alta debido a su mayor longitud y abundancia de pelos radicales (Dushenkov et al., 1995; Padmavathiamma y Li, 2007). Sin embargo, el cultivo hidropónico de por sí crea condiciones de estrés a las plantas terrestres que ven modificados sus sistemas radicales y alteradas las condiciones del medio que se acercan a las de suelos anegados donde se reconocen serias dificultades para el desarrollo vegetal (Marschner, 1993; Yordanova y Popova, 2007).

Evidentemente, la remolacha presenta síntomas de toxicidad importante, pero es capaz de sobrevivir en medio acuoso con una carga de contaminación en U alta, hasta 250 veces más alta que el nivel guía de $20 \mu\text{gU}\cdot\text{ml}^{-1}$ aceptado por la legislación argentina para la protección de la fauna y la flora (UGAN, 1995). Además, es capaz de desarrollar mecanismos de defensa de sus procesos metabólicos, aunque

probablemente con un costo energético importante y alteración de ciertas funciones como la fotosíntesis, el balance hídrico y, en definitiva, el crecimiento.

El estudio actual se realizó con una solución contaminada relativamente balanceada en otros componentes que, además, completan las necesidades nutricionales de las plantas. Sería necesario conocer la reacción de las plantas frente a aguas contaminadas por actividades humanas productivas que pueden contener otros elementos fitotóxicos en concentraciones elevadas, o pueden presentar biodisponibilidad reducida de elementos necesarios para la nutrición vegetal.

VI - CONCLUSIONES

En el presente trabajo hemos analizado la respuesta de plantas terrestres expuestas al estrés provocado por la presencia de un metal pesado, el uranio. Para ello se han abordado distintos aspectos relacionados con el objetivo principal incluyendo estudios en campo y en condiciones controladas de laboratorio.

Estudio de las especies vegetales en condiciones de campo

1. La concentración de U en los suelos sin alteraciones varió entre 1,8 y 3,1 mgU.kg⁻¹ suelo, pudiendo considerarse estos valores como niveles basales de U en los suelos de la zona de Sierra Pintada y San Rafael.
2. Las escombreras de estériles y colas de mineral creadas a partir de la explotación de la mina de U están recubiertas en la actualidad por vegetación de aparición espontánea que es tolerante a este metal pesado.
3. Las dos especies de jarilla (*Larrea nitida* y *Larrea divaricata*) se hallaron sólo en los suelos naturales o con niveles bajos de U, sin haberse podido determinar si esta situación es una respuesta a la toxicidad provocada por el U o al escaso desarrollo del perfil del suelo de las escombreras que impediría el asentamiento de arbustos con mayor desarrollo radicular.
4. La especie vegetal que mostró mayor tolerancia al U fue el coirón (*Stipa sp.*), que colonizó sustratos con concentración de U de 386 mgU.kg⁻¹ suelo.
5. Todas las especies vegetales analizadas mostraron valores de concentración de uranio superiores en la raíz que en la parte aérea. El U queda retenido en las raíces y la translocación hacia la parte aérea está restringida.
6. Las especies identificadas como tolerantes al U y capaces de colonizar las escombreras contaminadas en Sierra Pintada, especialmente el coirón y el chil-chil, poseen un importante valor para su uso en fitoestabilización de los sustratos, una técnica de fitorremediación especialmente utilizada para prevenir la movilidad y migración de los contaminantes.
7. Todas las plantas estudiadas en campo mostraron ausencia de bioconcentración en la parte aérea (FB < 1), característica deseable en los programas de fitoestabilización.

Estudio en planta modelo en condiciones controladas de laboratorio (cultivo hidropónico)

1. La remolacha roja es tolerante a la presencia de U en un medio de cultivo completo que incluya P en su composición.
2. La ausencia de P en el medio desencadena síntomas de toxicidad importantes que llevan a la marchitez y senescencia de hojas.
3. A pesar de la tolerancia al U, algunas funciones metabólicas se ven alteradas por la presencia del contaminante, especialmente al inicio de la exposición al U cuando el grado de inhibición del crecimiento es mayor.
4. La biomasa, la evapotranspiración y el contenido hídrico relativo de las plantas de remolacha se ven inicialmente reducidos por la presencia de U, pero luego de un tiempo de exposición las plantas parecen desarrollar mecanismos de defensa y se recuperan parcialmente.
5. Todos los pigmentos fotosintéticos de las hojas de remolacha se redujeron en las plantas crecidas en medio con U, pero el contenido del conjunto de las clorofilas $a + b$ se vio más afectado que los carotenos totales $x + c$.
6. La actividad de la enzima ascórbico peroxidasa (APX) se vio significativamente aumentada inmediatamente después del agregado de U en el medio de cultivo.
7. La eliminación del contaminante del medio no asegura la recuperación total de los niveles de contenido hídrico relativo, clorofila y actividad enzimática de las plantas no contaminadas.
8. Parte de los resultados obtenidos en este estudio muestran la importancia de considerar el tiempo de exposición al contaminante, ya que en estudios de horas o pocos días se pueden obtener resultados distintos y contradictorios con los obtenidos en estudios de más de 10 días de exposición al contaminante. Esta situación se debería al tiempo necesario para desencadenar la respuesta de defensa del vegetal frente al estrés sufrido.
9. En el estudio realizado con distintas concentraciones de U inicial en el medio de cultivo, entre un 50 y un 70 % del U agregado se recuperó en el tejido vegetal, especialmente ligado a las raíces.

10. La transferencia del U acumulado en la raíz hacia la parte aérea fue muy baja.
11. El factor de bioacumulación (FB_H) en parte aérea fue menor a 1, pero en raíces el FB_H tuvo un valor promedio para las distintas concentraciones de U agregado de 4.647, con un valor mínimo de 4.324 y un máximo de 5.273.
12. Los dos últimos puntos mencionados indican que el cultivo de remolacha roja podría usarse en sistemas de rizofiltración para la limpieza de aguas contaminadas con U.

VII - BIBLIOGRAFÍA

- Ahluwalia, S.; Goyal, D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Tecnology*, 98: 2243-2257.
- Antunes, S.; Figueiredo, D.; Marques, S.; Castro, B.; Pereira, R.; Gonçalves, F. 2007. Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of the Total Environment*, 374: 252-259.
- Arbona, V.; Flors, V.; Jacas, J.; Garcia-Agustin, P.; Gomez-Cadenas, A. 2003. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant Cell Physiology*, 44: 388-394.
- Arbona, V. 2005. Capacitat adaptativa de diferents patrons de citrics a condicions mediambientals adverses. Tesis doctoral. Universitat Jaume I. Escola Superior de Tecnologia I Ciències Experimentals. Castelló de la Plana, España, 186 pp.
- Asada, K. 1984. Chloroplasts: formation of active oxygen and its scavenging. *Methods in Enzymology*, 105: 422-429.
- Axmann, H.; Sebastianelli, A.; Arrillaga, J. 1990. Sample preparation techniques of biological material for isotope analysis. pp. 41-53. En: *Use of nuclear techniques in studies of soil-plant relationships*, Hardarson, G. (ed.) IAEA, Vienna, Austria.
- Baker, A. 1981. Accumulators and excluders. Strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.*, 3: 643-654.
- Baker, A.; Brooks, R. 1989. Terrestrial higher plants which hyper accumulate metallic elements. Review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery.*, 1: 81-126.
- Baker, A.; McGrath, S.; Sidholi, C.; Reeves, R. 1994. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Resourc. Conserv. Recycl.*, 11: 41-49.
- Barceló, J.; Poschenrieder, C. 1989. Estrés vegetal inducido por metales pesados. *Investigación y Ciencia*, 154: 54-63.
- Barceló, J.; Poschenrieder, C. 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. *J. Plant Nutr.*, 13: 1-37.
- Barkay, T.; Schaefer, J. 2001. Metal and radionuclide bioremediation; signes, considerations and potentials. *Current Opinion in Microbiology*, 4: 318-323.

- Basta, N.; Ryan, J.; Chaney, R. 2005. Trace element chemistry in residual-treated soil: key concepts and metal bioavailability. *J. Environm. Qual.*, 34: 49-63.
- Berry, W.; Wallace, A. 1981. Toxicity: the concept and relationship to the dose response curve. *J. Plant Nutr.*, 3: 13-19.
- Blanco Rodríguez, P.; Vera Tomé, F.; Pérez Fernández, M.; Lozano, J. 2006. Linearity assumption in soil-to-plant transfer factors of natural uranium and radium in *Helianthus annuus* L. *Science of the Total Environment*, 361: 1-7.
- Bonetto, 2006. Movimiento del Uranio aplicado a columnas de suelo mediante riego con agua de cantera. Efectos de cobertura vegetal, fertilizante fosfatado y enmienda. Tesis para optar al Título Magíster de la Universidad de Buenos Aires, área Ciencias del Suelo. Escuela para graduados Alberto Soriano. 83 pp.
- Bonetto, J.P.; López, S.; Ratto, S. Schindler, V.; Schung, E. 2006. Uranium leaching during short term application of pit-water on a carbonate containing soil in the Mendoza province of Argentina, En: *Uranium in the Environment, Mining Impact and Consequences*, B., Merkel; A., Hasche-Berger Ed, ISBN 3-540-28363-3.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- British Geological Survey, 1997. Regional Geochemistry of part of North-West England and North-Wales. Ed. British Geological Survey, Keyworth, Nottingham, UK.
- Burnett, W.C.; Schultz, M.K.; Hull, C.D. 1996. Radionuclide flow during the conversion of phosphogypsum to ammonium sulfate. *J. Environm. Radioactivity*, 32: 33-51.
- Campos, P. 1998. Chinchilla (*Tagetes minuta* L.) y amor seco (*Bidens subalternans* DC). II Mecanismos de emergencia. Informe Técnico 63. ISSN 0326-2596, 10 pp.
- Centanni, F.; Ross, A.; Desesa, M. 1956. Fluorometric determination of uranium. *Anal. Chem.* 28: 1651-1657.
- Clemens, S.; Palmaren, M.; Kramer, U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science*, 7: 309-315.
- Chang, P.; Kim, K-W., Yoshida, S.; Kim, S-Y. 2005. Uranium accumulation of crop plants enhanced by citric acid. *Environmental Geochemistry and Health*, 27: 529-538.

- Chen, B.; Jakobsen, I.; Roos, P.; Zhu, Y-G. 2005a. Effect of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on uranium uptake and accumulation by *Medicago truncatula* L. from uranium-contaminated soil. *Plant and Soil*, 275: 349-359.
- Chen, B.; Roos, P.; Borkgaard, O.; Zhu, Y-G.; Jakobsen, I. 2005b. Mycorrhiza and root hairs in barley enhance acquisition of phosphorus and uranium from phosphate rock but mycorrhiza decreases root to shoot uranium transfer. *New Phytologist*, 165: 591-598.
- Chen, B.; Zhu, Y-G; Smith, F. 2006. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation in uranium and arsenic accumulation by Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.) from a uranium mining-impacted soil. *Chemosphere*, 62: 1464-1473.
- Cobbett, C. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metals detoxification. *Plant Physiology*, 123: 825-832.
- Conesa, H.; Faz, A.; Arnaldos, R. 2006. Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailings of the semiarid Cartagena-La Unión mining district (SE Spain). *Science of the Total Environment*, 366: 1-11.
- Conesa, H.; García, G.; Faz, A.; Arnaldos, R. 2007. Dynamics of metal tolerant plant communities development in mine tailings from Cartagena-La Unión Mining District (SE Spain) and their interest for further revegetation purposes. *Chemosphere*, 68: 1180-1185.
- Costa, G; Spitz, E. 1997. Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free aminoacids, protein content of in vitro cultured *Lupinus albus*. *Plant Science*, 128: 131-140.
- Cunningham, S.; Shann, J.; Crowley, D.; Anderson, T. 1997. Phytoremediation of contaminated water and soil. En: *Phytoremediation of soil and water contaminants*. Ed. Kruger, E.; Anderson, T.; Coats, J. Washington DC American Chemical Society, pp 2-15.
- Davis, T.; Volesky, B.; Mucci, A. 2003. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*, 37: 4311– 4330.
- Dixit, V.; Pandey, V.; Shyam, R. 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. c.v. Azad). *Journal of Experimental Botany*, 52: 1101-1109.

- Donati, B.; Gallucci, A. 1984. Trabajo de investigación sobre migración de Ra-225 y Uranio natural desde el Complejo Minero Fabril hacia el medio ambiente. Contrato OIEA-CNEA 3123/RB. Informe CMFSR-CNEA 49pp. y Anexos.
- Duquène, L.; Vandehove, H.; Tack, F.; Van der Avoort, E.; Van Hees, M.; Wannijn, J. 2006. Plant-induced changes in soil chemistry do not explain differences in uranium transfer. *Journal of Environmental Radioactivity*, 90: 1-14.
- Dushenkov, V.; Kumar, N.; Motto, H.; Raskin, I. 1995. Rhizofiltration: The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environm.Sci.Technol.*, 29: 1239-1245.
- Dushenkov, V.; Vasudev, D.; Kapulnik, Y.; Gleba, D.; Eleisher, D.; Ting, K.; Ensley, B.; 1997. Removal of Uranium from Water Using Terrestrial Plants. *Environm Sci. Technol.*, 31: 3468-3474.
- Dushenkov, S. 2003. Trends in phytoremediation of radionuclides. *Plant and Soil*, 249:1467-1475.
- Eapen, S.; Susselan, K.; Tivarekar, S.; Kotwal, S.; Mitra, R. 2003. Potential for rhizofiltration of uranium using hairy roots cultures of *Brassica juncea* and *Chenopodium amaranticolor*. *Environ. Res.*, 91: 127-133.
- Ebbs, S.; Brady, D.; and Kochian, L. 1998. Role of uranium speciation in the uptake and translocation of uranium by plants. *J. Exp.Botany*, 49: 1183 - 1190.
- Ebbs, S.; Uchil, S. 2008. Cadmium and zinc induced chlorosis in Indian mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern] involves preferential loss of chlorophyll *b*. *Photosynthetica*, 46: 49-55.
- Eēsniēnē, T.; Kleizatē, V.; Ranēelis, V. 2004. Plant chlorophyll morphoses induced by $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$. 3. Cysteine action on survival of *Vicia faba* plants and chlorophyll concentration in leaves. *Biologija*, 1: 1-15.
- Ekmekyapar, F.; Aslan, A.; Kemal Bayham, Y.; Cakici, A. 2006. Biosorption of copper (II) by nonliving lichen biomass of *Cladonia rangiformis* hoffm. *J. of Hazardous Materials*, 137: 293-298.
- Entry, J.; Watrud, L.; Manasse, R.; Vance, N. 1997. Phytoremediation and reclamation of soils contaminated with radionuclides. En: *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*. Ed. E. Kruger; T. Anderson; J. Coats. ACS Symposium Series 664. American Chemical Society, Washington, USA, pp.299-306.

- FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory. 2001. Use of isotope and radiation methods in soil and water management and crop nutrition. Training Course Series ,14 Ed. IAEA, Austria, 247 pp.
- Gamba, M. 2002. Comportamiento del Uranio en el ambiente superficial o supergénico-Geoquímica del Uranio-Ciclo geoquímica-Química del uranio en solución. Informe Interno CNEA, 32 pp.
- Gérard, E.; Echevarria, G.; Sterckeman, T.; Morel, J.L. 2000. Cadmium availability to three plant species varying in cadmium accumulation pattern. J. Envirom. Qual., 29: 1117-1123.
- Ghersa, C.; León, R. 1999. Successional changes in the agroecosystem of the Rolling Pampa. En: *Ecosystems of the world. Ecosystems of disturbed ground*. R.Walker (ed.), Elsevier Amsterdam, pp 487-502.
- Gil, A.; Ghersa, C.; Perelman, S. 2002. Root thiophenes in *Tagetes minuta* L. accessions from Argentina: genetic and environmental contribution to changes in concentration and composition. Biochem. Syst. Ecol., 30: 1-13.
- Giuffré de López Camelo, L.; Ratto de Miguez, S.; Marbán, L. 1997. Heavy metals input with phosphate fertilizers used in Argentina. The Science of the Total Environment, 204: 245-250.
- Guglielmini, A.; Ghersa, C.; Satorre, E. 2007. Co-evolution of domesticated crops and associated weeds. Ecología Austral, 17: 167-178.
- Guillon, S.; Trémouillaux-Guiller, J.; Pati, P. ; Rideau, M. ; Gantet, P. 2006. Hairy roots research: recent scenario and exciting prospects. Commentary. Current Opinion in Plant Biology, 9: 341-346.
- Günther, A.; Bernhard, G.; Geipel, G.; Reich, T.; Robberg, A.; Nitsche, H. 2003. Uranium speciation in plants. Radiochim. Acta, 91: 319-328.
- Gulati, K.; Oswal, M.; Nagpaul, K. 1980. Assimilation of Uranium by wheat and tomato plants. Plant and Soil, 55: 55-59.
- Hafez, M.; Ramadan, Y. 2002. Treatment of radioactive and industrial liquid wastes by *Eichornia crassipes*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 252: 537-540.

- Hagemeyer, J. 2004. Ecophysiology of plant growth under heavy metal stress. En: *Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystem*. Ed. MNV Prasad, 2ed. 462 pp. ISBN 978-3-540-40131-5.
- Hall, J. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. of Experimental Botany*, 53: 1-11.
- Hammer, D.; Keller, C. 2002. Changes in the rhizosphere of metal-accumulating plants evidenced by chemical extractants. *J. Environm. Qual.*, 31: 1561-1569.
- Hernández-Allica, J.; Garbisu, C.; Barrutia, O.; Becerril, J. 2007. EDTA-induced heavy metal accumulation and phytotoxicity in cardoon plants. *Environmental and Experimental Botany*, 60: 26-32.
- Hirata, K.; Tsuji, N.; Miyamoto, K. 2005. Biosynthetic regulation of phytochelatin, heavy metals-binding peptides. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100: 593-599.
- Hoagland, D.R.; and Arnon, D.I. 1938. The water-culture method for growing plants without soil. University of California. College of Agriculture. Agr. Expt. Sta, Berkeley, California. Circular 347, 39 p.
- Huang, J.; Blaylock, M.; Kapulnik, Y.; Ensley, B. 1998. Phytoremediation of Uranium-contaminated soils: Role of organic acids in triggering Uranium Hyperaccumulation in plants. *Environm.Sci.Technol.*, 32: 2004-2008.
- Hudson, R.; Aleska, A.; Masotta, H., Muro, E. 1990. Provincia de Mendoza, Escala 1:1000000. En: Moscatelli, G. (ed) Atlas de Suelos de la República Argentina. Tomo II. Proyecto PNUD ARG 85/019. SAGyP – INTA. Buenos Aires, pp.: 75-106.
- Instituto Tecnológico Geominero de España. 1996. Manual de restauración de terrenos y evaluación de impactos ambientales en minería. 3ª Edición, Madrid, España, 332 pp.
- Jackson, M.L. 1976. Análisis químico de suelos. Tercera Edición. Ed. Omega. Barcelona, España, 662 pp.
- Jagetiya, B.L.; Purohit, P. 2006. Effects of various concentrations of uranium tailings on certain growth and biochemical parameters in sunflower. *Biologia*, 61: 103-107.
- Kalin, M.; Wheeler, W.; Meinrath, G. 2005. The removal of uranium from mining waste water using algal/microbial biomass. *J. Environ. Radioactivity*, 78: 151-177.

- Ke, W.; Xiong, Z.; Xie, M.; Luo, Q. 2007. Accumulation, subcellular localization and ecophysiological responses to copper stress in two *Daucus carota* L. populations. *Plant and Soil*, 292: 291-304.
- Keller, C.; Hammer, D.; Richner, W.; Brodbeck, M.; Sennhauser, M. 2003. Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field. *Plant and Soil*, 249: 67-81.
- Kochian, L.; Pence, N.; Letham, D.; Pineros, M.; Magalhaes, J.; Hoekenga, O.; Garvin, D. 2002. Mechanism of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. *Plant and Soil*, 247: 109-119.
- Kramer, U.; Cotter-Howells, J.; Charnock, J.; Baker, A., Smith, A. 1996. Free histidine chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379: 635-638.
- Küpper, H.; Küpper, F.; Spiller, M. 2006. [Heavy metal]-Chlorophylls formed in vivo during heavy metal stress and degradation products formed during digestion, extraction and storage of plant material. En: *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Function and Applications*. B.Grimm, R.Porra, W. Rüdiger and H.Scheer (eds.), Netherlands, pp. 67-77.
- Langmuir, D. 1978. Uranium solution-mineral equilibria at low temperatures with applications to sedimentary ore deposits. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42: 547-569.
- Laroche, L; Henner, P; Camilleri, V; Morello, M; Garnier-Laplace, J. 2005 Root uptake of uranium by a higher plant model (*Phaseolus vulgaris*)-bioavailability from soil solution *Radioprotection*, Suppl.1, 40, S33-S39.
- Leita, L.; Nobili, M.; Mondini, C.; Baca García, M. 1993. Response of leguminosae to cadmium exposure. *J. Plant Nutr.*, 16: 2001-2012.
- Lichtenthaler, H. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382.
- Llamas, A.; Ullrich, C.; Sanz, A. 2000. Cd²⁺ effects on transmembrane electrical potential difference, respiration and membrane permeability of rice (*Oryza sativa* L) roots. *Plant and Soil*, 219: 21-28.
- Llamas, A. 2005. Estrès per metalls pesants: respostes fisiològiques induïdes per Cd i Ni en arròs (*Oryza sativa* L). Tesis doctoral. Departament de Biologia Vegetal. Facultat de Ciències Biològiques. Universitat de València, 94 pp.

- Lombi, E.; Zhao, F.; Dunham, S.; McGrath, S. 2001. Phytoremediation of heavy metal contaminated soils: Natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *J. Environm. Qual.*, 30: 1919-1926.
- López Rita, J.; López Melida, J. 1990. El diagnóstico de suelos y plantas (Métodos de campo y laboratorio). Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 4^a. Edición, 363 pp.
- Maine, M.A.; Duarte, M.; Suñé, N. 2001. Cadmium uptake by floating macrophytes. *Wat. Res.*, 35: 2629-2634.
- Maksymiec, W.; Bednara, J.; Baszynski, T. 1995. Responses of runner plants to excess copper as a function of plant growth stages: effects of morphology and structure of primary leaves and their chloroplast ultrastructure. *Photosynthetica*, 31: 427-435.
- Maksymiec, W. 2007. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiol. Plant*, 29: 177-187.
- Marschner, H. 1993. Mineral nutrition of higher plants. Ed. Academic Press, London, 674 pp.
- Martínez-Aguirre, A.; García-Orellana, I.; García-León, M. 1997. Transfer of natural radionuclides from soils to plants in a marsh enhanced by the operation of non-nuclear industries. *J. Environm. Radioactivity*, 35: 149-171.
- Martínez Carretero, 1999. Biodiversidad vegetal en la provincia de Mendoza, centro-oeste árido de la Argentina. En: *Biodiversidad y Uso de la Tierra*. Matteuci, S.; Solbrig, O.; Morillo, J.; Halffer, G. (eds.). EUDEBA-UNESCO. Buenos Aires, pp.: 383-397.
- Martínez-Ruiz, C.; Fernández-Santos, B.; Gómez-Gutiérrez, J.M. 2001. Effects of substrate coarseness and exposure on plant succession in uranium-mining wastes. *Plant Ecology*, 155: 79-89.
- McGrath, S.; Zhao, F.; Lombi, E. 2001. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. *Plant and Soil*, 232: 207-214.
- McGrath, S.; Zhao, F.; Lombi, E. 2002. Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Advances in Agronomy*, 75: 1-56.
- Meharg, A. 2005. Mechanisms of plant resistance to metal and metalloid ions and potential biotechnological applications. *Plant and Soil*, 274: 163-174.

- Mendez, M.; Maier, R. 2008. Phytoremediation of mine tailings in temperate and arid environments. *Rev. Enviro. Sci. Biotechnol.*, 7: 47-59.
- Menon, M.; Hermle, S.; Abbaspour, K.; Gunthardt-Goerg, M.; Oswald, S.; Schulin, R. 2005. Water regime of metal-contaminated soil under juvenile forest vegetation. *Plant and Soil*, 271: 227-241.
- Moffet, D.; Tellier, M. 1977. Uptake of radioisotopes by vegetation growing on Uranium tailings. *Can. J. Soil Sci.*, 57: 417-424.
- Morton, L.; Evans, C.; Harbottle, G.; Estes, G. 2001. Pedogenic fractionation and bioavailability of uranium and thorium in naturally radioactive Spodosols. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 65: 1197-1203.
- Murphy, J.; Riley, J. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 27: 31-36.
- NCRP.1984. National Council on Radiation Protection and Measurements. Exposures from the Uranium Series with emphasis on Radon and its daughter. NCRP Report-77. Behesda, MD, USA.
- Nolan, A.; Zhang, H.; McLaughlin, M. 2005. Prediction of Zinc, Cadmium, Lead and Copper availability to wheat in contaminated soils using chemical speciation diffusive gradients in thin films, extraction, and isotopic dilution techniques. *J. Environ. Qual.*, 34: 496-507.
- Olsen, S.; Sommers, L. 1982. Phosphorus. En: *Methods of soil analysis. Part 2*. A.L. Page *et al.* (eds.) 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, Wisconsin, USA. pp. 403-430.
- Oncel, I.; Keleş, Y.; Ustün, A. 2000. Interactive effects of temperature and heavy metals stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environmental Pollution*, 107: 315-320.
- Oren Benaroya, R.; Tzin, V.; Tel-Or, E.; Zamski, E. 2004. Lead accumulation in the aquatic fern *Azolla filliculoides*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 639-645.
- Padmavathamma, P.; Li, L. 2007. Phytoremediation Technology: Hyperaccumulation metals in plants. *Water Air Soil Pollut*, 184: 105-126.
- Pai, M.; Horvath, E.; Janda, T.; Paldi, E.; Szalai, G. 2006. Physiological changes and defense mechanisms induced by stress in maize. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 169: 239-246.

- Pandey, N; Sharma, C.P. 2002. Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} y Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science*, 163: 753-758.
- Pande, S.; Deshmukh, A.; Shrivastava, P. 1993. The significance of the dormant stage in the growth cycle of deciduous plants for biochemical uranium prospecting, India. *J. Geochem. Exp.*, 46: 365-374.
- Perales-Vela, H., Peña-Castro, J., Cañizares-Villanueva, R. 2006. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64: 1-10.
- Poschenrieder, C.; Gunsé, B, Barceló, J. 1989. Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiol.*, 90: 1365-1371.
- Poschenrieder, C.; Tolrà, R.; Barceló, J. 2006. Can metals defend plants against biotic stress?. *Trends in Plant Science*, 11: 289-294.
- Pradines, C.; Wiktor, V.; Camilleri, V.; Gilbin, R. 2005. Development of biochemical methods to estimate the subcellular impact of uranium exposure on *Chlamydomonas reinhardtii*. *Radioprotection*, Suppl 1, 40: S163-S168.
- PRAMU, 2002. Evaluación Ambiental para el Proyecto de Restitución Ambiental de la Minería del Uranio. CNEA, Buenos Aires, Argentina, 240 pp.
- Qureshi, M.; Abdin, M.; Qadir, S.; Iqbal, M. 2007. Lead-induced oxidative stress and metabolic alterations in *Cassia angustifolia* Vahl. *Biologia Plantarum*, 51: 121-128.
- Rai, P.; Tripathi, B. 2008. Comparative assessment of *Azolla pinnata* and *Vallisneria spiralis* in Hg removal from G.B. Pant Sagar of Singrauli Industrial Region, India. *Environ. Monit. Assess*, online first.
- Raicevic, S.; Wright, J.; Veljkovic, V.; Conca, J. 2006. Theoretical stability assessment of uranyl phosphates and apatites: Selection of amendments for in situ remediation of Uranium. *Science of The Total Environment*, 355: 13-24.
- Rausser, W. 1990. Phytochelatin. *Annu. Rev. Biochem.*, 59: 61-86.
- Rellán-Alvárez, R.; Ortega-Villasante, C.; Álvarez-Fernández, A.; del Campo, F.; Hernández, L. 2006. Stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury. *Plant and Soil*, 279: 41-50.
- Romero Guzmán, E.; Esteller Alberich, M.; Ordóñez Regil, E. 2002. Uranium and phosphate behavior in the vadose zone of a fertilized corn field. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 254: 509-517.

- Rufyikiri G.; Huysmans, L.; Wannijn, J.; Van Hees, M.; Leyval, C.; Jakobsen, I. 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi can decrease the uptake of uranium by subterranean clover grown at high levels of uranium in soil. *Environmental Pollution*, 130: 427-436.
- Rufyikiri G.; Wannijn, J.; Wang, L.; Thiry, Y. 2006. Effect of phosphorus fertilization on the availability and uptake of uranium and nutrients by plants grown on soil derived from uranium mining debris. *Environmental Pollution*, 141: 420-427.
- Ruiz Leal, A. 1972. Flora popular mendocina. En: *Deserta, Contribuciones del Instituto Argentino de Investigaciones de Zonas Áridas*. Buenos Aires, Argentina, 299 pp.
- SAGyP. 1995. El deterioro de las tierras en la República Argentina. Ed. Secretaria de Agricultura y Pesca – Consejo Federal Agropecuario, 287 pp.
- Salt, D.; Smith, R.; Raskin, I. 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 643-648.
- Sandalio, L.; Dalurzo, H.; Gomez, M.; Romero Puertas, M.; del Rio, L. 2001. Cadmium-induced changes in growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, 52: 2115-2126.
- Saric, M.; Stojanovic, M.; Babic, M. 1995. Uranium in plant species grown on natural barren soil. *Journal of Plant Nutrition*, 18: 1509-1518.
- Schmidt, U. 2003. Enhancing phytoextraction: The effect of chemical soil manipulation on mobility, plant accumulation, and leaching of heavy metals. *J. Environ. Quality*, 32:1939-1954.
- Schützendübel, A.; Polle, A. 2002. Plant response to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Experimental Botany*, 53:1351-1365.
- Seaman, J.; Meehan, T.; Bertsch, P. 2001. Immobilization of Cesium-137 and uranium in contaminated sediments using soil amendments. *J. Environ. Qual.*, 30: 1206-1213.
- Seaman, J.; Hutchison, J.; Jackson, B.; Bulava, V. 2003. In situ treatment of metals in contaminated soils with phytate. *J. Environ. Quality*, 32: 153-161.
- Sela, M.; Tel-Or, E.; Fritz, E.; Huttermann, A. 1988. Localization of toxic effects of Cadmium, Copper, and Uranium in *Azolla*. *Plant Physiol.*, 88: 30-36.

- Shahandeh, H.; Hossner, L. 2002. Role of soil properties in phytoaccumulation of Uranium. *Water, Air, and Soil Pollution*, 141: 165-180.
- Shanker, A.; Cervantes, C.; Loza-Tavera, H.; Avudainayagam, S. 2005. Chromium toxicity in plants. *Environment International*, 31: 739-753.
- Sheppard, M.; Sheppard, S. 1985. The plant concentration ratio concept as applied to natural U. *Health Phys.*, 48: 494-500.
- Sheppard, S.; Evenden, W. 1992. Bioavailability Indices for Uranium: Effect of concentration in eleven soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 23: 117-124.
- Simon, F.G.; Biermann, V.; Segebade, C.; Hedrich, M. 2004. Behaviour of uranium in hydroxyapatite-bearing permeable reactive barriers: investigation using ^{237}U as a radioindicator. *Science of the Total Environment*, 326: 249-256.
- Singh, R.; Agrawal, M. 2007. Effects of sewage sludge amendment on heavy metal accumulation and consequent responses of *Beta vulgaris* plants. *Chemosphere*, 67: 2229-2240.
- Singh, S.; Malhotra, R.; Bajwa, B. 2005. Uranium uptake studies in some plants. *Radiation Measurements*. 40: 666-669.
- Soriano, M.A.; Fereres, E. 2003. Use of crops for in situ phytoremediation of polluted soils following a toxic flood from a mine spill. *Plant and Soil*, 256: 2563-2564.
- Sowder, A.; Bertsch, P.; Morris, P. 2003. Partitioning and availability of uranium and nickel in contaminated riparian sediments. *J. Environ. Qual.*, 32: 885-898.
- Subsecretaría de Medio Ambiente de Mendoza. 2006. Curso de educación ambiental. Fascículo 16, Flora nativa. 12 pp.
- Suñe, N.; Schez, G.; Caffaratti, S.; Maine, A. 2007. Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. *Environmental Pollution*, 145: 467-473.
- Terry, N.; Zayed, A.; de Souza, M.; Tarun, A. 2000. Selenium in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51: 401-432.
- Tong, Y-P.; Kneer, R.; Zhu, Y-G. 2004. Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends in Plant Science*, 9: 7-9.
- Tordoff, G.; Baker, A.; Willis, A. 2000. Current approaches to revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere*, 41: 219-228.

- Tyler, G.; Olsson, T. 2001. Plant uptake of major and minor mineral elements as influenced by soil acidity and liming. *Plant and Soil*, 230: 307-321.
- UGAN, Unidad de Gestión Ambiental Nacional. 1995. Marco Jurídico Ambiental para la Actividad Minera. Ley 24.585, Normativa Complementaria Presupuestos Mínimos. Ed. Subsecretaría de Minería. Secretaría de Industria, Comercio y Minería, República Argentina. 28 pp.
- Van Britson, G.; Slowikowski, B.; Bickel, M. 1995. A rapid method for the detection of uranium in surface water. *The Science of the Total Environment*, 173/174: 83-89.
- Vandenhove, H.; Van Hees, M. 2004. Phytoextraction for clean-up of low-level uranium contaminated soil evaluated. *J. Environ. Radioactivity*, 72: 41-45.
- Vandenhove, H.; Cuypers, A.; Van Hees, M.; Wannijn, J. 2006. Effect of uranium and cadmium uptake on oxidative stress reactions for *Phaseolus vulgaris*. En: *Uranium in the Environment, Mining Impact and Consequences*, B., Merkel; A., Hasche-Berger Ed., Berlin, ISBN 3-540-28363-3, pp. 175-183.
- Vandenhove, H.; Van Hees, M.; Wannijn, J.; Wouters, K.; Wang, L. 2007. Can we predict uranium bioavailability based on soil parameters? Part 2: Soil solution uranium concentration is not a good bioavailability index. *Environmental Pollution*, 145: 577-586.
- Van Steveninck, R.; Van Steveninck, M.; Fernando, D. 1992. Heavy metal (Zn, Cd) tolerance in selected clones of duck weed (*Lemna minor*). *Plant and Soil*, 146: 271-280.
- Vassil, A. D.; Kapulnik, Y; Raskin, I.; Salt, D. E. 1998 The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian mustard. *Plant Physiol.*, 117: 447-453.
- Vázquez, M. D.; Poschreinder, C.; Corrales, I.; Barcelo, J. 1999. Change in apoplastic Aluminum during the initial growth response to Aluminum by roots of a tolerant maize variety. *Plant Physiology*, 119: 435-444.
- Vera Tomé, F., Blanco Rodríguez, M.; Lozano, J. 2003. Soil-to-plant transfer factors for natural radionuclides and stable elements in a Mediterranean area. *J. Environ. Radioactivity*, 65: 161-175.
- Visintin, A.; Bernardello, G. 2005. Morfología y anatomía floral de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae). *Arnaldoa*, 12: 8-15.

-
- Walter, I; Martínez, F.; Cuevas, G. 2003. Dinámica de los metales pesados en un suelo degradado enmendado con residuos orgánicos. En: *Estudios de la zona no saturada del suelo*. Ed. J. Álvarez-Benedi y P. Marinero. Vol VI: 367-371.
- Wang, Z.; Zhang, Y.; Huang, Z.; Huang, L. 2008. Antioxidative response of metal-accumulator and non-accumulator plants under cadmium stress. *Plant and Soil*, online first.
- Wenzel, W.; Unterbrunner, R.; Sommer, P.; Sacco, P. 2003. Chelate-assisted phytoextraction using canola (*Brassica napus* L.) in outdoors pot and lysimeter experiments. *Plant and Soil*, 249: 83-96.
- Willett, I.; Bond, W. 1995. Sorption of manganese, uranium, and radium by highly weathered soils. *J. Environ. Qual.*, 24: 834-845.
- Wong, M. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, 50: 775-780.
- Yordanova, R.; Popova, L. 2007. Flooding-induced changes in photosynthesis and oxidative status in maize plants. *Acta Physiol. Plant.*, 6: 535-541.