

Trabajo Fin de Grado  
Grado en Biotecnología

# Nanofitorremediación Asistida de Suelos Contaminados con Metales y Diésel

En busca de la estrategia idónea para la recuperación de la salud  
del suelo

Autor/a:  
Mario Fernández Bernal

Directores:  
Dr. José María Becerril Soto  
Dra. María Teresa Gómez Sagasti

© 2017, Mario Fernández Bernal

Leioa, 27 de junio de 2017



## ÍNDICE

### RESUMEN

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....</b>	<b>4</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>4</b>
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	4
3.2. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUÍMICOS DEL SUELO.....	6
3.2.1. Determinación del contenido en metales totales y biodisponibles.....	6
3.2.2. Determinación del contenido en hidrocarburos .....	7
3.3. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS MICROBIANOS DEL SUELO ..	7
3.3.1. Determinación de la respiración basal e inducida.....	7
3.3.2. Determinación de la diversidad funcional microbiana.....	8
3.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO .....	9
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>9</b>
4.1. ANÁLISIS DEL SUELO .....	9
4.1.1. Contenido de metales totales y biodisponibles en suelo .....	9
4.1.2. Contenido de hidrocarburos en suelo.....	11
4.2. PARÁMETROS MICROBIANOS .....	11
4.2.1. Análisis de la actividad y biomasa microbiana .....	12
4.2.2. Análisis de la diversidad funcional microbiana .....	14
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>19</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>20</b>

### ANEXO I Tratamiento Estadístico



## RESUMEN

La contaminación mixta por metales e hidrocarburos es una de las grandes amenazas a las que está sometido el recurso suelo y supone un desafío para la aplicación de estrategias de descontaminación. A este respecto, la fitorremediación, que tiene como objetivo reducir el contaminante del suelo y recuperar su salud a través de las plantas y su rizosfera, es una de las tecnologías de descontaminación más respetuosas con el medio ambiente. En la actualidad, nuevas tecnologías como la nanofitorremediación asistida con enmiendas pretenden aumentar la eficacia de la fitorremediación mediante, (i) la incorporación de enmiendas orgánicas para mejorar las propiedades físico-químicas y biológicas, y (ii) la aplicación de nanopartículas de hierro cero-valente (nZVI) para favorecer la degradación de los contaminantes orgánicos. En este trabajo se desarrolló un experimento de microcosmos utilizando tres especies de la familia de las Brassicáceas (*Brassica napus*, *Brassica carinata* y *Brassica juncea*), enmienda orgánica y nZVI para nanofitorremediar un suelo contaminado con Zn (1.500 ppm), Cu (500 ppm), Cd (50 ppm) y diésel para automóvil (6.000 ppm). El objetivo principal del estudio fue determinar la combinación de tecnologías más eficientes para la eliminación de contaminantes y/o la recuperación de la salud del suelo en base a las propiedades microbianas, actividad, biomasa y diversidad funcional. El contenido en carbonatos del suelo fue el principal factor que contribuyó a la disminución de la biodisponibilidad de los metales del suelo seguido por la materia orgánica. El contenido de diésel disminuyó durante el ensayo y su degradación fue mayor en presencia de la enmienda. Además, la incorporación de enmienda provocó una mayor biomasa y actividad microbiana en suelos contaminados; pareciendo destacar en este caso la especie *B. juncea*. En cuanto a la diversidad funcional microbiana, destacó significativamente la planta *B. napus*. Por último, las nZVI a las dosis empleadas no fueron efectivas para disminuir la biodisponibilidad de los metales y/o aumentar la degradación del diésel, aunque tampoco produjeron toxicidad sobre la comunidad microbiana del suelo. A la vista de los resultados, se recomienda una fitorremediación asistida con *B. napus* por ser el proceso más eficaz para la recuperación de la salud del suelo.

**Palabras clave:** suelo, metales, diésel, enmienda orgánica, nZVI, *Brassica napus*, *Brassica juncea*, *Brassica carinata*, nanofitorremediación.



## 1. INTRODUCCIÓN

El suelo es un recurso complejo donde concurren una amplia gama de procesos físicos, químicos y biológicos, los cuales, a su vez, proporcionan servicios ecosistémicos esenciales. Funciones como ser el hábitat de una gran variedad de micro-, meso- y macro-organismos, reservorio de agua y nutrientes, sustento de la producción de materia orgánica y soporte de los ciclos biogeoquímicos (Brevik *et al.*, 2015) hacen del suelo un sistema vivo y dinámico, convirtiéndolo en objeto de estudio e interés.

A pesar de tener un papel clave en la supervivencia de los organismos, incluidos los seres humanos, el 33 % del suelo se encuentra degradado, en menor o mayor medida, debido a factores como la erosión, la falta de nutrientes o la contaminación (FAO, 2015). De hecho, el 35 % de los suelos está afectado por contaminación de metales, y el 24 % por hidrocarburos, como diésel, petróleo etc.; siendo común la contaminación mixta, con ambos (Agnello *et al.*, 2015).

Tradicionalmente, las técnicas físico-químicas de descontaminación como la vitrificación, incineración o lavado de los suelos han sido utilizadas para la recuperación de terrenos contaminados por su efectividad y bajo coste económico. Sin embargo, estas técnicas se caracterizan por un alto coste ambiental dado que producen cambios físicos, químicos y biológicos irreversibles en la estructura y funcionalidad del suelo, así como problemas de contaminación secundaria. En las últimas dos décadas se ha venido apostando por el uso de tecnologías más sostenibles, como la “fitorremediación” (Ali *et al.*, 2013). El término “fitorremediación” proviene del griego, *phytos* (planta) y *remedium* (remedio); se basa en el uso de plantas, así como de los microorganismos de su rizosfera, para reducir la concentración y el efecto de los contaminantes en el medio (Dar *et al.*, 2015; Ali *et al.*, 2013). Esta tecnología se divide en las siguientes estrategias: fitoextracción (i.e. acumulación de metales en la parte aérea de la planta), fitoestabilización (i.e. reducción de la movilidad y biodisponibilidad de los metales en el suelo), fitovolatilización (i.e. conversión de los contaminantes en especies volátiles para su eliminación por transpiración) y fito/rizodegradación de compuestos orgánicos en el entorno rizosférico (Ali *et al.*, 2013; Gómez-Sagasti *et al.*, 2012).

La especie vegetal es determinante en el éxito de la fitorremediación. En este sentido, en el presente estudio se diseñó un experimento de fitorremediación basado en tres especies pertenecientes a la familia de las brasicáceas: *Brassica napus*, *Brassica carinata* y *Brassica juncea*. Todas ellas se caracterizan por un extenso sistema radicular, gran biomasa y capacidad fitoextractora. De hecho, estudios previos han descrito el gran potencial de estas especies en programas de fitoextracción de suelos contaminados con metales, como el cadmio (Cd); el cobre (Cu); y el zinc (Zn) (Szczygłowska *et al.*, 2011; Dar *et al.*, 2015). Asimismo, se ha comprobado la bondad de la actividad de su rizosfera, concretamente la de *B. napus*, para la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Cheema *et al.*, 2010).

En la actualidad, es habitual la complementación de la fitorremediación con diferentes tecnologías con el objetivo de mejorar su eficacia. La aplicación de enmiendas orgánicas en el proceso de fitorremediación es una de ellas. En este trabajo en concreto se ha utilizado material compostado de Residuos Sólidos Urbanos (RSU) con vistas a no sólo mejorar la fitorremediación de suelos con contaminación mixta sino también a reutilizar, reciclar y revalorizar este tipo de residuos excedentarios (Ihobe CAPV, 2015). Las enmiendas orgánicas, *a priori*, tienen un triple efecto positivo: (i) favorecen el desarrollo y crecimiento de las plantas, (ii) de microorganismos presentes en el suelo; y, (iii) estabilizan los metales del suelo disminuyendo su biodisponibilidad (Kästner y Miltner, 2016).

Una de las tecnologías más innovadoras para estimular el proceso remediador es la aplicación de nanopartículas metálicas, partículas de diámetro inferior a 100 nm. En concreto, las nanopartículas de hierro cero valente, denominadas “nZVI” por sus siglas en inglés “Zero-Valent Iron Nanoparticles”, han sido descritas como una “nanosolución” eficaz a la contaminación de suelos y aguas (Rodrigues, 2016). Debido a su reducido tamaño y alta relación superficie-volumen, las nZVI tienen una alta reactividad hacia una amplia gama de contaminantes, incluyendo metales (Rodrigues, 2016) y compuestos clorados (Menéndez *et al.*, 2016). Aunque esta tecnología podría incrementar la eficacia del proceso fitorremediador, la introducción de las nZVI en el medio también puede conllevar riesgos para los organismos; existen estudios *in vitro* que describen efectos negativos de las nZVI sobre la comunidad microbiana de los suelos (Lefevre *et al.*, 2016).

A los daños directos por contacto con las nZVI, que generan la desorganización y aumento de la permeabilidad de las membranas, se les suman los indirectos causados por el estrés oxidativo que sufren las biomoléculas (Xie *et al.*, 2017). Los ensayos en microcosmos, como el aquí presentado, abogan por la evaluación de la ecotoxicidad de las nZVI previa a su aplicación en campo con el fin de garantizar su uso seguro.

Más allá de reducir la concentración de contaminante en el suelo, toda estrategia fitorremediadora debe contemplar como objetivo final recuperar la salud del suelo. La salud del suelo se define en textos de la FAO (2015) como “la capacidad continua del suelo de funcionar como un sistema vivo vital, dentro de los límites de los ecosistemas y del uso de la tierra, para sostener la productividad biológica, promover la calidad del aire y el agua, y mantener la salud vegetal, animal y humana”. Esta definición pone de manifiesto la importancia del suelo y su salud, así como la reducción de su toxicidad debido a los contaminantes presentes en él, la cual no tiene por qué tener una relación directa con la concentración total del contaminante (He *et al.*, 2016). En este contexto, es imprescindible disponer de un conjunto fiable de indicadores de la salud del suelo, entre los que se destacan las propiedades microbianas del suelo por su carácter integrador, sensibilidad, respuesta rápida y relevancia ecológica (Gómez-Sagasti *et al.*, 2012). Después de todo, los microorganismos están estrechamente relacionados con su entorno debido a su alta relación superficie-volumen y son, en gran medida, responsables de la salud del ecosistema del suelo (Epelde *et al.*, 2012). En particular, las propiedades del suelo relacionadas con la biomasa, la actividad y la diversidad de las comunidades microbianas del suelo tienen un gran valor como bioindicadores del impacto de la contaminación en la salud del suelo (Epelde *et al.*, 2008; 2012).

Considerando la dificultad de proceder a la remediación de suelos con contaminación mixta (metales y diésel) se evalúa la eficacia de (i) tres especies fitorremediadoras, (ii) el uso de material compostado de RSU, y (iii) la aplicación de las nZVI. La combinación de los tres da lugar a la estrategia de “nanofitorremediación asistida con enmienda orgánica”. Ésta será analizada mediante indicadores microbianos de la salud del suelo (biomasa, actividad y biodiversidad funcional). Se valorará, además, el efecto potencialmente adverso del uso de nanopartículas para los microorganismos del suelo.

## 2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

La hipótesis de este trabajo es la siguiente: la nanofitorremediación asistida con enmienda orgánica mejorará la salud de los suelos contaminados resultando en un incremento en los valores de los biomarcadores microbianos de biomasa, actividad y biodiversidad microbiana. Así, el principal objetivo es evaluar cuál es la combinación de especies vegetales y tecnologías más eficaz para mejorar la salud de suelos con contaminación mixta de metales (Cd, Zn y Cu) e hidrocarburos (diésel). Éste se puede dividir en los siguientes objetivos específicos:

- Objetivo 1.1.: Evaluación del proceso de nanofitorremediación asistida sobre el contenido de los contaminantes.
  - 1.1.1. Evaluación del contenido de metales totales y biodisponibles.
  - 1.2.1. Evaluación de la degradación de diésel.
- Objetivo 1.2.: Evaluación de la salud del suelo al final del proceso nanofitorremediador a partir de las propiedades de la comunidad microbiana.
  - 1.2.1. Evaluación de la actividad microbiana.
  - 1.2.2. Evaluación de la biomasa microbiana.
  - 1.2.3. Evaluación de la diversidad funcional microbiana.
  - 1.2.4. Evaluación de la toxicidad de las nZVI sobre la comunidad microbiana.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el fin de llevar a cabo los objetivos anteriormente mencionados, se realizó un estudio en microcosmos. Se recolectaron en junio de 2016 dos suelos localizados en la periferia del área metropolitana de Vitoria-Gasteiz (42°50'N; 2°40'W). Uno de ellos fue enmendado *in situ* un año antes con 100 T/ha de enmienda orgánica resultante del reciclaje de RSU, mientras que el otro se dejó sin enmendar. Los suelos se tamizaron a < 6 mm, se dejaron secar al aire y se caracterizaron físico-químicamente (**Tabla 1**). Seguidamente, ambos fueron artificialmente contaminados para conseguir las

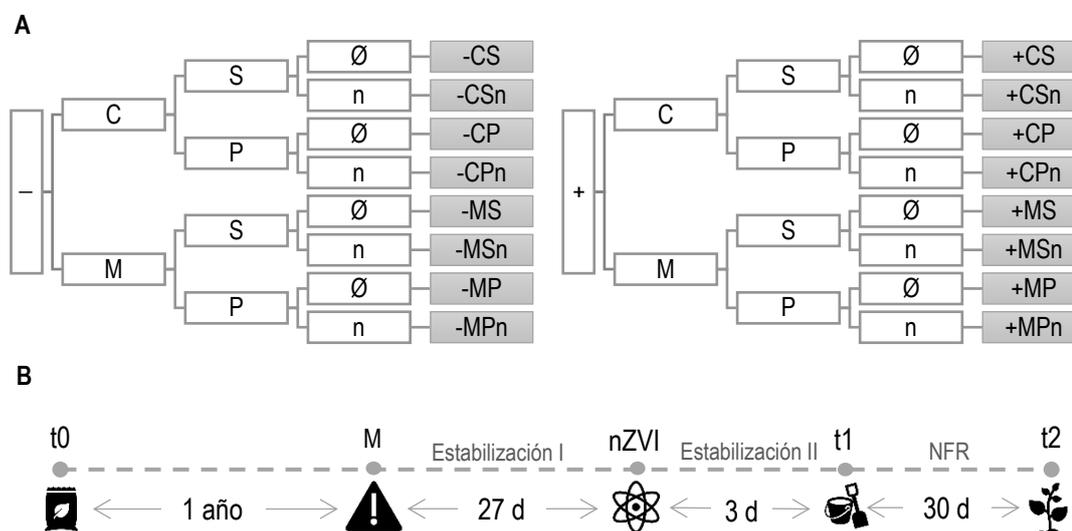
siguientes concentraciones finales de metales y diésel: Zn ( $1.500 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Cu ( $500 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y Cd ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) utilizando  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ , respectivamente, y diésel comercial de automoción ( $6.000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (**Figura 1**). A los suelos no contaminados se les añadió  $\text{KNO}_3$  ( $4.100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) para compensar el aporte de nitratos de los contaminados.

**Tabla 1. Caracterización físico-química de los suelos a estudio.**

	Suelo sin enmienda (-)	Suelo con enmienda (+)
Arcilla (%)	23,4	15,7
Arena gruesa (%)	17,9	14,5
Arena fina (%)	21,3	25,1
Limo (%)	37,5	44,0
Textura (USDA)	Franco	Franco
pH (1:2,5)	7,9	8,0
Materia orgánica (%)	1,0	4,3
Fósforo Olsen (ppm)	7,2	7,2
Carbonatos (%)	54,7	54,7
[Zn] Tot / Bio (ppm)	41,4 / 0,0	127,8 / 0,0
[Cu] Tot / Bio (ppm)	6,9 / 0,01	73,3 / 0,03
[Cd] Tot / Bio (ppm)	0,3 / 0,0	0,5 / 0,0

USDA: United States Department of Agriculture

Tot: concentración total de metal; Bio: concentración biodisponible de metal



**Figura 1. Codificación utilizada para los diferentes tratamientos (A) y cronograma del diseño experimental (B).** A. La codificación se resume en tratamientos sin (-) o con (+) enmienda; sin contaminar (Control, C) o con contaminación (Mixta, M); fitorremediación con planta (P) utilizando *Brassica napus*, *Brassica carinata*, *Brassica juncea*, y sin planta (S); y, sin (Ø) o con (n) nanopartículas de hierro cero-valente nZVI. B. Línea temporal con los hitos del experimento (d, días): aplicación de la enmienda (t0); muestreo de suelo y su contaminación con metales y diésel (M); aplicación de nanopartículas (nZVI); siembra de las brasicas (t1); proceso de nanofitorremediación (NFR) y; finalmente, cosecha de suelo y material vegetal (t2).

Los suelos -C, -M, +C y +M se mezclaron a fondo y se repartieron en macetas con 700 g de suelo cada una; se colocaron en una cámara de crecimiento fitotrón bajo condiciones controladas (fotoperiodo 14/10 h día/noche, temperatura 25/18 °C día/noche, humedad relativa 60/80 % día/noche, 200 mmol fotones m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) durante 27 días, con el fin de permitir la estabilización de los contaminantes en el suelo. Tras este proceso, las nZVI (NanoFer Star, Nanoiron s.r.o.) se activaron 48 horas antes de su aplicación al suelo (**Figura 1B**) siguiendo las instrucciones del fabricante. Éstas se aplicaron a la concentración de 1 g kg<sup>-1</sup> de peso seco (PS) de suelo. Pasados tres días desde su aplicación y previo a la siembra se muestrearon los suelos tratados (muestreo t1). A continuación, se procedió a la siembra (t1) en la mitad de los tratamientos (tratamiento “P”) de las tres especies fitorremediadoras, concretamente, tres especies de la familia *Brassicaceae*: *Brassica napus* (n. com. colza), *Brassica carinata* (n. com. mostaza etíope) y *Brassica juncea* (n. com. mostaza oriental). La mitad restante se dejó como no sembrada (tratamiento “S”). En la **Figura 1A** se muestran todos los tratamientos (número de réplicas biológicas = 4; muestras totales = 128).

El experimento de nanofitorremediación asistida tuvo una duración de un mes en fitotrón (**Figura 1B**) bajo las condiciones mencionadas, regando periódicamente las plantas en el plato para evitar el arrastre de los contaminantes de la maceta. Pasado ese periodo, se realizó un muestreo final (t2).

### **3.2. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUÍMICOS DEL SUELO**

En ambos muestreos (t1 y t2), las muestras de suelos para la determinación de las propiedades microbianas (ver Apartado 3.3.) se conservaron a 4 °C mientras que las destinadas a la determinación de metales (totales y disponibles) e hidrocarburos (ver Apartado 3.2.) se secaron en una estufa a 35 °C durante 48 h. Además, se determinó la relación peso fresco (PF)/peso seco (PS) de todas ellas.

#### **3.2.1. Determinación del contenido en metales totales y biodisponibles**

Las muestras de suelo seco fueron molidas a un tamaño de partícula de 0,125 mm. Para la determinación del contenido total de Zn, Cu y Cd, las muestras de suelo fueron sometidas a digestión ácida (HCl y HNO<sub>3</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de acuerdo con el método US-EPA 3051 A (2007).

Los metales potencialmente biodisponibles fueron extraídos mediante  $\text{CaCl}_2$  0,01 M siguiendo el método descrito por Houba *et al.* (2000). Brevemente, se mezclaron 2 g de suelo con 20 mL de  $\text{CaCl}_2$ , fueron agitados por 2 h a 220 rpm, y se dejaron reposar durante 30 minutos. Posteriormente, los sobrenadantes fueron recolectados y filtrados (0,45  $\mu\text{m}$ ). Todos los extractos fueron acidificados con  $\text{HNO}_3$  al 3 % y preservados a 4 °C. Finalmente, el contenido total y biodisponible de metales fue determinado mediante Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) (Agilent 7700).

### **3.2.2. Determinación del contenido en hidrocarburos**

Con el fin de determinar el contenido en hidrocarburos, se utilizó el procedimiento descrito por Bartolomé *et al.* (2005). En resumen, 0,5 g de suelo seco se mezclaron con 15 mL de acetona y se sometieron a una extracción mediante un sistema cerrado de microondas MDS-2000 (CEM, Matthews, NC, USA). El extracto fue filtrado (0,45  $\mu\text{m}$ ) y lavado mediante una extracción en fase sólida con cartuchos Florisil®. Finalmente, los extractos obtenidos fueron analizados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), determinando el contenido de hidrocarburos totales C12-C140 y fracciones con distinto peso molecular.

## **3.3. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS MICROBIANOS DEL SUELO**

Para evaluar la recuperación de la salud del suelo (i.e. el objetivo final del proceso remediador) es fundamental la determinación de parámetros microbianos, tales como la actividad y biomasa de la comunidad microbiana, a partir de la respiración basal (RB) e inducida (RI), respectivamente; así como su diversidad funcional mediante placas Biolog<sup>TM</sup> tal y como se detalla a continuación.

### **3.3.1. Determinación de la respiración basal e inducida**

Para la determinación de la RB de las muestras de suelo guardados a 4 °C, se utilizó un protocolo similar el utilizado por Epelde (2012). Se pesaron 20 g peso fresco de suelo de cada muestra y se colocaron en un tarro hermético. Posteriormente, se introdujo en ese mismo recipiente un vial con 10 mL de  $\text{NaOH}$  0,2 N. Los tarros fueron incubados a 30 °C durante 72 h. Pasado ese tiempo, se extrajo el vial y se realizó una

valoración ácido-base con HCl 0,1 N, en presencia de fenolftaleína. Se incubaron tres viales con 10 mL de agua destilada (sin suelo) a modo de referencia. Finalizada la determinación de la RB, los suelos fueron mezclados con una solución de glucosa en una proporción 10 g kg<sup>-1</sup> de suelo en sus respectivos tarros herméticos para la determinación de la RI. Los tarros se incubaron durante 6 h bajo las mismas condiciones que en la RB.

$$CO_2 = \frac{\Delta \text{Volumen HCl} \cdot \text{Normalidad HCl} \cdot \text{Peso equivalente de C}}{\text{Peso del suelo} \cdot \text{Ratio Materia Seca del Suelo} \cdot \text{Tiempo}} \quad (1)$$

Los cálculos pertinentes para la determinación de los equivalentes de CO<sub>2</sub> consumidos por cada muestra se llevaron a cabo mediante la **Ecuación (1)**.

### 3.3.2. Determinación de la diversidad funcional microbiana

Los diversos parámetros relacionados con la diversidad microbiana fueron evaluados mediante placas Biolog EcoPlate™ constituidas por 31 sustratos, entre los cuales se encuentran principalmente aminas, aminoácidos, carbohidratos y ácidos carboxílicos.

Se determinaron los siguientes índices a las 40 h de crecimiento: la Actividad de Degradación de Sustratos (ADS), calculado como el área bajo la curva de crecimiento microbiano, indicador del desarrollo de la absorbancia y de las diferencias en la fase *lag* y ratios de crecimiento (Guckert *et al.*, 1996); y, el índice de Shannon (H') calculado a partir de NUS (Number of Utilized Substrates) o el número de sustratos que es capaz de utilizar cada muestra (Epelde *et al.*, 2008).

Brevemente, se pesó la cantidad de suelo fresco equivalente a 1 g de PS suelo, y se diluyó en 9 mL de agua MiliQ. Tras una incubación de 1 h a 125 rpm, las muestras se agitaron con un espacio de 30 segundos entre ellas, para después dejarlas sedimentar y tomar 200 µL del sobrenadante en el mismo intervalo de tiempo. Los extractos se diluyeron 100 veces, añadiendo 150 µL de cada uno al pocillo correspondiente de la placa. Todo el proceso se realizó con material estéril. Finalmente, las placas se incubaron a 30 °C en oscuridad durante una semana, tomando medidas de absorbancia cada 24 h mediante un espectrofotómetro de placas. En base a esos datos se determinó el punto medio de la fase exponencial en la utilización de los sustratos que se fijó en las 40 h de incubación.

### 3.4. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas en la RB, RI, ADS y H' entre los tratamientos y entre las especies de brásicas se comprobó la normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad (prueba de Levene) de los datos. Cuando la hipótesis nula de ambas pruebas fue aceptada, la posible existencia de diferencias entre tratamientos/especies se realizó mediante ANOVA de una vía seguida del pos-hoc Duncan ( $P < 0,05$ ). Si los datos, aun teniendo una distribución normal, ésta no era homogénea el pos-hoc utilizado fue Games-Hawell ( $P < 0,05$ ). En caso de que los datos no tuviesen una distribución normal, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis ( $P < 0,05$ ). El análisis estadístico se realizó mediante el software SPSS© 22.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como ya se ha mencionado, para evaluar la eficacia de la enmienda y las nanopartículas en el proceso fitorremediador de los suelos con contaminación mixta; y a fin de conocer la salud del suelo contaminado, se analizaron diferentes parámetros microbianos de indicadores de salud del suelo (Gómez-Sagasti *et al.*, 2012).

### 4.1. ANÁLISIS DEL SUELO

El objetivo de un proceso fitorremediador es disminuir la concentración y/o la biodisponibilidad de los contaminantes del suelo. Este parámetro es esencial para relacionar los resultados obtenidos mediante los parámetros microbianos con la contaminación.

#### 4.1.1. Contenido de metales totales y biodisponibles en suelo

En cuanto a los metales totales del suelo, su cantidad no varió significativamente entre el tiempo de siembra (t1) y el de cosecha (t2) en ninguno de los tratamientos (datos no mostrados). Por el contrario, sí que se observaron diferencias en la biodisponibilidad de cada uno de los mismos como se muestra en la **Tabla 2**. No existieron diferencias significativas entre especies. Así, la principal causa de la reducción de la biodisponibilidad fue el tiempo, ya que incluso el suelo sin planta mostró niveles de

biodisponibilidad de metales equivalentes a los observados en suelos sembrados. Analizándolo en detalle, en los suelos sin planta el Zn (**Tabla 2**) y el Cu (**Tabla 2**) se redujeron (de t1 a t2) 2 y 1,5 veces, respectivamente. En presencia de nZVI, esta reducción no fue tan acusada, e incluso se observó un aumento en el Cu biodisponible. En los suelos enmendados la biodisponibilidad de Zn y Cu fue mayor que la de los suelos sin enmendar, lo cual no se corresponde a la hipótesis inicial (estabilización de metales) y a resultados de otros estudios (Venegas *et al.*, 2016). Únicamente el Cd tuvo niveles de biodisponibilidad inferiores en presencia de enmienda (**Tabla 2**). El efecto quelante de la enmienda se encuentra relacionado, en gran medida, con un aumento del pH, así como el contenido de la misma (Venegas *et al.*, 2016; Kästner y Miltner, 2016). No obstante, el suelo con enmienda posee un pH básico (**Tabla 1**), por lo que éste no justifica la diferencia. La diferencia más notable entre ambos suelos fue la mayor concentración de Zn y Cu de la propia enmienda y la reducción de la cantidad de arcilla en los suelos enmendados (**Tabla 1**), la cual podría ser agravante del efecto, pues han sido ampliamente investigadas en adsorción de metales (Uddin, 2017).

**Tabla 2. Concentración biodisponible de Zn, Cu y Cd.** Promedios en partes por millón (ppm) de los metales biodisponibles  $\pm$  error estándar (n=4). Datos del momento de contaminación (t0), siembra (t1) y cosecha (t2).

Zn	t0	t1	t2			
	Sin Planta	Sin Planta	Sin Planta	<i>B. napus</i>	<i>B. carinata</i>	<i>B. juncea</i>
-M	2,00 $\pm$ 0,09	0,45 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,02	0,28 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,02	0,25 $\pm$ 0,02
+M	4,46 $\pm$ 0,82	0,69 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,08	0,38 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,02	0,45 $\pm$ 0,01
-Mn	-	0,44 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,01
+Mn	-	0,53 $\pm$ 0,05	0,34 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,07
<b>Cu</b>						
-M	0,08 $\pm$ <0,01	0,08 $\pm$ <0,01	0,06 $\pm$ <0,01	0,05 $\pm$ <0,01	0,05 $\pm$ <0,01	0,04 $\pm$ <0,01
+M	0,27 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ <0,01	0,15 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,01
-Mn	-	0,06 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ <0,01	0,07 $\pm$ <0,01	0,07 $\pm$ <0,01	0,10 $\pm$ 0,03
+Mn	-	0,25 $\pm$ 0,02	0,16 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ <0,01
<b>Cd</b>						
-M	0,16 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ <0,01	0,04 $\pm$ <0,01	0,04 $\pm$ <0,01	0,03 $\pm$ <0,01	0,04 $\pm$ <0,01
+M	0,15 $\pm$ <0,02	0,03 $\pm$ <0,01	0,02 $\pm$ <0,01	0,02 $\pm$ <0,01	0,02 $\pm$ <0,01	0,02 $\pm$ <0,01
-Mn	-	0,06 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ <0,01	0,04 $\pm$ <0,01	0,04 $\pm$ <0,01	0,04 $\pm$ <0,01
+Mn	-	0,03 $\pm$ <0,01	0,02 $\pm$ <0,01	0,02 $\pm$ <0,01	0,02 $\pm$ <0,01	0,02 $\pm$ <0,01

En cualquier caso, los niveles de metales biodisponibles fueron muy bajos debido a la posible formación de complejos con los aniones inorgánicos del suelo. De hecho, la alta presencia de carbonatos (54,7 %) justifica la baja disponibilidad de metales y, por tanto, limita su toxicidad y bioacumulación en plantas y otros organismos.

#### 4.1.2. Contenido de hidrocarburos en suelo

Los hidrocarburos fueron analizados según su peso molecular; contenido total (**Tabla 3**) y fracciones C<sub>13</sub>-C<sub>16</sub>, C<sub>17</sub>-C<sub>21</sub>, y C<sub>22</sub>-C<sub>30</sub> (datos no mostrados). Desde el inicio del periodo de estabilización se produjo una progresiva degradación del diésel desde  $\pm 2.000$  ppm (t<sub>0</sub>) a 1300-1400 ppm (t<sub>1</sub>) en suelos no enmendados, e incluso mayor en presencia de enmienda. Ésta estimuló los microorganismos presentes en el suelo resultando en una mayor degradación de los hidrocarburos presentes en el diésel.

**Tabla 3. Hidrocarburos totales.** Promedio en partes por millón (ppm) de hidrocarburos totales  $\pm$  error estándar de la media (n=4). Datos del momento de contaminación (t<sub>0</sub>), siembra (t<sub>1</sub>) y cosecha (t<sub>2</sub>).

Diésel ppm	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>			
	Sin Planta	Sin Planta	Sin Planta	<i>B. napus</i>	<i>B. carinata</i>	<i>B. juncea</i>
-M	2.116,6	1.419,5 $\pm$ 39,6	761,1 $\pm$ 12,8	808,7 $\pm$ 19,9	709,2 $\pm$ 39,1	871,3 $\pm$ 65,8
+M	1.851,3	862,4 $\pm$ 22,1	784,4 $\pm$ 18,7	711,9 $\pm$ 48,5	661,7 $\pm$ 46,1	851,5 $\pm$ 21,0
-Mn	-	1.273,2 $\pm$ 114,7	942,2 $\pm$ 42,9	756,9 $\pm$ 162,8	883,8 $\pm$ 143,1	921,6 $\pm$ 93,6
+Mn	-	687,5 $\pm$ 27,5	721,2 $\pm$ 69,3	765,5 $\pm$ 95,5	800,9 $\pm$ 69,2	678,0 $\pm$ 22,4

No obstante, durante el proceso fitorremediador (de t<sub>1</sub> a t<sub>2</sub>) la tasa de degradación con enmienda fue menor, y más activa en los suelos no enmendados, de forma que al final el diésel residual fue similar en todos los tratamientos (Barrutia *et al.*, 2011). Destacó el caso de *B. carinata* en ambos tratamientos sin nZVI. En cuanto a éstas, parecen no producir cambios significativos en el perfil de degradación de los hidrocarburos.

#### 4.2. PARÁMETROS MICROBIANOS

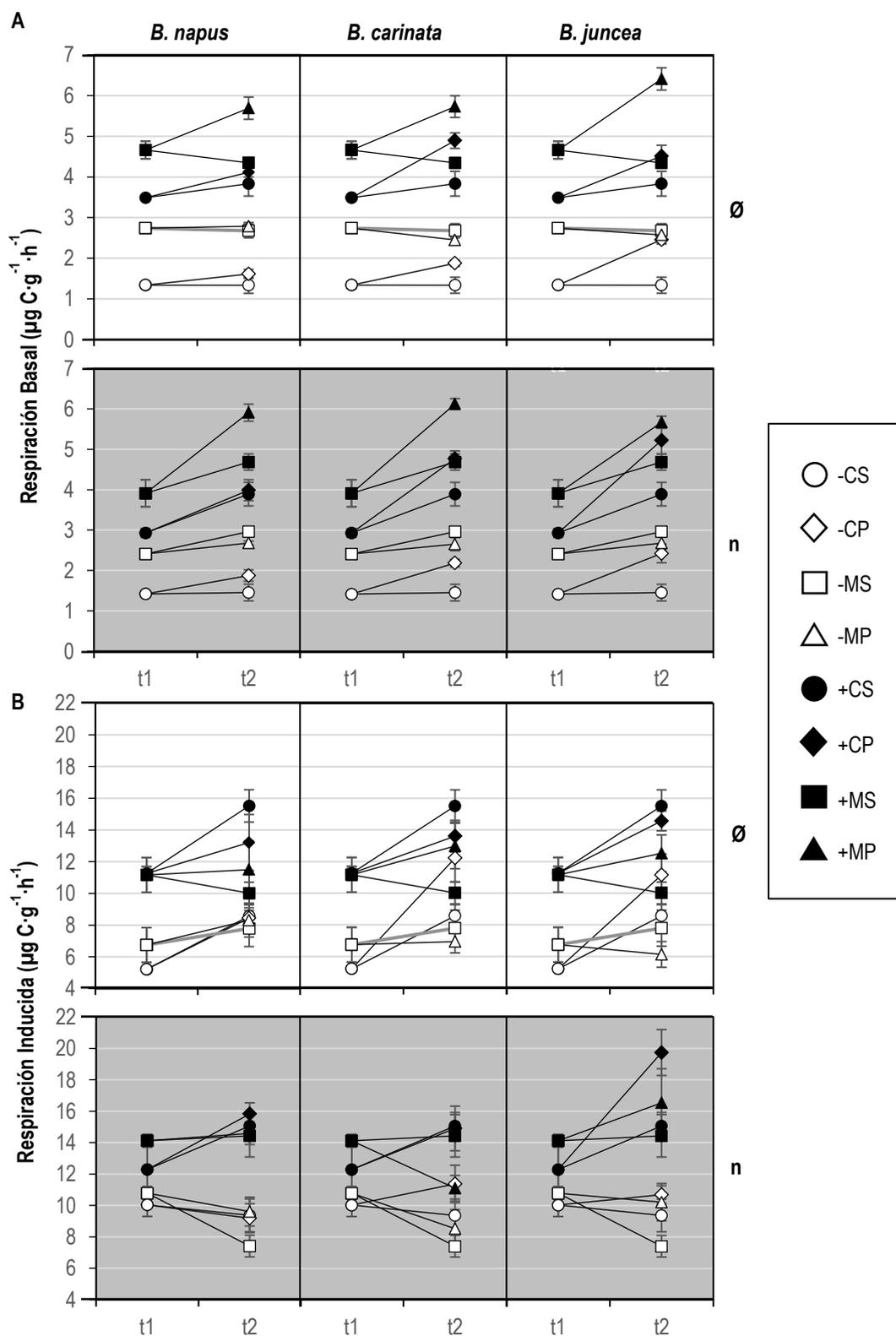
El análisis de las comunidades microbianas relacionadas a los diferentes tratamientos es la columna vertebral de este trabajo, siendo de gran relevancia para determinar el estado de la salud del suelo tras el proceso de nanofitorremediación asistida.

#### 4.2.1. Análisis de la actividad y biomasa microbiana

La incorporación de enmienda al suelo tuvo un efecto estimulante significativo (**Tabla AI.3**) sobre las comunidades microbianas del suelo ya que en todos los tratamientos enmendados se observó una mayor actividad (**Figura 2A**) y biomasa (**Figura 2B**) microbiana en ambos tiempos, t1 y t2. Tanto en el suelo enmendado como en el sin enmendar, la contaminación mixta produjo un aumento significativo en la actividad microbiana (**Figura 2A; Tabla AI.3**), excepto en los suelos con *B. juncea* donde, en general, se mantuvo a los niveles de los suelos control (no ocurre en suelos contaminados, enmendados y sin nanopartículas). Este aumento puede entenderse como (i) estrés, como se ha comprobado en anteriores estudios con contaminación de metales (Kaplan *et al.*, 2013; Klimek *et al.*, 2016) o (ii) una estimulación de la actividad microbiana incrementada por la degradación del hidrocarburo contaminante (Riveroll-Larios *et al.*, 2015). El hecho de que la degradación del diésel (**Tabla 3**) fuera finalmente similar en todos los tratamientos indicaría que el aumento fue debido al estrés por contaminación metálica.

El efecto positivo de las tres especies de brásicas en la actividad microbiana es especialmente notable (y significativo) en los suelos enmendados y contaminados (**Figura 2A; Tabla AI.4**). Es de remarcar el efecto de *B. juncea*, que, aun no siendo significativo, aumentó la actividad microbiana en suelos no contaminados tanto si éstos estaban enmendados como si no. Sin embargo, las nZVI no tuvieron un efecto significativo en la actividad microbiana (**Tabla AI.3**). Aunque en este estudio las nZVI no mejoraron el proceso remediador, sí se han identificado mejoras con las mismas en otros estudios (Jiang *et al.*, 2015). El aspecto positivo es que incluso a la concentración utilizada, 1 g kg<sup>-1</sup> de suelo, no disminuyó la actividad de los microorganismos del suelo ni en los controles ni en los suelos contaminados.

En cuanto a la biomasa microbiana (**Figura 2B**), se debe tener en cuenta que los datos de RI fueron mucho más elevados que los obtenidos en la RB debido a la aplicación de un sustrato universal (glucosa) fácilmente utilizable por una amplia mayoría de microorganismos. En los suelos contaminados sin enmienda, se produjo una reducción significativa de la biomasa microbiana respecto al control (**Tabla AI.5**), siendo esta reducción aún más notable en suelos con *B. juncea* y *B. carinata*.



**Figura 2. Respiración Basal (RB) (A) e Inducida (RI) (B).** Valores obtenidos en las distintas muestras de suelo a tiempo de siembra (t1) y de cosecha (t2); suelos con (fondo gris) y sin nZVI (fondo blanco); y, con (marcador negro) y sin enmienda (marcador blanco). Las figuras con aristas hacen referencia a tratamientos con planta (P) (triángulo: control; rombo: contaminado), mientras que el círculo (control) y cuadrado (contaminado) se refieren a tratamientos sin planta (S).

La aplicación de enmienda, por su parte, aumentó significativamente la biomasa microbiana en varios suelos, tanto contaminados como no (**Tabla AI.5**). Sin embargo, los contaminantes redujeron la biomasa microbiana incluso en presencia de la enmienda. Esta observación contribuye a explicar que la estimulación de la actividad por el contaminante es un síntoma de estrés en suelos contaminados (Galende *et al.*, 2014). Las especies de plantas no tuvieron un efecto significativo sobre la biomasa microbiana. No obstante, *B. juncea* aumentó significativamente la biomasa microbiana en suelos control y contaminados tanto enmendados como sin enmendar en presencia de nZVI, así como *B. napus* (**Tabla AI.5**). A la hora de comparar ambas, se comprobó la superioridad de *B. juncea* (**Tabla AI.6**). Es bajo esta casuística, donde se observó un efecto positivo de las nZVI, dado que amortiguaron la reducción de la biomasa microbiana producida por la contaminación.

En resumen, la tecnología más eficaz para estimular la actividad y biomasa microbiana como indicadores de salud del suelo sería una nanofitorremediación asistida con *B. juncea*.

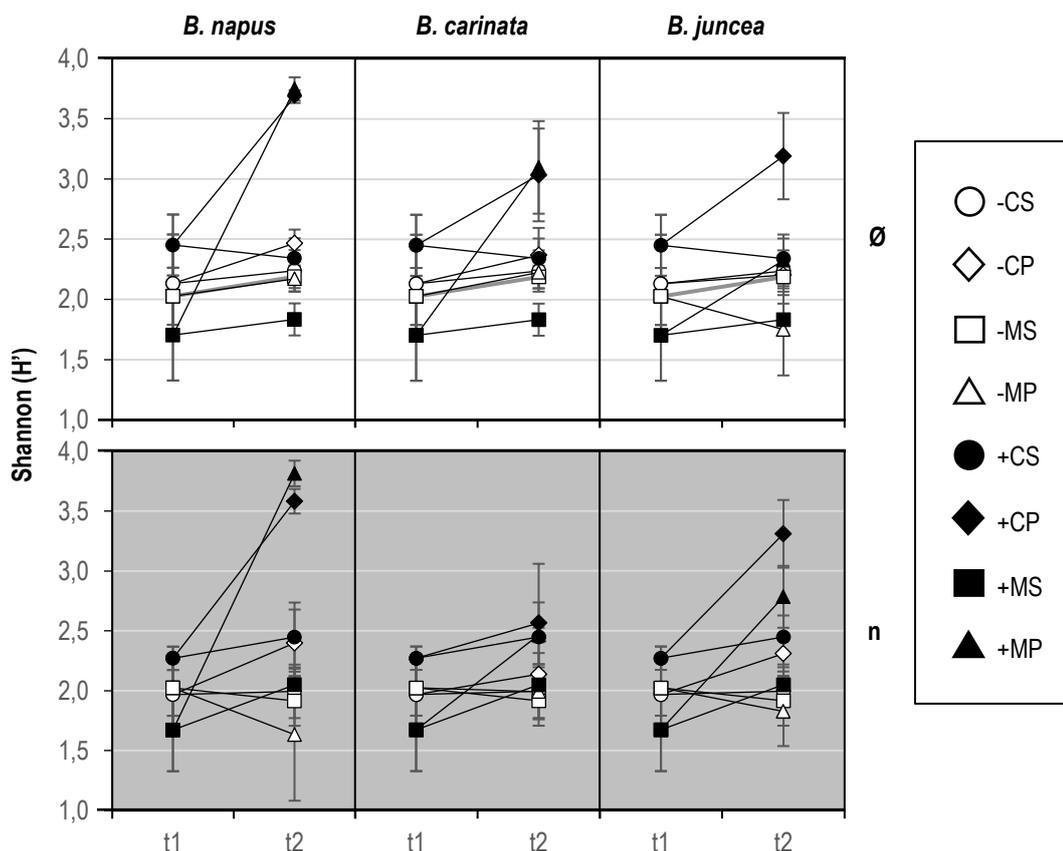
#### **4.2.2. Análisis de la diversidad funcional microbiana**

El índice de Shannon ( $H'$ ) (**Figura 3**) se define como la capacidad de la comunidad bacteriana del suelo para degradar más o menos tipos de fuentes de carbono, siendo así un índice de diversidad fisiológica de la comunidad bacteriana que en él habita.

Las comunidades microbianas capaces de degradar más sustratos o degradarlos con una eficiencia similar tendrán valores más altos de  $H'$ . En este sentido, la enmienda no tuvo un efecto tan remarcable sobre la diversidad funcional como el observado en la actividad (**Figura 2A**) y biomasa microbiana (**Figura 2B**), sobre todo en los suelos contaminados, los cuales tienen los valores más bajos. Estos resultados son similares a los de otros grupos, los cuales también obtuvieron menores valores de biodiversidad en suelos contaminados con Zn, Cu y Cd (Kaplan *et al.*, 2013).

Sin embargo, la presencia de planta tuvo un efecto destacado en la estimulación de la biodiversidad funcional (**Figura 3**). Es sabido que hasta un 21 % del C fijado en la fotosíntesis por las plantas es excretado por las mismas en forma de exudados radiculares a la rizosfera. Estos exudados sirven para mantener un microbioma

específico que será el que proteja a la planta de estreses bióticos y abióticos, incluyendo la presencia de contaminantes y falta de nutrientes (Huang *et al.*, 2014). De las tres especies ensayadas, *B. napus* fue la que destacó en suelos contaminados con enmienda (**Tabla AI.8**), favoreciendo significativamente la biodiversidad funcional de la comunidad microbiana del suelo y sólo en suelos enmendados y sin nanopartículas; aunque *B. juncea* también favoreció la diversidad, esta vez, en suelos enmendados y con nanopartículas (**Figura 3; Tabla AI.7**). Sin embargo, la incorporación de nZVI al suelo, en general, no afectó significativamente a la diversidad funcional (**Tabla AI.7**), indicando que a las dosis empleadas en nuestro estudio las nZVI no tuvieron un efecto negativo.



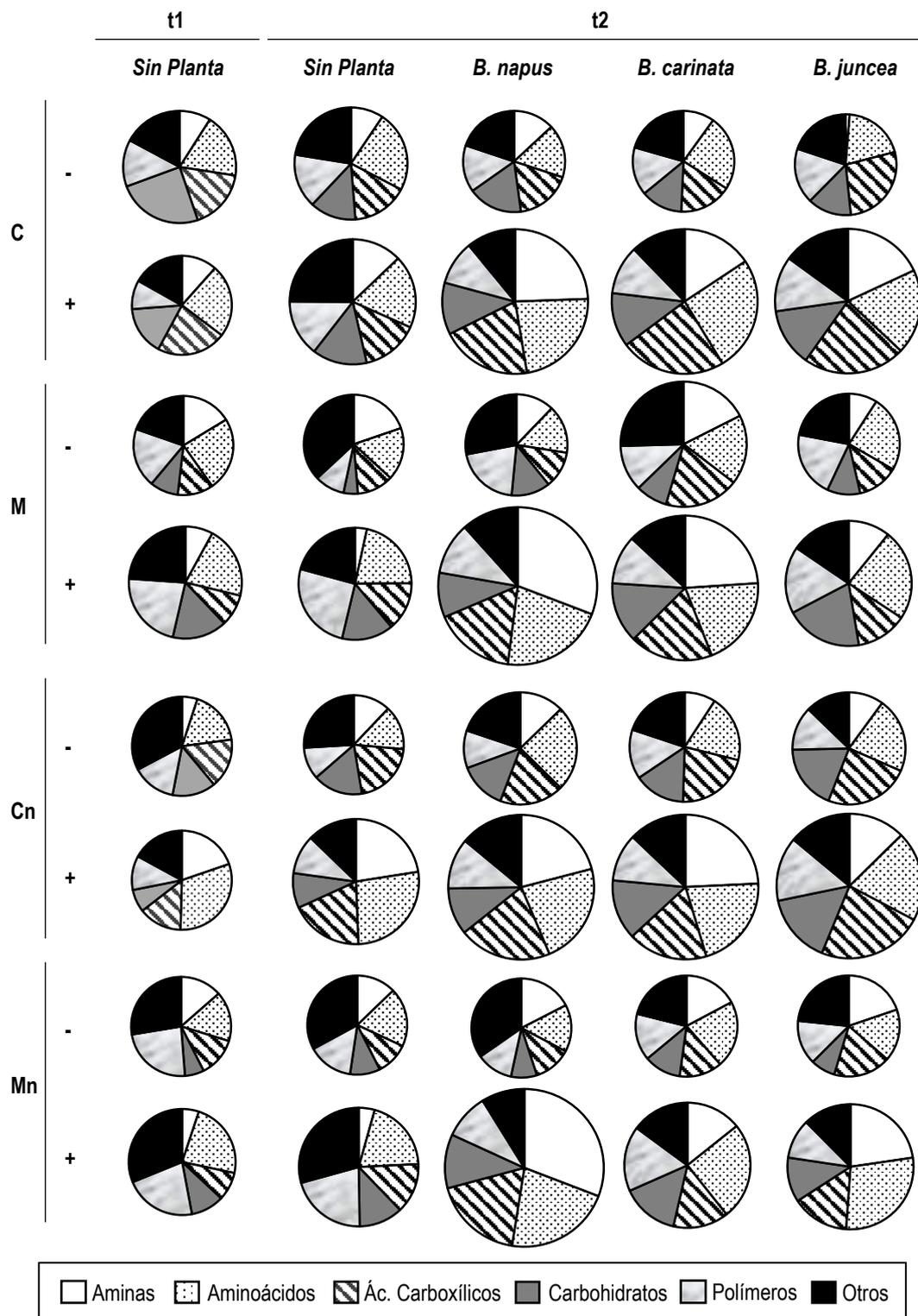
**Figura 3. Índice de diversidad funcional de Shannon ( $H'$ ).** Resultados obtenidos a tiempo de siembra ( $t_1$ ) y de cosecha ( $t_2$ ). Suelos con (fondo gris) y sin nZVI (fondo blanco); y, con (marcador negro) y sin enmienda (marcador blanco). Las figuras con aristas hacen referencia a tratamientos con planta (P) (triángulo: control; rombo: contaminado), mientras que el círculo (control) y cuadrado (contaminado) se refieren a tratamientos sin planta (S).

El efecto beneficioso de *B. napus* sobre la diversidad funcional del suelo se pudo observar también tras desglosar los sustratos por grupos metabólicos (**Figura 4**). Esta especie propició un mayor desarrollo de la actividad degradadora microbiana, particularmente en suelos contaminados y enmendados, y más en presencia de nZVI.

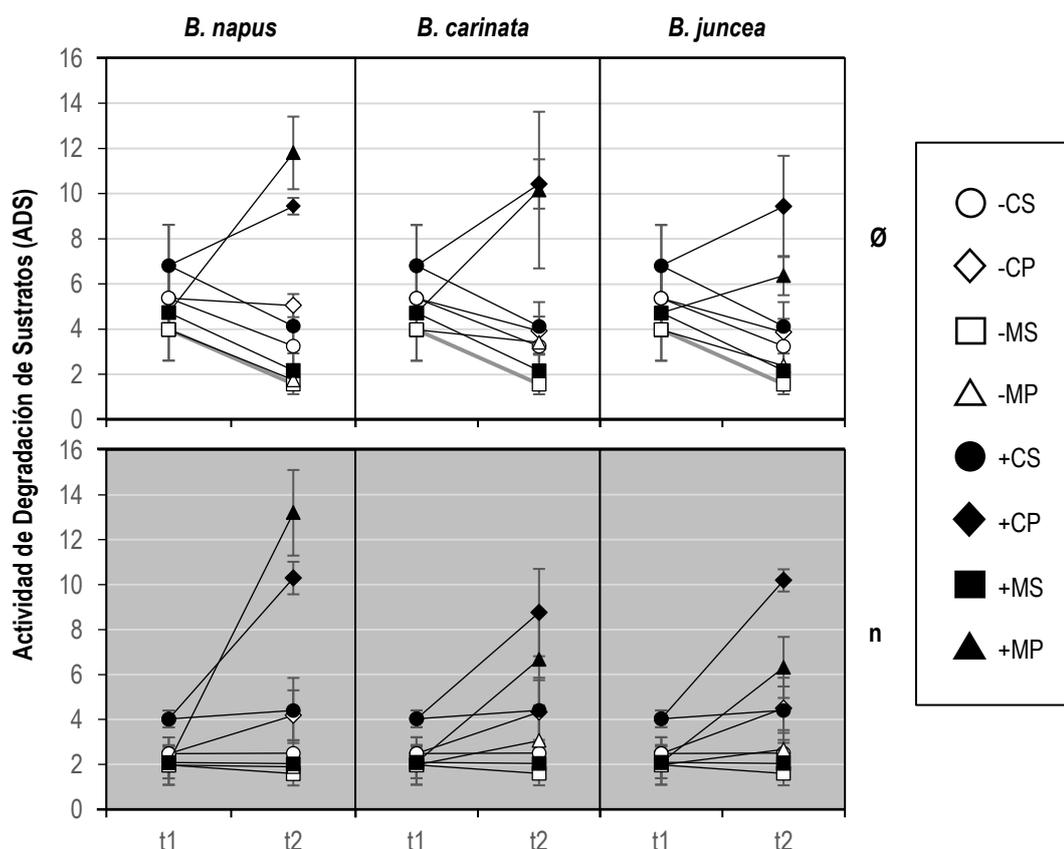
Analizando los grupos de sustratos utilizados, las tres especies estimularon el uso de sustratos fácilmente utilizables por los microorganismos, como las aminas, aminoácidos y ácidos carboxílicos, especialmente en presencia de *B. napus* seguida de *B. carinata* y *B. juncea*; esto, podría explicar la estimulación que la primera es capaz de provocar. Como ya hemos indicado, no es de extrañar que las plantas estimulen la diversidad microbiana, ya que muchos de los exudados de la planta son metabolitos relacionados con compuestos aminados y ácidos carboxílicos (Huang *et al.*, 2014). Al incorporar nZVI al suelo, la secuencia de la especie vegetal varió de forma que *B. juncea* promovió más el uso de los grupos de sustratos mencionados que *B. carinata*, ambas por detrás de *B. napus*. Estos tres grupos de sustratos son, aparentemente, los más utilizados por los microorganismos del suelo, como se puede comprobar en el estudio de Rutgers y su equipo (2016), donde se menciona que los compuestos de mayor relevancia son el ácido D-galacturónico (ácido carboxílico), la L-asparagina (aminoácido) y la putrescina (amina).

Para finalizar, el análisis de la actividad de degradación de sustratos o ADS (**Figura 5**) nos aporta un resultado en el que se integra tanto la actividad como la biodiversidad microbiana existente. De manera similar a Shannon, la combinación de enmienda y planta aumentó significativamente los valores de ADS, principalmente en el caso de *B. napus* (**Figura 5; Tabla AI.9**). Ésta vuelve a destacar significativamente frente a las otras dos especies en suelos contaminados con enmienda (**Tabla AI.10**).

Este efecto estimulante de *B. napus* debe ser investigado con más profundidad, ya que además de ser una especie apta para la producción de biocombustibles con alta biomasa, es capaz de estimular la actividad y diversidad microbiana. Estas características la convierten en una especie de gran interés para su cultivo en espacios degradados y/o contaminados para la producción de biodiésel mediante técnicas de fitogestión.



**Figura 4. Perfil de sustratos utilizados por los suelos con sin (A) y con nZVI (B).** Resultados obtenidos en el tiempo de siembra (t1) y de cosecha (t2); en suelos control (Cn) y suelos con contaminación mixta (Mn), enmendadas (+) y sin enmendar (-). El tamaño del círculo se basa en el valor promedio de ADS (el área bajo la curva de crecimiento) de todos los grupos de sustratos, siendo éste indicador de la actividad de degradación de cada tipo de sustrato.



**Figura 5. Actividad de degradación de sustratos, ADS.** Resultados obtenidos a tiempo de siembra (t1) y de cosecha (t2). Suelos con (fondo gris) y sin nZVI (fondo blanco); y, con (marcador negro) y sin enmienda (marcador blanco). Las figuras con aristas hacen referencia a tratamientos con planta (P) (triángulo: control; rombo: contaminado), mientras que el círculo (control) y cuadrado (contaminado) se refieren a tratamientos sin planta (S).

Por otro lado, las nZVI no tuvieron ningún efecto significativo en este parámetro (**Figura 5; Tabla AI.9**). Así pues, bajo nuestras condiciones experimentales las nZVI no estimularon las propiedades microbianas, pero tampoco las perjudicaron. Se puede afirmar, en este caso, que las nanopartículas de hierro utilizadas no tienen ningún efecto ecotoxicológico; esto puede ser debido a que los potenciales productos de las mismas al interactuar con el suelo son  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , elementos presentes comúnmente en la tierra (Rodríguez, 2016). Sin embargo, existen otros estudios en los que se obtuvieron diferentes resultados a los aquí presentados en lo que al efecto de las nanopartículas se refiere (Jiang *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2017). De hecho, Jiang *et al.* (2015) concluyó que las nZVI a bajas concentraciones no eran tóxicas, pero que comenzaban a serlo a partir de concentraciones de  $1 \text{ g L}^{-1}$ , concentración similar a la utilizada en este estudio; no obstante, este estudio no se realizó en suelo.

Finalmente, la adición de enmienda por sí sola no aumentó la diversidad. Esto concuerda con los resultados de Riber y su grupo (2014), quienes concluyeron que la enmienda o fertilizante no provocaba cambios en este parámetro. Sin embargo, las plantas crecidas en suelos enmendados, al tener mejor salud y desarrollar mayor biomasa, sí que tuvieron un efecto positivo remarcable en todos los parámetros microbianos estudiados. No ocurrió lo mismo con aquellas crecidas en suelos sin enmendar, cuya salud y desarrollo se vieron más afectados por los contaminantes.

A modo de resumen, en lo que a diversidad se refiere, la tecnología o tecnologías más eficientes sería la fitorremediación asistida con *B. napus*.

## 5. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos, la mejor opción, entre las presentes, para la mejora de la salud del suelo, es una fitorremediación asistida. Sin embargo, la selección de una especie concreta depende del resultado final deseado. De este trabajo se pueden determinar las siguientes conclusiones:

- Una remediación basada en la aplicación de enmiendas de RSU no sería suficiente para disminuir la biodisponibilidad de metales pesados en suelos.
- Los hidrocarburos derivados del diésel parecen ser más rápidamente degradables en suelos con enmienda.
- La mejor tecnología para la fitorremediación de suelos con contaminación mixta parece ser la fitorremediación asistida con enmienda y/o con microorganismos del suelo, con ligeras diferencias:
  - Una fitorremediación asistida con *B. juncea* parece la adecuada si el objetivo final es el aumento de la biomasa y actividad microbianas.
  - Una fitorremediación asistida con *B. napus* es la indicada si el objetivo final es el aumento de la diversidad funcional microbiana del suelo.
- La mejor opción es una fitorremediación asistida con *B. napus*.
- Las nanopartículas a las dosis empleadas no son efectivas para disminuir la disponibilidad de Cu, Zn o Cd, o degradación de diésel.
- Las nanopartículas no parecen poseer ningún tipo de efecto adverso en la salud microbiana del suelo, siendo nulo el efecto toxicológico observado.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Agnello, A.C., Bagard, M., van Hullebusch, E.D., Esposito, G., Huguenot, D. 2015. Comparative bioremediation of heavy metals and petroleum hydrocarbons co-contaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Sci. Total Environ.* 563–564: 693-703.

Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A. 2013. Phytoremediation of heavy metals - Concepts and applications. *Chemosphere.* 91: 869-881.

Barrutia, O., Garbisu, C., Epelde, L., Sampedreo, M.C., Goicolea, M.A., Becerril, J.M. 2011. Plant tolerance to diesel minimizes its impact on soil microbial characteristics during rhizoremediation of diesel-contaminated soils. *Sci. Total Environ.* 409: 4087-4093.

Bartolomé, L., Cortazar, E., Raposo, J.C., Usobiaga, A., Zuloaga, O., Etxebarria, N., Fernández, L.A. 2005. Simultaneous microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, phthalate esters and nonylphenols in sediments. *J. Chromatogr. A.* 1068: 229-236.

Brevik, E.C., Cerdà, A., Mataix-Solera, J., Pereg, L., Quinton, J.N., Six, J., Van Oost, K. 2014. The interdisciplinary nature of SOIL. *SOIL.* 1: 117-129.

Cheema, S.A., Khan, M.I., Shen, C., Tand, X., Farooq, M., Chen, L., Zhang, C., Chen, Y. 2010. Degradation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by single and combined plants cultivation. *J. Hazard. Mater.* 177: 384-389.

Dar, M.I., Khan, F.A., Rehman, F., Masoodi, A., Ansari, A.A., Varshney, D., Naushin, F., Naikoo, M.I. 2015. Roles of Brassicaceae in phytoremediation of metals and metalloids, en: Ansari, A.A., Gill, S.S., Gill, R., Lanza, G.R., Newman, L. (Eds.). *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants.* Ed 1. Capítulo 14, pp. 201-215.

Epelde, L., Becerril, J.M., Hernández-Allica, J., Barrutia, O., Garbisu, C. 2008. Functional diversity as indicator of the recovery of soil health derived from *Thlaspi caerulescens* growth and metal phytoextraction. *Appl. Soil Ecol.* 39: 299-310.

- Epelde, L., Martín-Sánchez, I., González-Oreja, J. A., Anza, M., Gómez-Sagasti, M. T., Garbisu, C. 2012. Impact of sources of environmental degradation on microbial community dynamics in non-polluted and metal-polluted soils. *Sci Total Environ.* 433: 264-272.
- Galende, M.A., Becerril, J.M., Gómez-Sagasti, M.T., Barrutia, O., Garbisu, C., Hernández, A. 2014. Agro-industrial wastes as effective amendments for ecotoxicity reduction and soil health improvement in aided phytostabilization. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21: 10036-10044.
- Gómez-Sagasti, M.T., Alkorta, I., Becerril, J.M., Epelde, L., Anza, M., Garbisu, C. 2012. Microbial Monitoring of the Recovery of Soil Quality During Heavy Metal Phytoremediation. *Water Air Soil Pollut.* 223: 3249-3262.
- Guckert, J.B., Carr, G.J., Johnson, T.D., Hamm, B.G., Davidson, D.H., Kumagai, Y. 1996. Community analysis by Biolog: curve integration for statistical analysis of activated sludge microbial habitats. *J. Microbiol. Methods.* 27: 183-197.
- He, W., Megharaj, M., Naidu, R. 2016. Toxicity of perfluorooctanoic acid towards earthworm and enzymatic activities in soil. *Environ. Monit. Assess.* 188: 424-432.
- Houba, V.J.G., Temminghoff, E.J.M., Gaikhorst, G.A., van Vark, W. 2000. Soil analysis procedures using 0.01 M calcium chloride as extraction reagent. *Commun. Soil Sci. Plan.* 31: 1299-1396.
- Huang, X.F., Chaparro, J.M., Reardon, K.F., Zhang, R., Shen, Q., Vivanco J.M. 2014. Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. *Botany.* 92: 267-275.
- Ihobe, Sociedad Pública de Gestión Ambiental, Departamento de Medio Ambiente y Política Territorial, Gobierno Vasco. 2015. RESUMEN EJECUTIVO PLAN DE PREVENCIÓN Y GESTIÓN DE RESIDUOS DE LA CAPV 2020.
- Jiang, C., Xu, X., Megharaj, M., Naidu, R., Chen, Z. 2015. Inhibition or promotion of biodegradation of nitrate by *Paracoccus* sp. in the presence of nanoscale zero-valent iron. *Sci. Total Environ.* 530-531: 241-246.

Kaplan, H., Ratering, S., Hanauer, T., Felix-Henningsen, P., Schnell, S. 2013. Impact of trace metal contamination and in situ remediation on microbial diversity and respiratory activity of heavily polluted Kastanozems. *Biol. Fertil. Soils*. 50: 735-744.

Kästner, M., Miltner, A. 2016. Application of compost for effective bioremediation of organic contaminants and pollutants in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100: 3433-3449.

Klimek, B., Sitarz, A., Choczyński, M., Niklińska, M. 2016. The Effects of Heavy Metals and Total Petroleum Hydrocarbons on Soil Bacterial Activity and Functional Diversity in the Upper Silesia Industrial Region (Poland). *Water Air Soil Pollut.* 227: 265-274.

Lefevre, E., Bossa, N., Wiesner, M.R., Gunsch, C.K. 2016. A review of the environmental implications of in situ remediation by nanoscale zero valent iron (nZVI): Behavior, transport and impacts on microbial communities. *Sci. Total Environ.* 565: 889-901.

Menéndez, A.V., Osuna, L.R., Mesa, V., Gallego, J.L.R., Sastre, H., Peláez, A.I. 2016. Aerobic degradation of lindane in the presence of bacteria and zero valent iron nanoparticles. *Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms*. 1: 7-12.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2015. El suelo es un recurso no renovable, su conservación es esencial para la seguridad alimentaria y nuestro futuro sostenible.

Riber, L., Poulsen, P.H., Al-Soud, W.A., Hansen, L.B., Bergmark, L., Brejnrod, A., Norman, A., Hansen, L.H., Magid, J., Sørensen, S.J. 2014. Exploring the immediate and long-term impact on bacterial communities in soil amended with animal and urban organic waste fertilizers using pyrosequencing and screening for horizontal transfer of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 90: 206-224.

Riveroll-Larios, J., Escalante-Espinosa, E., Fócil-Monterrubbio, R., Díaz-Ramírez, I.J. 2015. Biological Activity Assessment in Mexican Tropical Soils with Different Hydrocarbon Contamination Histories. *Water Air Soil Pollut.* 226: 353-368.

Rodrigues Gonçalves, J. 2016. The Soil and Groundwater Remediation with Zero Valent Iron Nanoparticles. *Procedia Eng.* 143: 1268-1275.

Rutgers, M., Wouterse, M., Drost, S.M., Breure, A.M., Mulder, C., Stone, D., Creamer, R.E., Winding, A., Bloem, J. 2016. Monitoring soil bacteria with community-level physiological profiles using Biolog<sup>TM</sup> ECO-plates in the Netherlands and Europe. *Appl. Soil Ecol.* 97: 23-35.

Szczygłowska, M., Piekarska, A., Konieczka, P., Namieśnik, J. 2011. Use of Brassica Plants in the Phytoremediation and Biofumigation Processes. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 7760-7771.

Uddin, M.K. 2017. A review on the adsorption of heavy metals by clay minerals, with special focus on the past decade. *Chem. Eng. J.* 308: 438-462.

US-EPA Method 3051A. US Environmental Protection Agency. 2007. "Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils," in *Test Methods for Evaluating Solid Waste*. Washington, DC, USA, 3rd edition.

Venegas, A., Rigol, A., Vidal, M. 2016. Changes in heavy metal extractability from contaminated soils remediated with organic waste or biochar. *Geoderma.* 279: 132-140.

Xie, Y., Dong, H., Zeng, G., Tang, L., Jiang, Z., Zhang, C. 2017. The interactions between nanoscale zero-valent iron and microbes in the subsurface environment: A review. *J. Hazard. Mater.* 321: 390-407.



# **ANEXO I**

Tratamiento Estadístico



**Tabla AI. 1. Análisis estadístico para los parámetros del tiempo siembra (t1).** Comparación de la Respiración Basal (RB), Respiración Inducida (RI), Shannon y la Actividad de Degradación de Sustrato (ADS). Códigos: -/+ : sin/con enmienda; C/M: Control/Contaminado; Ø/n: sin/con nZVI.

	-C	-Cn	-M	-Mn	+C	+Cn	+M	+Mn	Test
<b>RB</b>	d	d	c	b, c, d	a, b	b, c	a	a, b, c, d	(2)
<b>RI</b>	c	a, b, c	a, b, c	b	a, b	a, b, c	a, b, c	a	(2)
<b>Shannon</b>	a	a	a	a	a	a	a	a	(1)
<b>ADS</b>	a	a	a	a	a	a	a	a	(1)

(1) Normalidad ( $P > 0,05$ ) & Homogeneidad ( $P > 0,05$ ) = ANOVA Duncan test

(2) Normalidad ( $P > 0,05$ ) & Homogeneidad ( $P < 0,05$ ) = ANOVA Games-Hawell test

**Tabla AI. 2. Análisis estadístico para los parámetros del tiempo siembra (t1) en comparación con los del tiempo cosecha (t2).** Comparación de la Respiración Basal (RB), Respiración Inducida (RI), Shannon y la Actividad de Degradación de Sustrato (ADS) mediante el análisis T-student para muestras relacionadas ( $P > 0,05$ ). Códigos: -/+ : sin/con enmienda; C/M: Control/Contaminado; Ø/n: sin/con nZVI.

	RB		RI		Shannon		ADS	
	Sig		Sig		Sig		Sig	
<b>-C</b>	0,50	=	0,08	=	0,92	=	0,50	=
<b>-Cn</b>	0,90	=	0,48	=	0,55	=	0,87	=
<b>-M</b>	0,81	=	0,01	≠	0,73	=	0,10	=
<b>-Mn</b>	0,01	≠	0,05	≠	0,42	=	0,47	=
<b>+C</b>	0,73	=	0,10	=	0,83	=	0,50	=
<b>+Cn</b>	0,21	=	0,06	=	0,49	=	0,64	=
<b>+M</b>	0,09	=	0,79	=	0,82	=	0,16	=
<b>+Mn</b>	0,24	=	0,46	=	0,55	=	0,95	=

**Tabla AI. 3. Análisis estadístico de la respiración basal del tiempo cosecha (t2).** Comparación entre los diferentes tratamientos en suelos sin fitorremediar (S) y con cada una de las plantas utilizadas. Códigos: -/+ : sin/con enmienda; C/M: Control/Contaminado; Ø/n: sin/con nZVI.

	-C	-Cn	-M	-Mn	+C	+Cn	+M	+Mn	Test
<b>S</b>	d	d	c	b, c, d	a, b	b, c	a	a, b, c, d	(1)
<b>B. napus</b>	e	e	a, b, c	b	a, b	a, b, c	a, b, c	a	(2)
<b>B. carinata</b>	d	d	a	a	a	a	a	a	(1)
<b>B. juncea</b>	d	d	a	a	a	a	a	a	(1)

(1) Normalidad ( $P > 0,05$ ) & Homogeneidad ( $P > 0,05$ ) = ANOVA Duncan test

(2) Normalidad ( $P > 0,05$ ) & Homogeneidad ( $P < 0,05$ ) = ANOVA Games-Hawell test

**Tabla AI. 4. Análisis estadístico de la respiración basal del tiempo cosecha (t2).** Comparación entre el efecto de las diferentes especies o la falta de planta en cada uno de los tratamientos. Códigos: -/+ : sin/con enmienda; C/M: Control/Contaminado; Ø/n: sin/con nZVI.

	Sin planta	<i>B. napus</i>	<i>B. carinata</i>	<i>B. juncea</i>	Test
<b>-C</b>	c	b, c	b	a	(1)
<b>-Cn</b>	b	a, b	a	a	(1)
<b>-M</b>	a	a	a	a	(1)
<b>-Mn</b>	a	a	a	a	(1)
<b>+C</b>	b	b	a, b	a	(1)
<b>+Cn</b>	b	b	a, b	a	(1)
<b>+M</b>	b	a	a	a	(1)
<b>+Mn</b>	b	a	a	a	(1)

(1) Normalidad ( $P > 0,05$ ) & Homogeneidad ( $P > 0,05$ ) = ANOVA Duncan test

**Tabla AI. 5. Análisis estadístico de la respiración inducida del tiempo cosecha (t2).** Comparación entre los diferentes tratamientos en suelos sin fitorremediar (S) y con cada una de las plantas utilizadas. Códigos: -/+ : sin/con enmienda; C/M: Control/Contaminado; Ø/n: sin/con nZVI.

	-C	-Cn	-M	-Mn	+C	+Cn	+M	+Mn	Test
<b>S</b>	b	b	b	b	a	a	b	a	(1)
<b>B. napus</b>	d	d	d	c, d	a, b, c	a	b, c, d	a, b	(1)
<b>B. carinata</b>	a, b	a, b	c	b, c	a	a	a	a, b	(1)
<b>B. juncea</b>	c, d	c, d	e	d	b, c	a	c, d	a, b	(1)

(1) Normalidad ( $P > 0,05$ ) & Homogeneidad ( $P > 0,05$ ) = ANOVA Duncan test

**Tabla AI. 6. Análisis estadístico de la respiración inducida del tiempo cosecha (t2).** Comparación entre el efecto de las diferentes especies o la falta de planta en cada uno de los tratamientos. Códigos: -/+ : sin/con enmienda; C/M: Control/Contaminado; Ø/n: sin/con nZVI.

	Sin planta	<i>B. napus</i>	<i>B. carinata</i>	<i>B. juncea</i>	Test
<b>-C</b>	a	a	a	a	(1)
<b>-Cn</b>	a	a	a	a	(1)
<b>-M</b>	a	a	a	a	(1)
<b>-Mn</b>	a	a	a	a	(1)
<b>+C</b>	a	a	a	a	(1)
<b>+Cn</b>	b	b	b	a	(1)
<b>+M</b>	a	a	a	a	(1)
<b>+Mn</b>	a	b	a	a	(1)

(1) Normalidad ( $P > 0,05$ ) & Homogeneidad ( $P > 0,05$ ) = ANOVA Duncan test

**Tabla Al. 7. Análisis estadístico de Shannon del tiempo cosecha (t2).** Comparación entre los diferentes tratamientos en suelos sin fitorremediar (S) y con cada una de las plantas utilizadas. Códigos: -/+ : sin/con enmienda; C/M: Control/Contaminado; Ø/n: sin/con nZVI.

	-C	-Cn	-M	-Mn	+C	+Cn	+M	+Mn	Test
<b>S</b>	a	a	a	a	a	a	a	a	(1)
<b>B. napus</b>	b	a, b	b	a, b	a	a	a	a	(2)
<b>B. carinata</b>	a	a	a	a	a	a	a	a	(1)
<b>B. juncea</b>	c, d	b, c, d	d	d	a, b	a	b, c, d	a, b, c	(1)

(1) Normalidad ( $P > 0,05$ ) & Homogeneidad ( $P > 0,05$ ) = ANOVA Duncan test

(2) Normalidad ( $P > 0,05$ ) & Homogeneidad ( $P < 0,05$ ) = ANOVA Games-Hawell test

**Tabla Al. 8. Análisis estadístico de la Shannon del tiempo cosecha (t2).** Comparación entre el efecto de las diferentes especies o la falta de planta en cada uno de los tratamientos. Códigos: -/+ : sin/con enmienda; C/M: Control/Contaminado; Ø/n: sin/con nZVI.

	Sin planta	<i>B. napus</i>	<i>B. carinata</i>	<i>B. juncea</i>	Test
<b>-C</b>	a	a	a	a	(1)
<b>-Cn</b>	a	a	a	a	(1)
<b>-M</b>	a	a	a	a	(1)
<b>-Mn</b>	a	a	a	a	(3)
<b>+C</b>	b	a	a, b	a, b	(1)
<b>+Cn</b>	a	a	a	a	(1)
<b>+M</b>	b	a	a	b	(1)
<b>+Mn</b>	b	a	b	a, b	(2)

(1) Normalidad ( $P > 0,05$ ) & Homogeneidad ( $P > 0,05$ ) = ANOVA Duncan test

(2) Normalidad ( $P > 0,05$ ) & Homogeneidad ( $P < 0,05$ ) = ANOVA Games-Hawell test

(3) Normalidad ( $P < 0,05$ ) = No paramétricos (Kruskal – Wallis)

**Tabla AI. 9. Análisis estadístico de la Actividad de Degradación de Sustrato (ADS) del tiempo cosecha (t2).** Comparación entre los diferentes tratamientos en suelos sin fitorremediar (S) y con cada una de las plantas utilizadas. Códigos: -/+ : sin/con enmienda; C/M: Control/Contaminado; Ø/n: sin/con nZVI.

	-C	-Cn	-M	-Mn	+C	+Cn	+M	+Mn	Test
<b>S</b>	a	a	a	a	a	a	a	a	(1)
<b>B. napus</b>	c	c, d	d	d	b	a, b	a, b	a	(1)
<b>B. carinata</b>	b	b	b	b	a	a, b	a	a, b	(1)
<b>B. juncea</b>	b	b	b	b	a, b	a	a, b	a, b	(2)

(1) Normalidad ( $P > 0,05$ ) & Homogeneidad ( $P > 0,05$ ) = ANOVA Duncan test

(2) Normalidad ( $P > 0,05$ ) & Homogeneidad ( $P < 0,05$ ) = ANOVA Games-Hawell test

**Tabla AI. 10. Análisis estadístico de la Actividad de Degradación de Sustrato (ADS) del tiempo cosecha (t2).** Comparación entre el efecto de las diferentes especies o la falta de planta en cada uno de los tratamientos. Códigos: -/+ : sin/con enmienda; C/M: Control/Contaminado; Ø/n: sin/con nZVI.

	Sin planta	<i>B. napus</i>	<i>B. carinata</i>	<i>B. juncea</i>	Test
<b>-C</b>	a	a	a	a	(1)
<b>-Cn</b>	a	a	a	a	(1)
<b>-M</b>	a	a	a	a	(1)
<b>-Mn</b>	a	a	a	a	(1)
<b>+C</b>	b	a	a	a, b	(2)
<b>+Cn</b>	b	a	a	a	(1)
<b>+M</b>	b	a	a	a, b	(1)
<b>+Mn</b>	b	a	b	b	(1)

(1) Normalidad ( $P > 0,05$ ) & Homogeneidad ( $P > 0,05$ ) = ANOVA Duncan test

(2) Normalidad ( $P > 0,05$ ) & Homogeneidad ( $P < 0,05$ ) = ANOVA Games-Hawell test