

**Germinación y bioestimulación en *Acacia farnesiana* (L.) Willd y *Ebenopsis ebano* (Berl.) Barneby para la remoción de As, Cd y Zn de lodos residuales por extracción de gas *shale* en Tamaulipas**

**Germination and biostimulation in *Acacia farnesiana* (L.) Willd y *Ebenopsis ebano* (Berl.) Barneby for the removal of As, Cd and Zn from sewage sludge by extraction of shale gas in Tamaulipas**

Zaida C. Sánchez-Puente<sup>1</sup>

Julio César Chacón-Hernández<sup>2</sup>

Alejandro Alarcón<sup>3</sup>

Mario Rocandio-Rodríguez<sup>2</sup>

Sandra Grisell Mora-Ravelo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Tecnológico Nacional de México en Ciudad Victoria, Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria, Tamaulipas

<sup>2</sup> Universidad Autónoma de Tamaulipas, Instituto de Ecología Aplicada, Ciudad Victoria, Tamaulipas

<sup>3</sup> Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos, Posgrado de Edafología

Autora para correspondencia: Sandra Grisell Mora-Ravelo, E-mail:

sgmora@docentes.uat.edu.mx

## **Resumen**

**Introducción:** En la actualidad, existe una creciente demanda de hidrocarburos, lo que ha provocado el empleo de tecnologías no convencionales como la fracturación hidráulica. Sin embargo, esta técnica ocasiona daños ambientales a los ecosistemas por la generación de lodos residuales, como es el caso del matorral espinoso tamaulipeco que se encuentra dentro de la cuenca de burgos, zona de relevancia económica para la explotación de gas convencional. El objetivo del estudio fue evaluar la germinación de *Acacia farnesiana* (L.) Willd y *Ebenopsis*

*ebano* (Berl.) Barneby y su uso potencial con bioestimulación, en la remoción de As, Cd y Zn en lodos residuales provenientes de la extracción de gas shale.

**Método:** Se colectaron semillas de *Acacia farnesiana* (L.) Willd y *Ebenopsis ebano* (Berl.) Barneby en el ejido El Zaus, municipio de Hidalgo, Tamaulipas. Se evaluó el índice de germinación (IG) de acuerdo con Zucconi. Los tratamientos fueron 23, considerando los sustratos (dos tipos de lodo, suelo y una mezcla de ambos sustratos), las dos especies de plántulas (*Acacia* y *Ebenopsis*) y la bioestimulación donde se utilizó una solución de urea al 46 %. Se utilizaron macetas de tres kilogramos como unidades experimentales, donde se sembraron tres plántulas con tres repeticiones por tratamiento. Se realizó un muestreo final de cada tratamiento para las determinaciones correspondientes de As, Cd, Zn, P y K, las cuales se realizaron por extracción de (DTPA), y posteriormente se llevaron a espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma (ICP-OES Varian modelo 725-ES, Agilent Mulgrave, Australia). El Nitrógeno total, en plántulas y sustratos, se realizó por el método micro Kjeldahl, y la materia orgánica (MO) por Walkely Black.

**Resultados:** Se observaron diferencias en IG ( $P = 0.02374$ ). Los resultados indican que las características estructurales (tamaño) y fisiológicas (viabilidad del embrión) de las semillas están relacionadas con la capacidad de germinación de estas especies en sustratos contaminados. Se encontraron diferencias significativas en la concentración de As, Cd, y Zn, a través del tratamiento ( $P < 0.0001$ ). La acumulación de As, Cd y Zn, fue determinada por la estructura de la planta (raíz > tallo > hoja).

**Conclusión:** El índice de germinación de *Acacia farnesiana* (L.) Willd y *Ebenopsis ebano* (Berl.) Barneby, en sustratos acuosos de lodos residuales provenientes de la extracción de gas shale, se sustenta en las características estructurales y fisiológicas de cada especie. La remoción de As, Cd y Zn, estuvo influenciada por la especie, el sustrato, la bioestimulación con la urea y la presencia de MO que confiere el efecto tapón que controló la alcalinidad de los sustratos y, por ende, la movilidad de los metales.

**Palabras clave:** sustratos; semillas; matorral espinoso; metales pesados; bioestimulación; lodos residuales; gas shale; germinación; hidrocarburos

**Abstract**

**Introduction:** There is currently a growing demand for hydrocarbons, which has led to the use of non-dynamic technologies, such as hydraulic fracturing. However, this technique causes environmental damages to ecosystems due to the generation of sewage sludge such as the thorny Tamaulipas scrubland that is located within the Burgos basin, an area of economic relevance for conventional gas exploitation. The objective of the study was to evaluate the germination of *Acacia farnesiana* (L.) Willd and *Ebenopsis ebano* (Berl.) Barneby and its potential use with biostimulation in the removal of As, Cd and Zn in sewage sludge from the extraction of shale gas.

**Method:** Seeds of *Acacia farnesiana* (L.) Willd and *Ebenopsis ebano* (Berl.) Barneby were collected in the ejido El Zaus, municipality of Hidalgo, Tamaulipas. The germination index (GI) was evaluated according to Zucconi. Twenty-three treatments were set by considering the substrates (two types of sludge, soil and a mixture of both substrates), the two species of seedlings (*Acacia* and *Ebenopsis*), and the biostimulation with a 46% urea solution. Pots of 3 kg were used as experimental units, in where three seedlings were planted with three replicates per treatment. A final sampling of each treatment was performed for the corresponding determinations of As, Cd, Zn, P and K, which were carried out by extraction of DTPA, and subsequently carried out by plasma induction atomic emission spectroscopy (ICP-OES Varian model 725-ES, Agilent Mulgrave, Australia). The total nitrogen (Nt) in seedlings and substrates, was carried out using the micro Kjeldahl method, and organic matter (OM) content was estimated by Walkely Black method.

**Results:** Differences in IG were observed ( $P = 0.02374$ ). Results indicated that the structural (size) and physiological (embryo viability) characteristics of the seeds are related to the germination capacity of both species under contaminated substrates. Significant differences were found in the concentrations of As, Cd, and Zn, through treatment ( $P < 0.0001$ ). The accumulation of As, Cd and Zn, was determined by the structure of the plant (root > stem > leaf).

**Conclusion:** Germination index of *Acacia farnesiana* (L.) Willd and *Ebenopsis ebano* (Berl.) Barneby in aqueous substrates of residual sludge is based on structural and physiological characteristics of each species. Removal of As, Cd and Zn, was influenced by the species, the substrate, the urea biostimulation, and the presence of OM, which confer the plug effect that controls the alkalinity of the substrates and therefore, the mobility of the metals.

**Keywords:** substrates; seeds; thorn scrub; bio stimulation; residual sludge; gas shale; germination; hydrocarbons

Recibido en: 23-09-2019

Aceptado en: 24-02-2020

## Introducción

México es un país cuya economía depende en gran parte del petróleo; tiene varias zonas de explotación petrolera. Sin embargo, a partir de la reforma energética se ha despertado el interés por la extracción de hidrocarburos por medio de tecnologías no convencionales como la fracturación hidráulica, para extraer el gas shale. El gas shale es un gas natural que se encuentra encerrado en rocas sedimentarias llamadas *lutitas*, que se encuentran a grandes profundidades; además, son altamente impermeables, lo que hace casi imposible su extracción (SENER, 2012, p. 20).

En junio de 2013, se reportó que México ocupa el sexto lugar a nivel mundial con 545 billones de pies cúbicos (BPC) de gas shale, técnicamente recuperables (EIA, 2013, p. 27). Con el fin de asegurar la oferta de hidrocarburos y autosuficiencia de gas en el país, aunado al gran potencial prospectivo de energía no convencional en la región, se han realizado trabajos exploratorios con el fin de evaluar y desarrollar los recursos de este tipo de gas, identificando provincias geológicas potenciales para su desarrollo (Euán, 2016, p. 35).

Entre ellas, se encuentra la cuenca de Burgos, que abarca los estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, donde existe vegetación predominante de Matorral Espinoso Tamaulipeco y donde se pueden encontrar una gran variedad de especies nativas como: *Acacia farnesiana* (L.) Willd “Huizache”, y *Ebenopsis ebano* (Berl.) “Ébano” (Jiménez *et al.*, 2009, p. 5; García *et al.*, 2007, p. 99).

Esta explotación de gas shale, genera residuos pasivos, como los lodos que contienen contaminantes orgánicos e inorgánicos entre los que se encuentran los metales pesados. Estos

lodos suelen ser almacenados en depósitos de confinamiento permeables y al aire libre. Sin embargo, este resguardo no garantiza la ausencia de filtraciones de los lixiviados, y la consecuente contaminación de agua y suelo, afectando el entorno (Harkness *et al.*, 2017, p. 302).

La tendencia mundial está dirigida a reducir la contaminación que se genera, aplicando la efectividad de las tecnologías de biorremediación. La remoción eficiente de algunos compuestos orgánicos en suelos contaminados con hidrocarburos, mediante bioestimulación con la adición de urea y residuos orgánicos, ha sido reportada por distintos autores (García *et al.*, 2011, p. 195; Ikhajiagbe *et al.*, 2011, p. 107; Agamuthu *et al.*, 2013, p. 694).

En la actualidad existen diferentes técnicas utilizadas para la eliminación de metales pesados en suelos. Una de ellas es la fitorremediación, que requiere menor costo e implica tecnología verde, pues utiliza sólo plantas (Pilon-Smits, 2005, p. 15). La fitorremediación depende del mecanismo de absorción iónica de cada especie, según sus características genéticas, fisiológicas, anatómicas y morfológicas (Bernal *et al.*, 2007, p. 1). Uno de los procesos que lleva a cabo este procedimiento es la fitoextracción, que consiste en la capacidad de acumular metales del suelo y transportarlos a las diferentes partes de la planta (Yildirim y Sasmaz, 2016, p. 228). *Acacia farnesiana* (L.) Will es una planta cuya tasa de fitoextracción de plomo (Pb) tiene diferencias significativas en raíz, tallo y hojas (Landeros-Márquez *et al.*, 2011, p. 11). Para el caso de *Ebenopsis ebano* (Berl.) Barneby, se tiene nula información sobre la tasa de fitoextracción que pueda tener con algún metal en particular.

## **Método**

### **Área de estudio**

Se recolectaron vainas de árboles maduros de *Acacia farnesiana* y *Ebenopsis ebano* en el ejido El Zaus, municipio de Hidalgo, Tamaulipas, México (**Fig. 1**). Éstas fueron trasladadas al Instituto de Ecología Aplicada (IEA) de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, para obtener sus semillas.



**Fig. 1.** Ejido El Zaus, municipio de Hidalgo, Tamaulipas, México.

**Fig. 1.** Ejido El Zaus, municipality of Hidalgo, Tamaulipas, Mexico.

## **Material biológico**

Las semillas de mejor tamaño y maduración se seleccionaron y almacenaron en frascos herméticamente sellados a temperatura ambiente, en un sitio seco y oscuro para su posterior uso. Para la germinación de las mismas, fue necesario aplicar escarificación mecánica en el área del micrópilo de manera individual, evitando dañar el embrión.

## **Establecimiento del experimento en laboratorio**

Después de la escarificación, las semillas se lavaron con agua con cloro al 5% durante 5 minutos, esto con el fin de desinfectarlas. Se utilizó el índice de germinación de *Zucconi* (Varnero *et al.*, 2007, p. 28); se añadieron 13.5 mL de agua desionizada por 1 g de muestra seca de lodo, (se utilizaron 2 muestras de lodos con diferentes características fisicoquímicas), agitando la mezcla durante 30 minutos; después se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Al finalizar, se agregó sobre el papel filtro, que estaba adentro de las cajas Petri.

En cajas Petri con papel filtro se colocaron 10 semillas por separado de *Acacia farnesiana* y *Ebenopsis ebano* en 15 y 20 mL de extracto acuoso del lodo residual, respectivamente. Para cada especie se realizaron 5 repeticiones; todas las repeticiones fueron envueltas en papel y posteriormente, se incubaron a 28°C.

Previamente se realizó un análisis de los sustratos por espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma (ICP-OES) para saber las concentraciones iniciales de As, Cd y Zn.

## **Establecimiento del experimento en invernadero**

Las semillas germinadas de ambas especies se trasplantaron en un semillero de unicel de 60 cavidades; se colocaron diez semillas con tres repeticiones por tratamiento (**Tabla 1**), y cada tres días durante dos semanas se registró el crecimiento de las plántulas. Cuando las plántulas alcanzaron una altura aproximada de 3 cm, se pasaron a macetas de 3 kg utilizadas como unidades experimentales, previamente preparadas con 900 g de sustrato (lodo, suelo y una mezcla de ambos sustratos), acomodadas de manera aleatoria dentro del invernadero del IEA. El suelo se trajo de dos sitios del complejo Santa Anita, en el municipio de Camargo, Tamaulipas. Se colocaron tres plántulas por maceta con tres repeticiones por cada tratamiento. A los tratamientos (T) T1- T4, T7-T10 y T13-T16, se les adicionó 2.03 g de urea para la bioestimulación; mientras que a los T13 y 14 se les adicionaron 33.30 mg de Cd; y a los T15 y T16 20 mg de As (con la

finalidad de que tuvieran la misma proporción que los lodos). Durante tres meses, cada semana se midió con una regla la altura de cada plántula.

**Tabla 1.** Lista de tratamientos.

**Table 1.** List of treatments.

Tratamientos	Descripción
<b>T1</b>	T2 + SP1 + U
<b>T2</b>	T2 + SP2 + U
<b>T3</b>	T2 + S + SP1 + U
<b>T4</b>	T2 + S + SP2 + U
<b>T5</b>	T2
<b>T6</b>	T2 + S
<b>T7</b>	T3 + SP1 + U
<b>T8</b>	T3 + SP2 + U
<b>T9</b>	T3 + S + SP1 + U
<b>T10</b>	T3 + S + SP2 + U
<b>T11</b>	T3
<b>T12</b>	T3 + S
<b>T13</b>	S + SP1 + Cd + U
<b>T14</b>	S + SP2 + Cd + U
<b>T15</b>	S + SP1 + As + U
<b>T16</b>	S + SP2 + As + U
<b>T17</b>	S + SP1
<b>T18</b>	S + SP2
<b>T19</b>	S
<b>T20</b>	T2 + SP1
<b>T21</b>	T2 + SP2
<b>T22</b>	T3 + SP1
<b>T23</b>	T3 + SP2

**Donde:** T= Tipo de lodo; S = Suelo; U = Urea; SP 1 = Huizache; SP 2 = Ébano.

**Where:** T = Sludge type; S = Soil; U = Urea; SP 1 = Huizache; SP 2 = Ebony.



## **Variables de estudio**

Se realizó un muestreo final de los sustratos y plántulas de cada tratamiento para las determinaciones correspondiente a As, Cd, Zn y Nt en plántulas, mientras que para los sustratos se realizaron los análisis de As, Cd, Zn, materia orgánica (MO), Nt, P, K, pH y C.E. Todas estas determinaciones se llevaron a cabo en el laboratorio Salvador Alcalde Blanco de Nutrición Vegetal del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Las muestras de sustrato fueron secadas a temperatura ambiente, maceradas y tamizadas; posteriormente, se pesaron 10 g de muestra y se llevaron a extracción con 20 – 30 mL de ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) 0.005 M, con agitación constante por 2 h, y se filtraron en papel Watman N° 42. El filtrado se llevó a espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma (ICP-OES Varian modelo 725-ES, Agilent Mulgrave, Australia).

Para el análisis de metales pesados en *Acacia farnesiana* y *Ebenopsis ebano*, las muestras de las plántulas se fraccionaron en raíz, y parte aérea (tallo y hojas); posteriormente, fueron secadas a temperatura ambiente por 48 h y se pesaron y molieron. La extracción de los metales se realizó con 2 mL de la mezcla de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y HClO<sub>4</sub> en relación 2:1 y 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en 0.25 g de cada muestra. Los extractos obtenidos se sometieron a espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma para cuantificar las concentraciones de As, Cd y Zn.

Para los análisis de MO, C.E., pH y Nt se utilizaron: el método de Walkely Black para MO, el conductímetro para la C.E., el potenciómetro para el pH, y el método micro Kjeldahl para Nt en sustratos y tejido vegetal.

## **Análisis estadístico**

El índice de germinación (IG), se determinó mediante la fórmula  $IG (\%) = \text{porcentaje de germinación relativa de las semillas (PRSG)} \times \text{crecimiento relativo de las raíces (CRRG)}$  (Varnero *et al.*, 2007, p. 28).

Para analizar el IG se utilizaron las pruebas no paramétricas de Wilcoxon y Kruskal-Wallis (Wheater y Cook, 2005; Pohlert, 2014, p. 22), bajo la hipótesis nula de igualdad de medianas. Las diferencias significativas se analizaron con las comparaciones múltiples de rangos de Nemenyi (Wheater y Cook, 2005; Pohlert 2014, p. 22). El nivel de significancia fue  $P \leq 0.05$  y se utilizó el software R Core Team (2016).

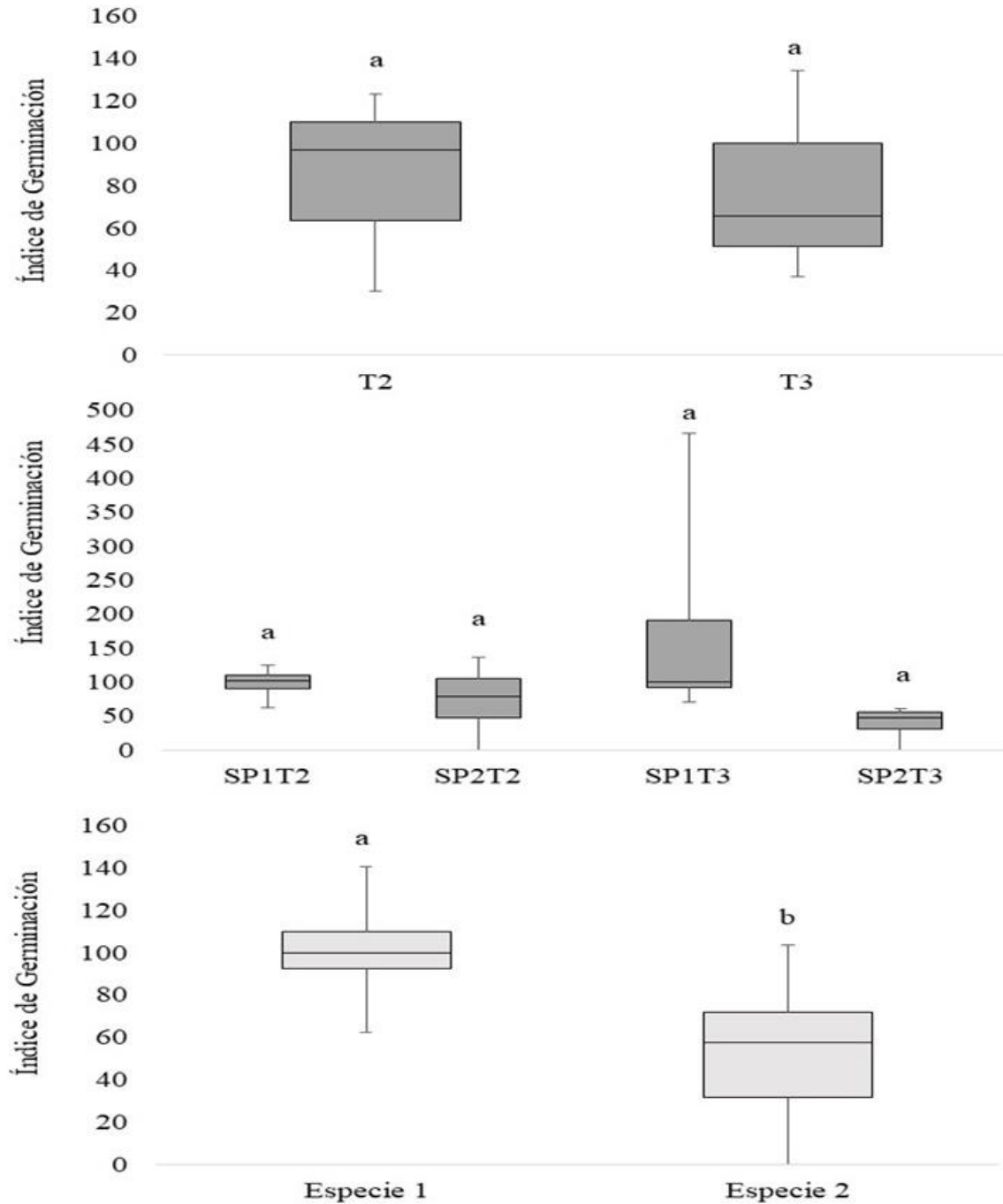
Se realizaron tres análisis multivariados de varianza (MANOVA). El primero fue para las concentraciones de los metales contra los tratamientos en el suelo; el segundo, para cantidades de MO %, C.E., pH y Nt en suelo; y el tercero para las concentraciones de los metales contra los tratamientos en la planta. Después, se analizó por medio de un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) para comparación de Tukey y para encontrar las diferencias entre los tratamientos. Además, se determinó la asociación entre las variables (As, Cd y Zn) en suelo y planta, usando el coeficiente de correlación de Pearson, y posteriormente se realizó un análisis de componentes principales (ACP), para discriminar entre los tratamientos sobre la base de las concentraciones de metales As, Cd y Zn. En todos los casos los análisis estadísticos fueron realizados con el software R Core.

## Resultados

El número de semillas y el IG se vieron favorecidos debido al tratamiento pre-germinativo por escarificación mecánica en semillas de testa dura (Rivas *et al.*, 2005, p. 441) que obtuvieron hasta 100% de germinación con semillas de este tipo, lo cual coincide con lo obtenido en el número de semillas germinadas para *Acacia farnesiana* y *Ebenopsis ebano* (100% y 80% de germinación, respectivamente).

El huizache mostró mayor longitud de raíz y mayor número de semillas germinadas en comparación con el ébano, posiblemente por la diferencia en el tamaño de semillas. Las semillas

de *Acacia farnesiana* son más pequeñas que las de *Ebenopsis ebano* y por tanto absorben mayor cantidad de agua, lo que permite que la semilla emerja más rápido (Larcher, 2003, p. 533). Los factores como temperatura, humedad y condiciones de luz que son determinantes para la germinación de cualquier semilla (Larcher, 2003, p. 533), no influyeron en la germinación de *Acacia farnesiana* y *Ebenopsis ebano*. La temperatura se asocia con el proceso de germinación por afectar el porcentaje de germinación, la tasa de germinación y las reacciones enzimáticas (Probert, 2010, p. 261; Gariola *et al.*, 2011, p. 66); las semillas de ambas especies estuvieron a la misma temperatura. No se observaron diferencias significativas con respecto a los tratamientos ( $W = 39.5$ ,  $P = 0.4616$ ); y con respecto al efecto generado por la combinación entre las especies y los tratamientos (SP1T2, SP1T3, SP2T2 y SP2T3) no se encontraron diferencias ( $X^2 = 7.4392$ ,  $P = 0.05914$ ). Mientras que por especie se observaron diferencias en los índices de germinación ( $W = 54$ ,  $P = 0.02374$ ) (**Fig. 2**).



**Fig. 2.** Porcentaje de germinación de *Acacia farnesiana* “Huizache” (Especie 1) y *Ebenopsis ebano* “Ébano” (Especie 2).

Donde: **SP1**= Huizache; **SP2** = Ébano; **T2** = Lodo 1 (Sitio 1); y **T3** = Lodo 2 (Sitio 2).

**Fig. 2.** Germination percentage of *Acacia farnesiana* "Huizache" (Species 1), and *Ebenopsis ebano* "Ébano" (Species 2).

Where: **SP1** = Huizache; **SP2** = Ebony; **T2** = Sludge 1 (Site 1); and **T3** = Sludge 2 (Site 2).

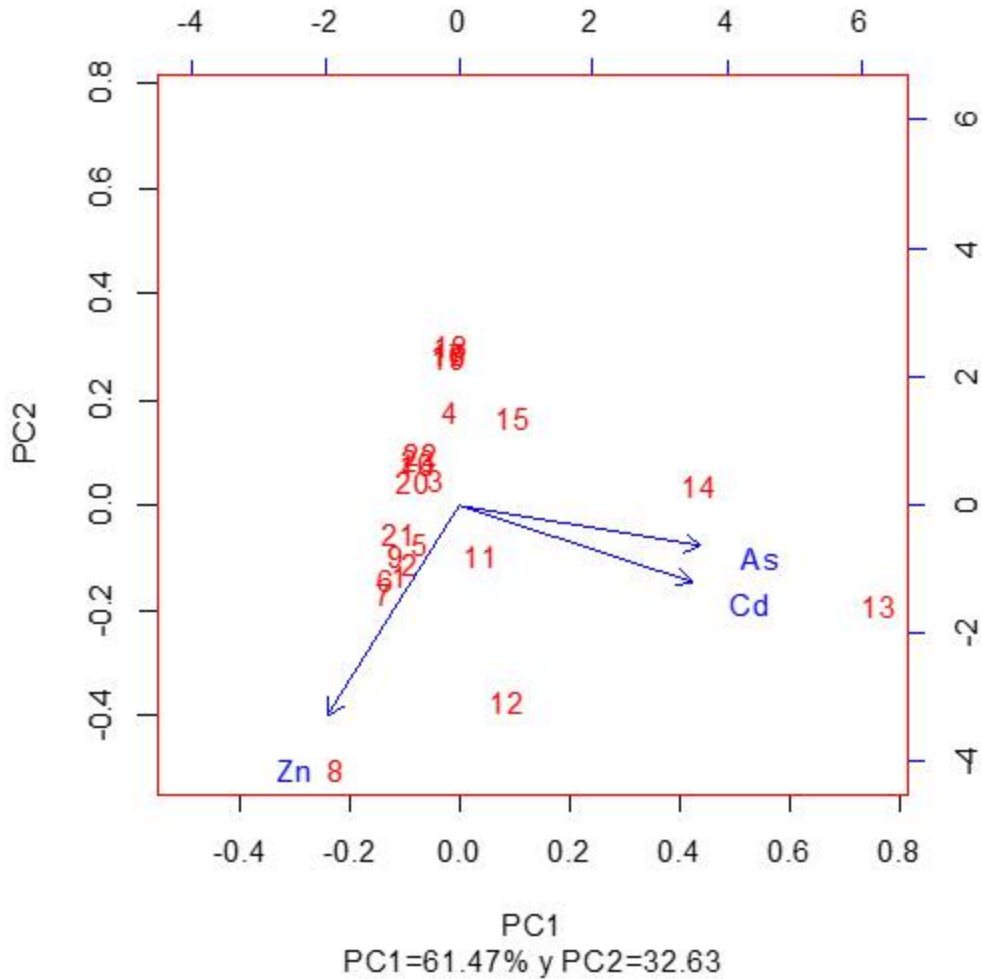
Estas diferencias no se deben a que existió una interdependencia entre los factores ambientales, ya que se trabajó bajo condiciones controladas. La influencia relativa en la germinación estuvo determinada por la edad de la semilla y la composición genética de la misma. Así mismo, el índice de germinación que se obtuvo entre ambas especies se debió a que el sustrato acuoso en el que se pusieron a germinar contenía alguna sustancia inhibidora que influyó más en una especie que en otra.

Emino y Warman (2004, p. 342), reportan que, al utilizar como sustrato lodos residuales de origen urbano, el índice de germinación disminuye por la presencia de Zn. En este estudio el sustrato acuoso utilizado contiene Zn. La morfología de las semillas fue diferente en tamaño y forma, lo que influye en el desarrollo del embrión: *Acacia farnesiana* tiene una forma ovalada globosa y un tamaño que oscila entre los 0.4-0.5 cm; y *Ebenopsis ebano* una forma cuadrada globosa y un tamaño que va de 0.8–1.0 cm. Se ha reportado que el tamaño de la semilla influye en la germinación; cuando la semilla es más grande tiende a tener mayor concentración de nutrientes con respecto a las semillas de menor tamaño (Baloch *et al.*, 2001, p. 335; Ayala-Cordero *et al.*, 2004, p. 692).

Se ha reportado que la semilla de *Acacia farnesiana* contiene grandes reservas de nutrientes, como almidones al rededor del endospermo, lo que permite que una vez iniciado el proceso de germinación la radícula crezca rápidamente (Lancher, 2003, p. 533); esto se observó en el experimento.

Se encontraron diferencias significativas en la concentración de metales (As, Cd y Zn) en los tratamientos ( $F_{22,46} = 16.043$ ;  $P < 0.0001$ ; Wilk's Lamda=0.0014106;  $R^2=0.6899$ ).

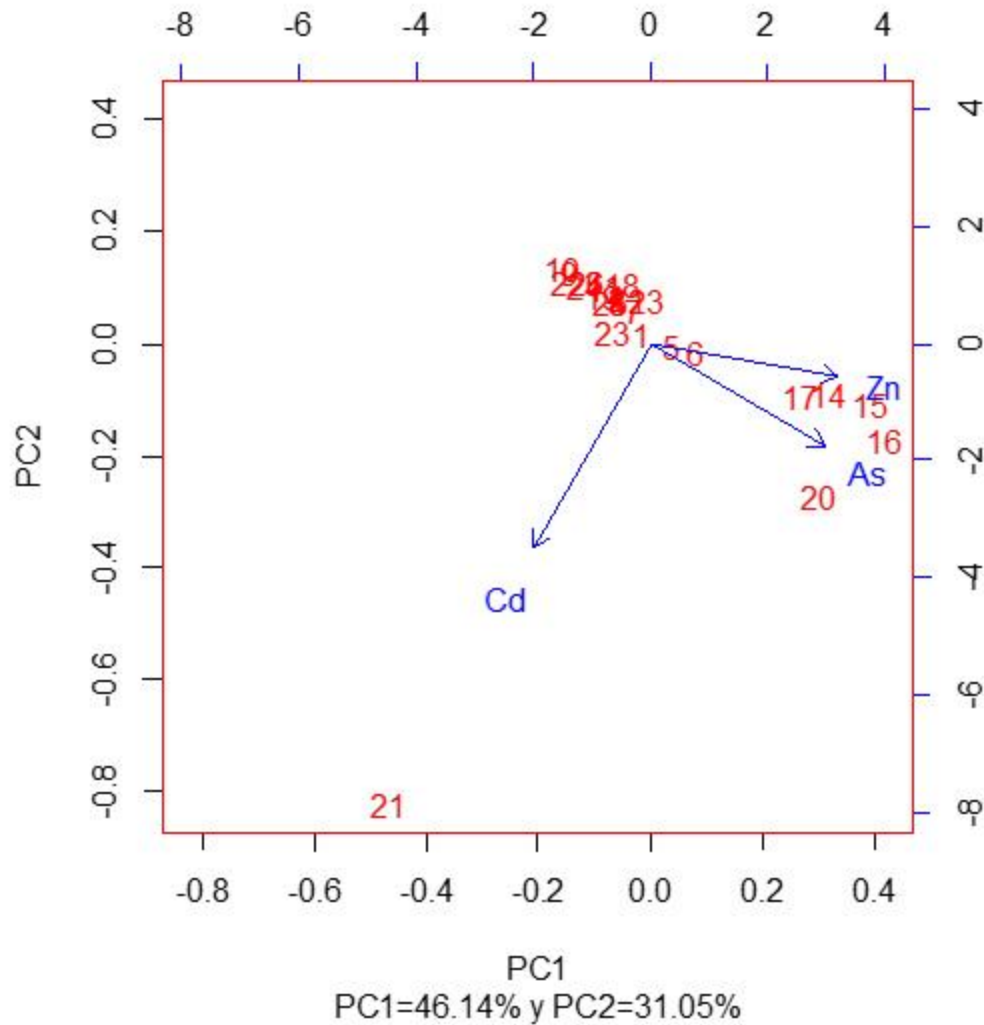
El tratamiento 13 presentó la mayor concentración de As, mientras que para Zn y Cd el mayor contenido se obtuvo en los tratamientos 8 y 13, respectivamente (**Fig. 3**). Además, se encontró una correlación positiva entre los metales As y Cd ( $r=0.9999$ ;  $P < 0.0001$ ) (**Fig. 4**).



**Fig. 3.** Análisis de componentes principales basados en la concentración de metales como As, Cd y Zn para discriminar entre tratamientos. La variación explicada por los ejes fue del 94,10%.

**Fig. 3.** Analysis of main components based on the concentration of metals such as, As, Cd and Zn to discriminate between treatments. The variation explained by the axes was 94.10%.

Los resultados del análisis de componentes principales ACP (**Tabla 2**) mostraron una relación entre As y Cd con respecto a los tratamientos 14 y 13 (**Fig. 3**). Los dos componentes principales (PC1 y PC2) explican la variación total de 94.10% encontrados en los tratamientos. Los tratamientos 13 y 14 mostraron la mayor concentración de metales de Cd y As, mientras que el T8 mostró mayor contenido de Zn (**Fig. 4**).



**Fig. 4.** Análisis de componentes principales basados en la concentración de metales como Cd y Zn para discriminar entre tratamientos. La variación explicada por los ejes fue del 75,06%.

**Fig. 4.** Analysis of main components based on the concentration of metals such as, Cd and Zn to discriminate between treatments. The variation explained by the axes was 75.06%.

**Tabla 2.** Matriz de correlación de Pearson entre las concentraciones de metales por tratamiento.

**Table 2.** Pearson's correlation matrix between treatments and metal concentrations.

Variable 1	Variable 2	Pearson	P valor
As	Cd	0.9999	<0.0001
As	Zn	-0.3146	>0.05
Zn	Cd	-0.3133	>0.05

Se encontraron diferencias significativas en las cantidades de pH, MO %, C.E. y Nt a través del tratamiento ( $F_{22,46} = 6.6028$ ;  $P < 0.0001$ ; Wilk's Lamda = 0.002938;  $R^2 = 0.6792$ ). En los tratamientos 20, 21, 22 y 23 se presentó la mayor cantidad de MO, mientras que en pH los tratamientos 13, 21, 12; y en C.E. los tratamientos 6, 8, 7 y 4 y en Nt 2, 4 y 15 (**Fig. 3**). Se encontró correlación positiva entre el porcentaje de MO y la C.E. ( $r = 0.2476$ ,  $P < 0.05$ ) (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Matriz de correlación de Pearson entre las concentraciones de los parámetros evaluados del suelo por tratamiento.

**Table 3.** Pearson's correlation matrix between the metal concentrations obtained from the soil.

Variable 1	Variable 2	Pearson	P valor
pH	CE	-0.5628	>0.05
pH	%MO	0.1218	>0.05
pH	Nt	-0.0749	>0.05
CE	%MO	0.2476	<0.05
CE	Nt	-0.2307	>0.05
%MO	Nt	-0.3177	>0.05

Los resultados del análisis ACP mostraron una relación entre los % de MO y CE con respecto a los tratamientos 22 y 23 (**Fig. 2**). En este análisis, se tomaron en cuenta las varianzas, que fueran mayor a uno. Los dos componentes principales (PC1 y PC2) explican la variación total de 73.08% encontrados en los tratamientos. El tratamiento 21 mostró la mayor cantidad de MO, pH C.E., mientras que el tratamiento 2 mostró mayor contenido de Nt (**Fig. 5**).

La biodisponibilidad de los metales en el suelo es afectada por parámetros como el pH, C.E. y potencial redox (PR). En este estudio, el pH en los sustratos fue alcalino, lo que permite que la adsorción de As, Cd y Zn se incremente (Kabata-Pendias y Pendias, 2000, p. 412). Sin embargo, la movilidad y retención de los metales tienen mayor disponibilidad a pH ácido; en este



estudio, el pH fue alcalino para los tres sustratos: Lodo 1, Lodo 2 y suelo (8.18 – 8.31). Probablemente, la movilidad de As, Cd y Zn estuvo influenciado por el potencial redox, factor que permite la biodisponibilidad de los metales, debido a que genera cambios en el estado en que se encuentre los iones. Por ejemplo, Bolan *et al.*, (2014, p. 141), señalan que, a pH ácido, el Zn se encuentra como  $Zn^{+2}$  iónicamente biodisponible; mientras que con valores de pH por encima de 7.7, este elemento precipita en forma de carbonatos o hidróxido, lo que implica una menor movilidad/solubilidad. Además de la solubilidad y el pH, otros factores que influyen en la biodisponibilidad del Zn son: la humedad, MO y las interacciones con otros microelementos como el Cd que está estrechamente relacionado con el comportamiento del Zn en el suelo (US EPA, 2005<sup>a</sup>); también macronutrientes como el N (US EPA, 2007c).

Con respecto al As, la movilidad puede estar beneficiada con el aumento del pH 8.36. El aumento en los valores de pH en este trabajo mostró diferencias entre tratamientos, indicando que fue provocado por la presencia de la planta, en contradicción con lo que reportan Bernal *et al.* (2007, p. 1) quienes sustentan que la liberación de citrato por las raíces atenúa la acidez del medio. Lo anterior explica que la remoción de As, Cd y Zn estuvo influenciada por la especie y las características del sustrato, que se vieron favorecidas por la bioestimulación de la urea y la presencia de MO, que confiere el efecto tapón que controla la alcalinidad de los sustratos (Kothe y Varma 2012, p. 279).

### Análisis de las plántulas

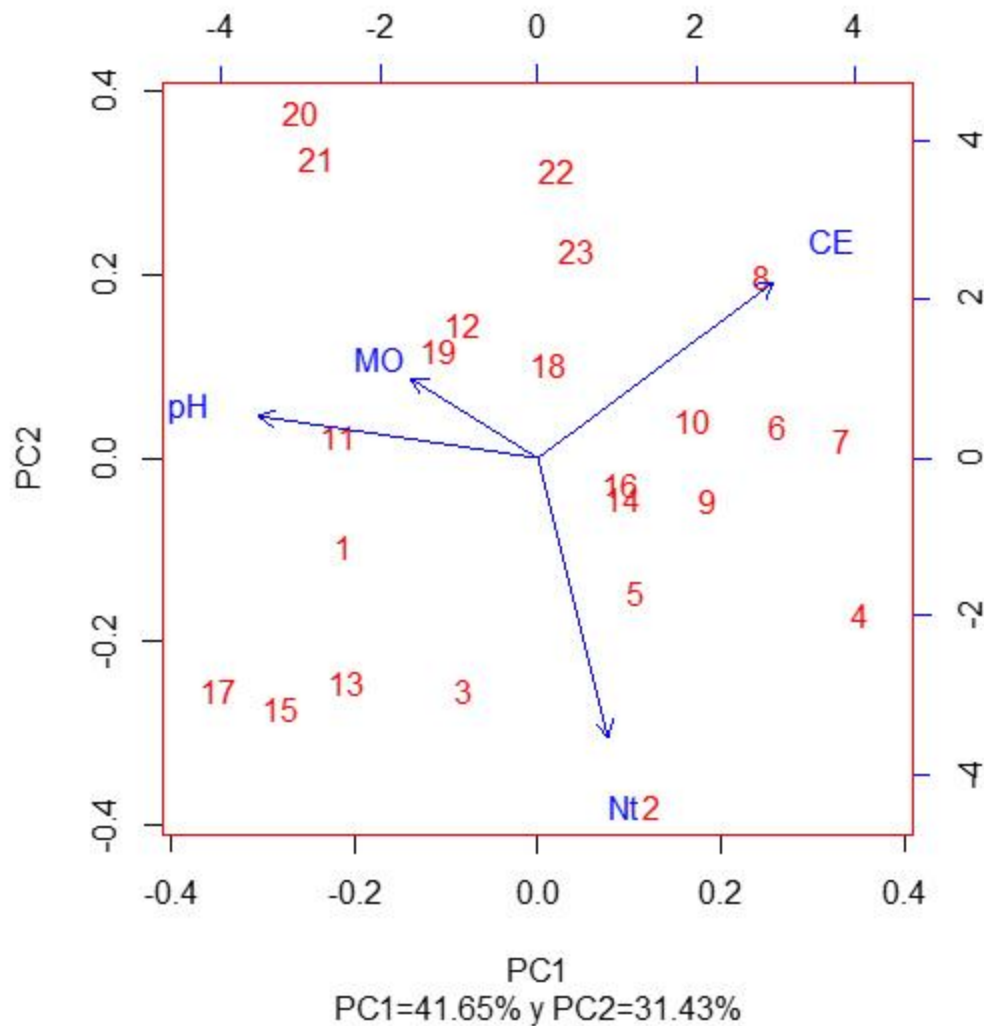
Se encontraron diferencias significativas en la concentración de metales (As, Cd y Zn) a través del tratamiento ( $F_{12,52} = 3.5971$ ;  $P < 0.0001$ ; Wilk's Lamda = 0.15977) y de la parte de la planta ( $F_{1,52} = 8.7753$ ;  $P < 0.0001$ ; Wilk's Lamda = 0.65509), así como la interacción entre estos ( $F_{12,52} = 3.8423$ ;  $P < 0.0001$ ; Wilk's Lamda = 0.14293). Los tratamientos 4, 1, 2, 3 y 10, en la parte de la raíz, presentaron la mayor concentración de Zn y As; en tanto que, para Cd, el tratamiento 13 en la raíz mostró el mayor contenido (**Fig. 3**). Se encontró una correlación positiva entre As y Zn ( $r = 0.2190$ ;  $P < 0.05$ ) (**Tabla 4** y **Fig. 5**).

Los resultados del análisis de ACP mostraron una relación entre Zn y As, con respecto a los tratamientos 4, 1, 2, 3, y 10 (**Fig. 3**). Los dos componentes principales (PC1 y PC2) explican la variación total de 77.19% encontrados en los tratamientos. En el sistema radical, los tratamientos 17, 14, 16 y 20 mostraron la mayor concentración de metales de Zn y As, y sólo el tratamiento 13 mostró mayor contenido de Zn en las raíces de las plantas (**Fig. 5**).

**Tabla 4.** Matriz de correlación de Pearson entre las concentraciones de metales obtenidas de plántulas.

**Table 4.** Pearson's correlation matrix between the metal concentrations obtained from seedlings.

Variable 1	Variable 2	Pearson	P valor
As	Cd	-0.0197	>0.05
As	Zn	0.2190	<0.05
Zn	Cd	-0.0088	>0.05

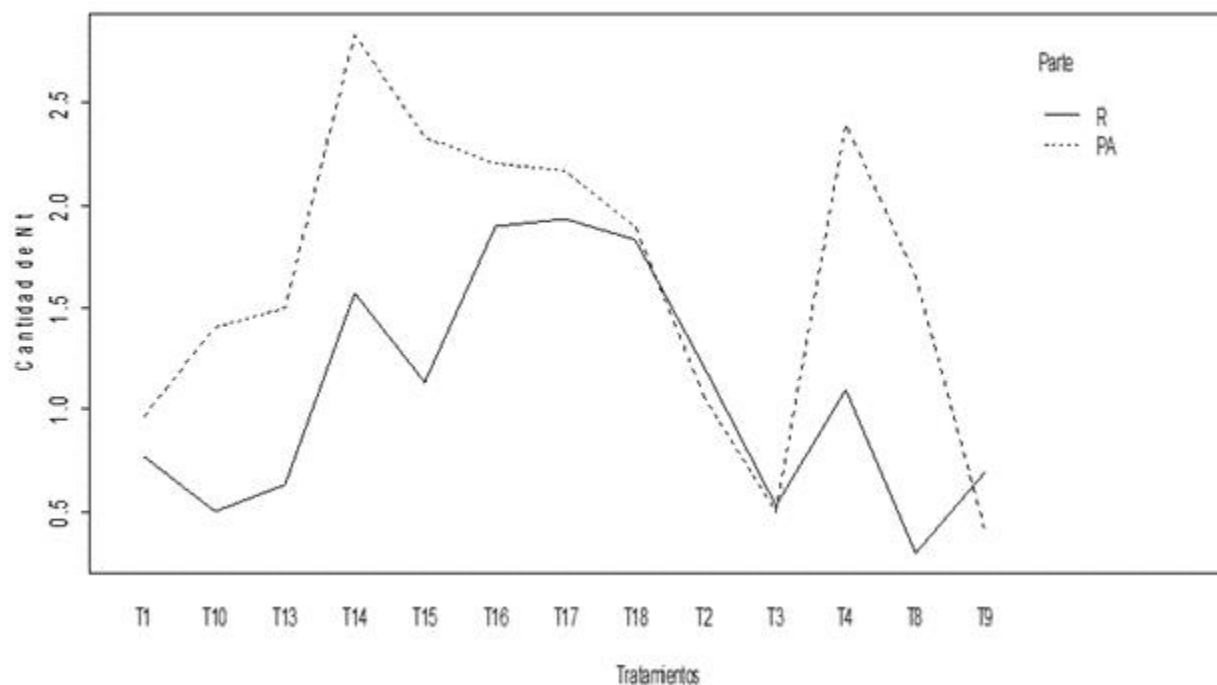


**Fig. 5.** Análisis de componentes principales basados en las cantidades de % MO, C.E., Nt y pH para discriminar entre tratamientos. La variación explicada por los ejes fue del 73,08%.

**Fig. 5.** Principal component analysis based on the amounts of % MO, C.E., Nt and pH to discriminate between treatments. The variation explained by the axes was 73.08%.

Con respecto a la cantidad de Nt, se observaron diferencias significativas con respecto a los tratamientos ( $F_{12,52} = 7.54, P < 0.0001$ ) y al órgano de la planta ( $F_{1,52} = 21.1257, P < 0.0001$ ), así como por la interacción de estos dos factores (tratamiento\*parte de la planta) ( $F_{12,52} = 1.9570, P <$

0.05). El tratamiento 14 presentó la mayor cantidad de Nt en la parte área de la planta, y el tratamiento 8 fue el tratamiento que mostró menor contenido de Nt (**Fig. 6**).



**Fig. 6.** Cantidad de Nt con respecto a los tratamientos y parte de las plántulas.

**Donde: R:** Raíz; y **PA:** Parte Área.

**Fig. 6.** Amount of Nt with respect to the treatments and part of the seedlings.

**Where: R:** Root; and **PA:** Part Area.

La acumulación de As, Cd y Zn estuvo determinada por el órgano de la planta. La tolerancia de metales pesados como el As, Cd y Zn por las plantas, se debe a que son metales de transición que tienen la capacidad de oxidar y de reducir diferentes biomoléculas (Choppala *et al.*, 2014, p. 374). Por lo anterior, estos efectos en el estado redox de la célula se pueden mejorar aún más, debido a la reacción de acoplamiento de estos metales con biomoléculas, lo que puede explicar las concentraciones de As, Cd y Zn en los órganos *Acacia farnesiana* y *Ebenopsis ebano*.

En el comportamiento de acumulación general de los metales, predominó el siguiente orden: raíz > parte área; la mayor concentración en las raíces se debe a que es el órgano donde se absorben primeramente los elementos desde el sustrato; y la baja concentración hallada en parte

área puede deberse a su función como transporte de nutrientes y minerales del suelo hacia la parte aérea (Avci y Deveci, 2013, p. 283).

Los resultados de los análisis realizados mostraron diferencias significativas en los tratamientos con respecto a la concentración de As, Cd, y Zn, así como de Nt en la parte aérea y en raíz de las plántulas, indicando que el tipo de sustrato puede influir en la afinidad de estos elementos por algún órgano en específico de la planta, debido a que al realizar la mezcla de sustratos las características del lodo residual y del suelo variaron (pH, MO, y CE), al igual que la disponibilidad del Nt (Ibrahim *et al.*, 2013, 571).

## **Bioestimulación**

La bioestimulación con urea favoreció el desarrollo de las plántulas de *Acacia farnesiana* y *Ebenopsis ebano* debido a que ayudó en el traslado del N, así como en la fitoextracción de los metales presentes en los sustratos, los cuales se encontraron en la raíz y parte aérea de ambas especies (Brown *et al.*, 2003, p. 100). Como se muestra, los tratamientos donde se obtuvo la mayor concentración de As y Cd en las plántulas fueron aquellos a los cuales se les agregó urea, mientras que a los tratamientos a los cuales no se les agregó este fertilizante tuvieron concentraciones bajas de estos metales. Aunado a esto, las altas concentraciones en raíz de ambos metales se podrían deber a la presencia de dicho fertilizante (Landeros-Márquez *et al.*, 2011, p. 11). Esto concuerda con los resultados obtenidos, donde se observa que existe una relación proporcional; es decir, entre más Nt contenga el tratamiento, la concentración de los metales aumenta.

Para As se observó en los tratamientos 1 y 2, a los cuales se les agregó urea, que, a mayor contenido de N en las plántulas, mayor concentración de As en raíz. Con respecto al Cd, la bioestimulación favoreció la concentración de Cd en la parte aérea, debido a que la urea comúnmente incrementa el cadmio intercambiable, soluble en el agua del suelo (Brown *et al.*, 2003, p. 100), lo que probablemente provocó que el metal pasara rápidamente hasta la parte

aérea. Además, en los tratamientos donde se agregaron los 33.30 mg L<sup>-1</sup> de Cd, se observan menores porcentajes de Nt y altas concentraciones de Cd.

Con respecto a la cantidad de Nt, se observaron diferencias significativas con respecto a los tratamientos ( $F_{12, 52} = 7.54$ ,  $P < 0.0001$ ) y parte de la planta ( $F_{1, 52} = 21.1257$ ,  $P < 0.0001$ ) y la interacción entre estos factores (tratamiento\*parte de la planta) ( $F_{12,52} = 1.9570$ ,  $P < 0.05$ ). El tratamiento 14 presentó la mayor cantidad de Nt en la parte aérea de la planta, y el tratamiento 8 fue el tratamiento que mostró menor contenido de Nt.

## Conclusiones

El índice de germinación de *Acacia farnesiana* y *Ebenopsis ebano* se sustenta en las características estructurales y fisiológicas de estas especies, que permiten su germinación en medios acuosos de lodos residuales provenientes de la extracción de gas shale. La mayor concentración de As, Cd y Zn en las plántulas se presentó en las raíces. La remoción de As, Cd y Zn estuvo influenciada por la especie, las características del sustrato, la bioestimulación y la presencia de MO, que confiere el efecto tapón que controla la alcalinidad de los sustratos.

### Agradecimientos

Esta investigación se realizó con financiamiento PRODEP DSA/103.5/16/14691.

### Referencias

- Agamuthu, P., Tan, Y. & Fauziah, S. (2013). Bioremediation of hydrocarbon contaminated soil using selected organic wastes, *Procedia Environmental Sciences*, 18, 694-702. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2013.04.094>
- Avci, H., & Deveci, T. (2013). Assessment of trace element concentrations in soil and plants from cropland irrigated with wastewater. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 98, 283-291. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2013.08.013

- Ayala Cordero, G., Terrazas, T., López Mata, L. & Trejo, C. (2004). Variación en el tamaño y peso de la semilla y su relación con la germinación en una población de *Stenocereus beneckei*. *Interciencia*, 29(12), 692- 697. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33909907>
- Baloch, H.A., DiTomasso, A. & Watson AK. (2001). Intrapopulation variation in *Abutilon theophrasti* seed mass and its relationship to seed germinability. *Seed Science Research*, 11, 335-343. Disponible en: <https://weedecology.css.cornell.edu/pubs/Published%20Seed%20Sci%20Res.%2011%20335-343.pdf>
- Bernal, M., Clemente, R., Vázquez, S. & Walker, D. (2007). Aplicación de la fitorremediación a los suelos contaminados por metales pesados en Aznalcóllar. *Ecosistemas*, 16(2), 1-14. DOI: 10.7818/re.2014.16-2.00
- Bolan, N.S., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., Kirkham, M.B. & Scheckel, K. (2014). Remediation of heavy metal(loid)s 50 contaminated soils – To mobilize or to immobilize? *Journal of Hazardous Materials*, 266, 141-166. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.12.018
- Brown, S., Chaney, R. L., Hallfrisch, J. G. & Xue, Q. (2003). Effect of Biosolids Processing on Lead Bioavailability in an Urban Soil. *Journal of Environmental Quality*, 32, 100-108. DOI: 10.2134/jeq2003.1000
- Choppala, G., Saifullah, Bolan, N., Bibi, S., Iqbal, M., Rengel, Z., Kunhikrishnan, A. & Ok, Y.S. (2014). Cellular mechanisms in higher plants governing tolerance to cadmium toxicity. *Critical Reviews In Plant Sciences*, 33(5), 374-391. DOI: 10.1080/07352689.2014.903747
- Energy Information Agency. EIA. (2013). *Word Shale Gas Resources: An Initial Assessment of An Assessment of 137 Shale Formations in 41 Countries Outside the United States*. 27 pp.
- Emino, E. & Warman, P. (2004). Biological assay for compost quality. *Compost Science & Utilization*, 12(4), 342-348. DOI: <https://doi.org/10.1080/1065657X.2004.10702203>
- Euán Collí, R. E. (2016). *Potencial, Impacto y Desarrollo de Shale Gas en México*. (Tesis de Ingeniero Petrolero). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México.

- Gairola, K.C., Nautiyal, A. R. & Dwivedi, A. K. (2011). Effect of temperatures and germination media on seed germination of *Jatropha Curcas* Linn. *Advances in Bioresearch*, 2(2), 66-71.
- García Pérez, J. F., Aguirre Calderón, O., Estrada Castellón, E., Flores Rivas, J., Jiménez Pérez, J. & Jurado Ybarra, E. (2007). Germinación y establecimiento de plantas nativas del matorral tamaulipeco y una especie introducida en un gradiente de elevación. *Madera y Bosques*, 13, 99-117. DOI: <https://doi.org/10.21829/myb.2007.1311238>
- García-Torres, R., Ríos-Leal, E., Martínez Toledo, A., Ramos- Morales, F. R., Cruz-Sánchez, J. S. & Cuevas-Díaz, M. C. (2011). Uso de cachaza y bagazo de caña de azúcar en la remoción de hidrocarburos en suelo contaminado. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27, 31-39.
- Harkness, S. J., Darrah, H. T., Warner, R. N., Whyte, J. C., Moore, T. M., Millot, R., Kloppmann, W., Jackson, B. R. & Vengosh, A. (2017). The geochemistry of naturally occurring methane and saline groundwater in an area of unconventional shale gas development. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 208, 302-334. DOI: 10.1016/j.gca.2017.03.039
- Ibrahim, M., Alsahli, A. & El-Gaaly, G. (2013). Evaluation of phytoremediation potential of six wild plants for metal in a site polluted by industrial wastes: a field study in Riyadh, Saudi Arabia. *Pak. J. Bot*, 42(2), 571-576.
- Ikhajiagbe, B., Anoliefo, G, Oshomoh, E. & Agbonrienrien. B. (2013). Effects of watering regimes on the intrinsic qualities of bioremediated waste engine oil-polluted soil. *Annual Research & Review in Biology*, 3(2), 107–123.
- Jiménez Pérez, J., Alanís Rodríguez, E., Aguirre Calderón, O., Pando Moreno, M. & González Tagle, M. (2009). Análisis sobre el efecto del uso del suelo en diversidad estructural del matorral espinoso tamaulipeco. *Madera y Bosques*, 15(3), 5-20. DOI: <https://doi.org/10.21829/myb.2009.1531183>
- Kabata-Pendias, A. & Pendias, H. (2000). *Trace Elements in Soils and Plants*. (3rd edition). Boca Ratón, Florida, USA: CRC Press.
- Kothe, E. & Varma, A. (2012). Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils, *Soil Biology* 31. Chapter 15: *The Role of Organic Matter in the Mobility of Metals in Contaminated*



- Catchments*. Fârcâsanu, I.C., Iordache, C. & Neagoe, A. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 279-296 pp.
- Landeros-Márquez, O., Tejo-Calzada, R., Reveles-Hernández, M., Valdez-Cepeda, R. D., Arreola-Ávila, J. G., Pedroza-Sandoval, A. & Ruíz-Torres J. (2011). Uso potencial del huizache (*Acacia farnesiana* L. Will) en la fitorremediación de suelos contaminados con plomo. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 17, 11-20. DOI: <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2010.08.059>
- Larcher, W. (2003). *Physiological plant ecology*: Berlin: Ecology Springer, Verlag.
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 15-39. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214>
- Pohlert, T. (2014). *The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR)*. R package. <https://cran.r-project.org/web/packages/PMCMR/vignettes/PMCMR.pdf>
- Probert, R. J. (2010). The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination (261-292). In: Fenner, M. (Ed.). *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. London, England: CABI Publishing.
- Rivas-Medina, G., González-Cervantes, G., Valencia-Castro, C. M., Sánchez-Cohen, I., & Villanueva-Díaz, J. (2005). Morfología y escarificación de la semilla de mezquite, huizache y ahuehuate. *Técnica Pecuaria México*, 43(3), 441-448. Obtenido de <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/613/61343314.pdf>
- R Core Team. (2016). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>
- Secretaría de Energía. SENER. (2012). *¿Qué es el Shale Gas/Oil y cuál es su importancia?* Disponible en: [http://www.energia.gob.mx/webSener/shale/shale\\_sp.html](http://www.energia.gob.mx/webSener/shale/shale_sp.html)
- US EPA (2005a). *Ecological Screening Levels for Cadmium*. Disponible en: [http://www.epa.gov/ecotox/ecossl/pdf/eco-ssl\\_cadmium.pdf](http://www.epa.gov/ecotox/ecossl/pdf/eco-ssl_cadmium.pdf)
- US EPA (2007b). *Ecological Screening Levels for Zinc*. Disponible en: [http://www.epa.gov/ecotox/ecossl/pdf/eco-ssl\\_zinc.pdf](http://www.epa.gov/ecotox/ecossl/pdf/eco-ssl_zinc.pdf)
- Varnero, M., Rojas C. & Orellana R. (2007). Índices de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*, 7(1), 28-37. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-27912007000100003>

- Wheater, C. P., & Cook, P. A. (2005). *Using statistics to understand the environment*. London, UK: Routledge Taylor & Francis. Obtenido de <http://www.eBookstore.tandf.co.uk>.
- Yildirim, D. & Sasmaz, A. (2017). Phytoremediation of As, Ag, and Pb in contaminated soils using terrestrial plants grown on Gumuskoy mining area (Kutahya Turkey). *Journal of Geochemical Exploration*, 182b, 228-234.