

# Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género *Alyssum* L.

P.S. Kidd, C. Becerra Castro, M. García Lestón<sup>1</sup>, C. Monterroso<sup>2</sup>

(1) Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG), CSIC, Apdo. 122, E-15780 Santiago de Compostela.

(2) Dpto. de Edafología y Química Agrícola, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, E-15706 Santiago de Compostela.

**Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género *Alyssum* L.** Las plantas metalofitas han desarrollado mecanismos biológicos que les permiten sobrevivir en suelos ricos en metales, tanto naturales (suelos serpentiniticos o ultramáficos) como antropogénicos. La mayoría consigue su tolerancia restringiendo fisiológicamente la entrada de metales a las raíces y/o el transporte hacia las hojas. Algunas especies, sin embargo, presentan mecanismos extremadamente especializados que les permiten acumular o "hiperacumular" metales (como Cd, Co, Ni y Zn) en sus hojas, hasta alcanzar concentraciones superiores al 2% de su materia seca: son las denominadas "plantas hiperacumuladoras". Las hiperacumuladoras de Ni son mucho más numerosas que las de otros metales. La mayoría de ellas pertenecen a la familia *Brassicaceae*, siendo *Alyssum* L. uno de los géneros más representados. La fitoextracción utiliza estas plantas para extraer los metales del suelo y acumularlos en la biomasa aérea. Tras su cosecha, los restos vegetales pueden ser reciclados o confinados de una forma poco costosa, lo que constituye una estrategia económica para la limpieza de suelos contaminados. Una importante limitación de la aplicación práctica de la mayoría de las especies hiperacumuladoras en la fitoextracción es su reducido tamaño y escasa biomasa. Optimizar las prácticas de manejo del suelo y la cosecha, con el objeto de incrementar su productividad y la concentración de metales en la biomasa, así como cultivar especies hiperacumuladoras mejoradas, podría ser, por tanto, una combinación clave en el desarrollo último de esta técnica.

Palabras clave: suelos serpentiniticos, ultramáficos, plantas metalofitas, fitocorrección

**Application of nickel hyperaccumulating plants in natural phytoextraction: the *Alyssum* L. genus.** Metallophytes have evolved biological mechanisms allowing them to survive on metal-rich soils, either of natural (serpentine or ultramafic soils) or anthropogenic origin. Most metallophytes achieve tolerance by physiologically restricting the entry of metals into the root and/or transport to the shoot. A few species, however, have extremely specialized mechanisms enabling them to accumulate, and even "hyperaccumulate" metals (such as Cd, Co, Ni and Zn) in their shoots at concentrations that can exceed 2% of their dry weight: the so-called "hyperaccumulators". There are many more hyperaccumulators of Ni than of any other metal; a vast number are members of the *Brassicaceae* family, of which most are represented within the genus *Alyssum* L. Phytoextraction employs these plants to extract soil metals into plant shoots for recycling and less expensive disposal, offering an economic strategy to decontaminate polluted soils. One challenge of adapting hyperaccumulators to practical phytoextraction is the small size and biomass of many of these species. Optimizing soil management practices to increase plant biomass and metal accumulation, and the development of plant breeding programmes for improved hyperaccumulator cultivars, will be crucial in the development of this technique.

Key words: serpentine soils, ultramafic, metallophytes, phytoremediation

## Introducción

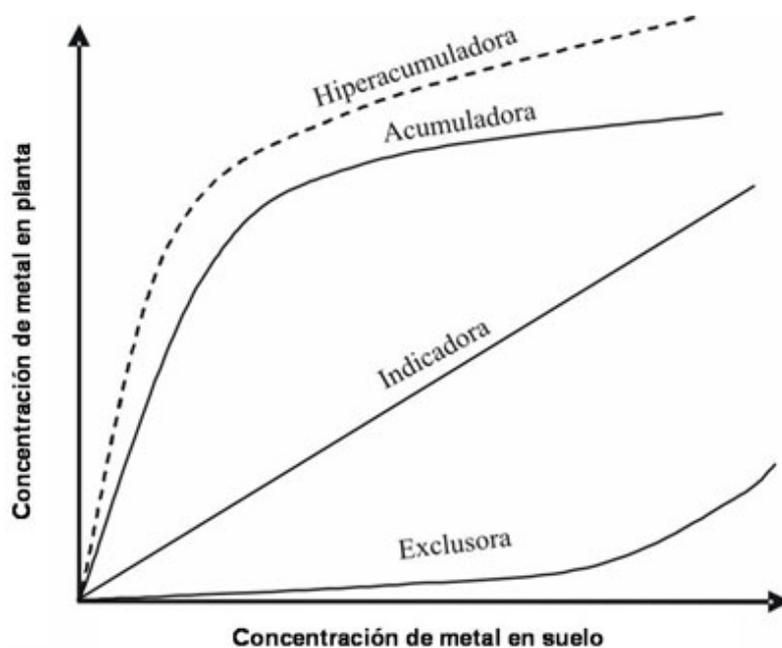
El término ultramáfico se utiliza para describir rocas ígneas (como las peridotitas) o metamórficas (como las serpentinitas) que presentan un contenido en sílice inferior al 45% (SiO<sub>2</sub>) y que tienen altas concentraciones de magnesio y hierro. Con frecuencia presentan, además, una riqueza relativamente elevada de cromo (Cr), cobalto (Co) y níquel (Ni), y bajo contenido de fósforo (P), potasio (K) y calcio (Ca) (Proctor, 1999; Roberts y Proctor, 1992). Las rocas ígneas ultramáficas están formadas por más del 90% de minerales ferromagnesianos, especialmente del grupo del olivino y el piroxeno, y la mayor parte de ellas han sufrido distintos procesos metamórficos, de los que la serpentinitización, con distintos grados de intensidad, es el más frecuente. La serpentinitización es un proceso de alteración hidrotermal que provoca la transformación del olivino en

minerales del grupo de la serpentinita. Estas rocas presentan una distribución dispersa, pero que alcanza todo el globo terrestre, de modo que se pueden encontrar afloramientos ultrabásicos en ecosistemas tan distintos como la tundra ártica o las selvas húmedas tropicales (Brooks, 1987), ocupando alrededor del 1% de la superficie terrestre (Menezes de Sequeira y Pinto da Silva 1992).

A pesar de que la heterogeneidad de estas rocas, y que su alteración bajo diferentes condiciones climáticas generan una importante variabilidad edáfica, la elevada concentración de metales pesados, como Ni, Cr y Co, los bajos niveles de nutrientes, como N, P, K y Ca, y la elevada relación Mg/Ca son rasgos característicos de los suelos derivados de rocas ultrabásicas (Brooks, 1987; Burt *et al.*, 2001; Kruckeberg, 1984; Proctor, 1971; Roberts y Proctor, 1992). En estas condiciones se desarrolla una comunidad vegetal singular, generalmente rica en taxones raros y/o endémicos, que han desarrollado mecanismos fisiológicos extremadamente especializados para resistir, tolerar y prosperar en estos medios tóxicos e infértiles, denominada flora serpentinitica o metalofita. Se considera que América Latina y Europa son los mayores focos de biodiversidad de metalofitas (Whiting *et al.*, 2004). La flora ultrabásica de zonas tropicales y subtropicales apenas ha sido estudiada, por lo que, dada la elevada diversidad y abundancia de depósitos de minerales metálicos de estas regiones, existen enormes posibilidades de descubrir nuevas plantas tolerantes a metales o metalofitas.

## Las plantas hiperacumuladoras

Muchas especies toleran las elevadas concentraciones de metales en el suelo porque restringen su absorción y/o translocación hacia las hojas, lo que les permite mantener concentraciones constantes y relativamente bajas en la biomasa aérea independientemente de la concentración metálica del suelo en un intervalo amplio (estrategia de exclusión según Baker, 1981). Sin embargo, otras absorben los metales activamente a partir del suelo y los acumulan en formas no tóxicas en su biomasa aérea (estrategia acumuladora). Una respuesta intermedia es la que presentan las plantas indicadoras, cuya concentración metálica refleja la del suelo (Baker, 1981). Entre las acumuladoras se han reconocido diferentes grados de acumulación metálica, desde pequeñas elevaciones sobre el nivel de fondo hasta concentraciones excepcionalmente elevadas de metales pesados como el Ni, Zn y Co en su biomasa aérea sin mostrar ningún síntoma visible de toxicidad (Brooks *et al.*, 1977; **Fig. 1**). Es más, algunas de estas plantas, no pueden completar sus ciclos vitales cuando crecen en suelos "normales" y se denominan plantas hiperacumuladoras. El término "hiperacumuladora" fue acuñado por Brooks y Reeves para referirse a plantas desarrolladas en campo capaces de acumular  $>1.000 \text{ mg Ni kg}^{-1}$  de materia seca en algún tejido de su biomasa aérea (Brooks *et al.*, 1977). De forma general, las hiperacumuladoras alcanzan concentraciones de metales en hojas entre 10 y 100 veces las concentraciones "normales" (Chaney *et al.*, 2000). Actualmente se utiliza el término hiperacumuladora de metales para designar plantas que acumulan  $>10.000 \text{ mg kg}^{-1}$  de Mn y Zn,  $>1.000 \text{ mg kg}^{-1}$  de Co, Cu, Pb, Ni, As y Se y  $>100 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd.



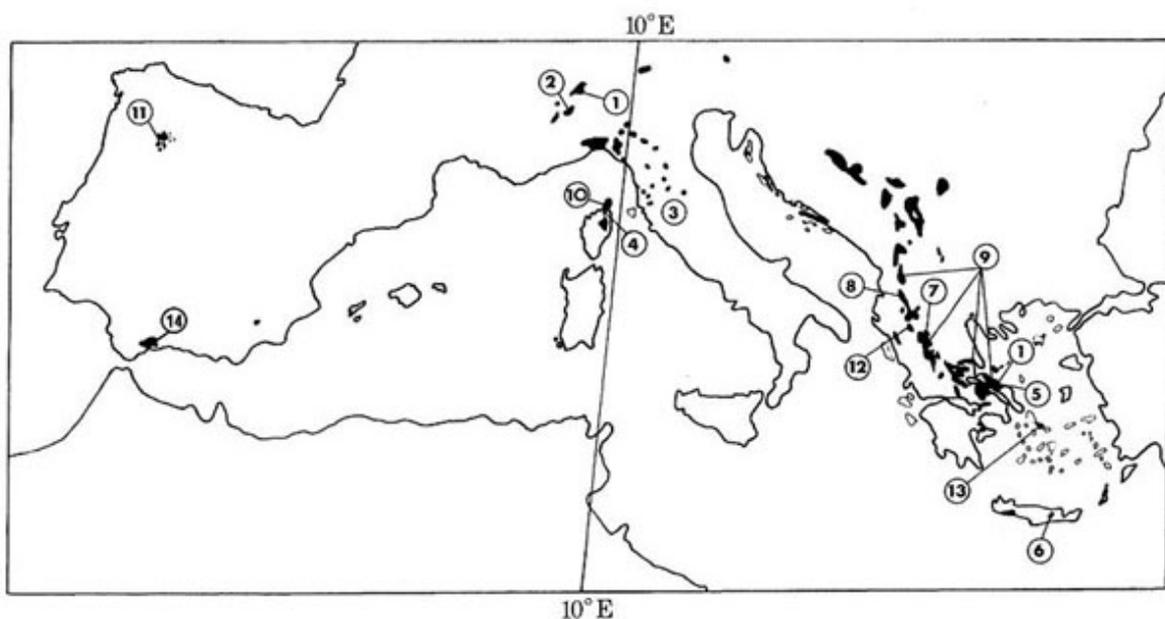
**Figura 1.** Respuestas típicas de las plantas frente a la presencia de metales pesados en el suelo (Adriano, 2001).

La hiperacumulación es un fenómeno raro, y la base evolutiva de su selección ha sido una incertidumbre desde su descubrimiento. Algunos estudios recientes sugieren que la acumulación inusual de metales confiere a estas plantas la capacidad de limitar su depredación y las infecciones microbianas causantes de enfermedades vegetales (Boyd y Martens, 1994; Boyd *et al.*, 1994; Pollard y Baker, 1997; Poschenrieder *et al.*, 2006). Hasta la actualidad, se han identificado aproximadamente 400 especies hiperacumuladoras, distribuidas entre 45 familias, lo que representa sólo un 0,2% de las angiospermas (Baker *et al.*, 2000; McGrath y Zhao, 2003 (**Tabla 1**)). No obstante, la lista sigue creciendo con citas recientes, como la del helecho *Pteris vittata*, que hiperacumula arsénico (Ma *et al.*, 2001), o la de *Alyssum bracteatum* hiperacumuladora del níquel (Ghaderian *et al.*, 2007).

**Tabla 1.** Umbrales de concentración de metal en planta utilizados como criterio de hiperacumulación, y número de taxones y familias de plantas hiperacumuladoras.

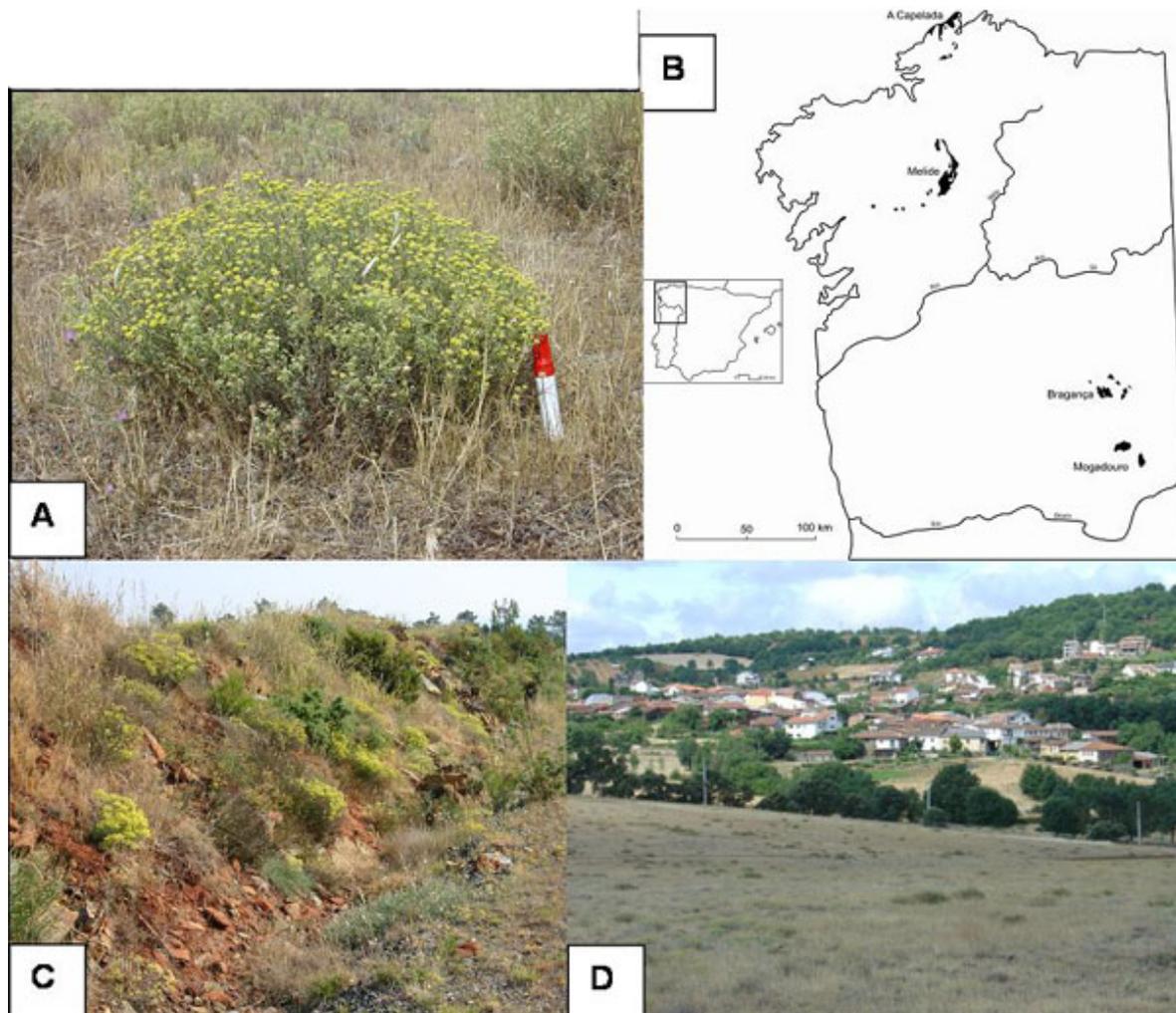
Metal	Criterio (% en peso seco de hoja)	Nº taxones	Nº familias
Cadmio	>0.01	1	1
Cobalto	>0.1	28	11
Cobre	>0.1	37	15
Plomo	>0.1	14	6
Manganeso	>1.0	9	5
<b>Níquel</b>	<b>&gt;0.1</b>	<b>317</b>	<b>37</b>
Cinc	>1.0	11	5

Como se aprecia en la **Tabla 1**, las hiperacumuladoras de Ni son mucho más numerosas que las de otros metales. Se conocen al menos 317 especies que hiperacumulan Ni que están englobadas mayoritariamente en sólo dos grupos: (1) especies y géneros pertenecientes a familias como *Violaceae* y *Flacourtiaceae* (Orden *Violales*) o *Buxaceae* y *Euphorbiaceae* (Orden *Euphorbiales*), de origen tropical, y (2) géneros pertenecientes a la familia de *Brassicaceae* (Orden *Capparales*), de la zona templada norte. Dentro de la familia *Brassicaceae*, las hiperacumuladoras de Ni se concentran en *Alyssum* L., con unas 48 especies con concentraciones de Ni de 0,1 a 3,0%, confinadas casi exclusivamente a la Sección *Odontarrhena* (Minguzzi y Vergnano, 1948; Brooks y Radford, 1978; Brooks *et al.*, 1979; Vergnano Gambi *et al.*, 1977). La distribución geográfica de las hiperacumuladoras del género *Alyssum* se correlaciona con la presencia de serpentinitas y otras rocas ultrabásicas ricas en Ni del sur de Europa (**Fig. 2**), el este mediterráneo y Asia Menor (Brooks *et al.*, 1979), presentando este género un elevado grado de endemismos serpentínícolas (Baker *et al.*, 2000).

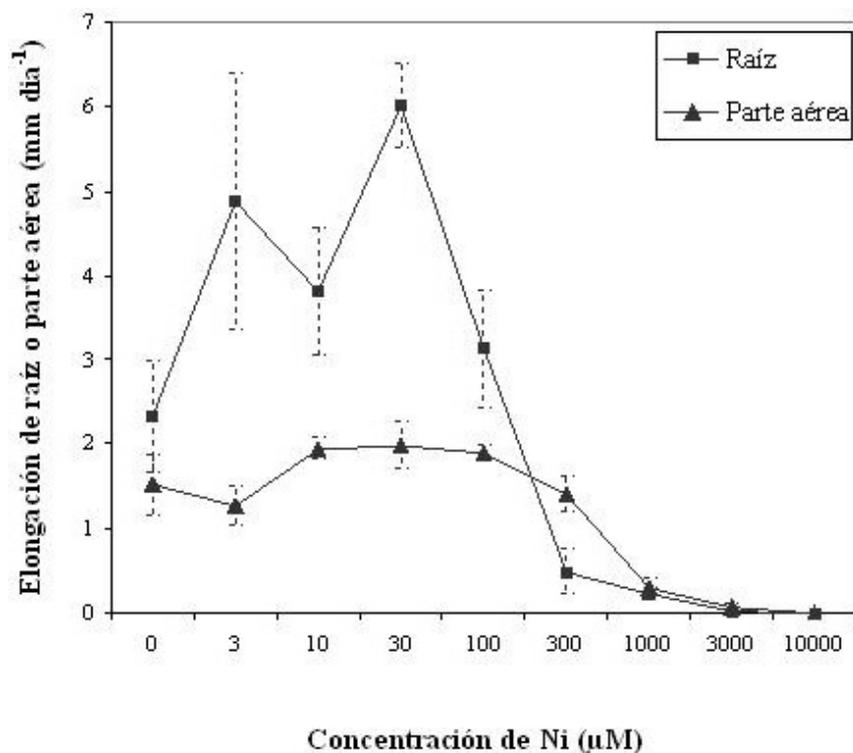


**Figura 2.** Distribución geográfica de especies hiperacumuladoras de *Alyssum* (contenido en Ni superior a 1000 mg/kg peso seco). Las áreas oscuras indican rocas ultrabásicas (Brooks et al., 1987). 1, *A. alpestre*; 2, *A. argenteum*; 3, *A. bertolonii*; 4, *A. corsicum*; 5, *A. euboeum*; 6, *A. fallacinum*; 7, *A. heldreichii*; 8, *A. markgrafii*; 9, *A. murale*; 10, *A. robertianum*; 11, *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum*; 12, *A. smolikanum*; 13, *A. tenium*; 14, *A. malacitanum*.

Brooks y Radford (1978), y Brooks et al. (1979) hicieron una revisión de la distribución de las hiperacumuladoras de Ni del género *Alyssum*. En la Península Ibérica aparecen *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* (endémica de Tras-os-Montes, NE Portugal y Melide, NW España), referida a veces como *A. pintodasilvae*, y *A. malacitanum* (endémica de Andalucía, S España). Las dos son miembros cercanos a *A. serpyllifolium*, una planta ubicua en la Península Ibérica y el Sur de Francia. Nuestro equipo ha estudiado la acumulación y tolerancia metálicas de diferentes poblaciones de *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* del NW de la Península Ibérica (**Fig. 3**). En cultivos hidropónicos, esta hiperacumuladora de Ni muestra un crecimiento óptimo en disoluciones con una concentración de 30  $\mu\text{M}$  de Ni (datos sin publicar, **Fig. 4**).



**Figura 3.** A) Ejemplo de *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* (población Samil), B) su distribución geográfica en el NO de la Península Ibérica y dos poblaciones: Melide (NO España, C) y Samil (NE, Portugal, D).



**Figura 4.** Elongación de la raíz y partes aéreas de plantas de *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* desarrolladas en cultivos hidropónicos con concentraciones crecientes de Ni.

## Hiperacumulación y descontaminación de suelos

El objetivo original de investigar sobre plantas hiperacumuladoras ha sido identificar nuevos yacimientos minerales y aportar nuevas características fenotípicas para la identificación de especies. La primera cita de una hiperacumuladora de Ni apareció en el trabajo de Minguzzi y Vergnano (1948), con una concentración de hasta 1,2% Ni en hojas de *Alyssum bertolonii*. En 1969 Menezes Sequeira identificaba a *Alyssum serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* (Menezes Sequeira, 1969). Mucho más tarde, Chaney y colaboradores introducían la idea de utilizar estas especies para la limpieza de suelos contaminados con metales (Chaney *et al.*, 1981a,b; Chaney, 1983).

La contaminación del agua, suelo y sedimentos es una consecuencia de una sociedad cada vez más industrializada. Los contaminantes que se liberan al medioambiente son tanto de naturaleza orgánica (compuestos xenobióticos tóxicos y persistentes, como los compuestos aromáticos policíclicos, múltiples pesticidas o compuestos organoclorados) como inorgánica (por ejemplo, los metales pesados). Se estima que en Europa occidental existen más de 140.000 puntos potencialmente contaminados y que el coste asociado a su limpieza es de millones de euros (Barceló y Poschenrieder, 2003). Hasta la actualidad, las autoridades medioambientales han abordado este problema promoviendo métodos de descontaminación basados en técnicas de ingeniería civil (como lavado, solidificación/estabilización u oxidación/reducción química de los contaminantes, tratamientos electrocinéticos, excavado, etc.) aplicados *in situ* o *ex situ*. Estas técnicas convencionales son caras, y viables sólo para áreas contaminadas relativamente pequeñas. En las últimas tres décadas la comunidad científica ha desarrollado técnicas basadas en procesos biológicos asociados a las plantas. Este tipo de tecnología verde se conoce como fitorremediación, fitolimpieza ó fitocorrección (Baker *et al.*, 1994; Baker *et al.*, 2000; Brooks, 1998; Chaney *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 1995; McGrath y Zhao, 2003; Pilon-Smits, 2005; Salt *et al.*, 1998; Vassilev *et al.*, 2004) y constituye una alternativa económica para la eliminación de los contaminantes del suelo, que posteriormente pueden ser reciclados o vertidos de una forma segura. Se estima que el coste de las técnicas de fitorremediación, es entre 10 y 1.000 veces menor que las técnicas tradicionales (Barceló y Poschenrieder, 2003). En la actualidad existe todo un conjunto de técnicas en el campo de la fitorremediación que son aplicables tanto a contaminantes orgánicos como inorgánicos.

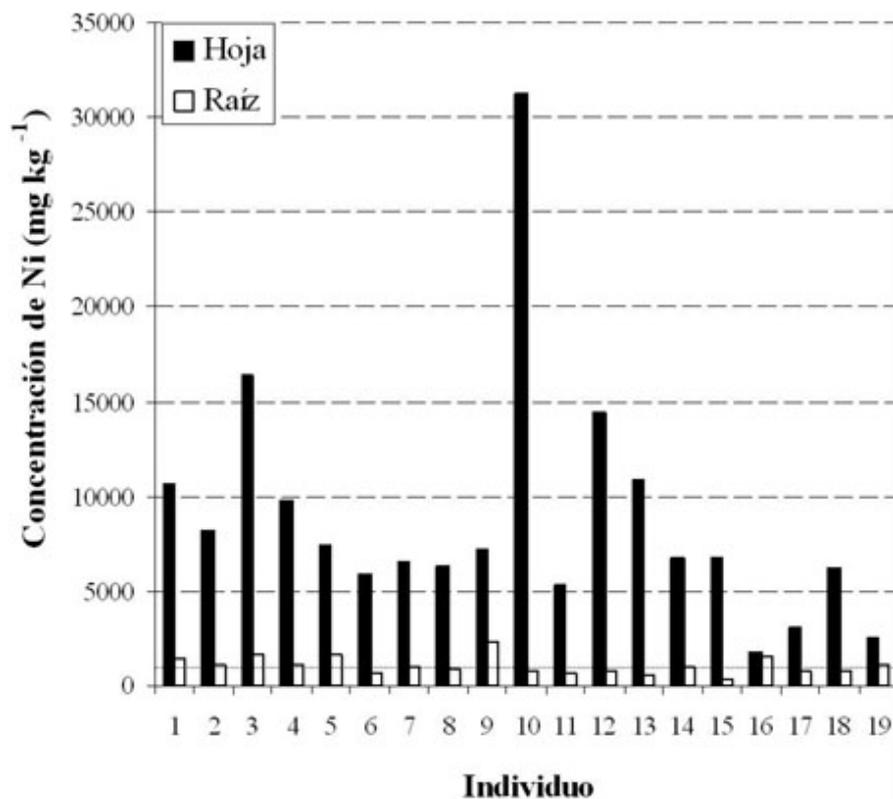
El uso de plantas hiperacumuladoras ha dado lugar a la técnica conocida como fitoextracción natural; el cultivo de estas especies permite que el metal pesado sea extraído del suelo por la absorción vegetal y la siega posterior de su biomasa aérea. Una importante limitación de la aplicación práctica de la mayoría de las especies hiperacumuladoras en la fitoextracción es su escasa biomasa y crecimiento lento, ya que la capacidad de extracción de metal de una cosecha (rendimiento metálico) es el producto de la biomasa aérea y el contenido de metal (Baker *et al.*, 2000; McGrath *et al.*, 2002).

El factor tiempo es, con mucho, el punto más crítico en la fitoextracción.

El aumento de la capacidad de fitoextracción de las plantas hiperacumuladoras de Ni podría conseguirse a través de: (1) el cultivo y reproducción de especies hiperacumuladoras seleccionadas; (2) la optimización de las prácticas de manejo del suelo y la cosecha; (3) la manipulación de las condiciones de la rizosfera y (4) el desarrollo de plantas de crecimiento rápido y alta biomasa, con capacidad de absorción mejorada, a través de la ingeniería genética. Esta última medida podría conseguirse a través de la identificación y clonación de los genes responsables de la hiperacumulación de los metales pesados y su transferencia a plantas de cultivo de elevada productividad. Hasta la fecha, la aplicación más exitosa de la ingeniería genética ha sido la transformación de plantas con el gen bacteriano *merA* modificado para detoxificar Hg (II) (Barceló y Poschenrieder, 2003). Sin embargo, las objeciones ecológicas, sociales y legales a estos procedimientos son numerosas. A continuación se describirán los avances recientes en las tres primeras líneas con respecto a la fitoextracción de níquel por hiperacumuladoras del género de *Alyssum*.

## Plantas hiperacumuladoras de Ni mejoradas: selección y/o reproducción de cultivares seleccionados

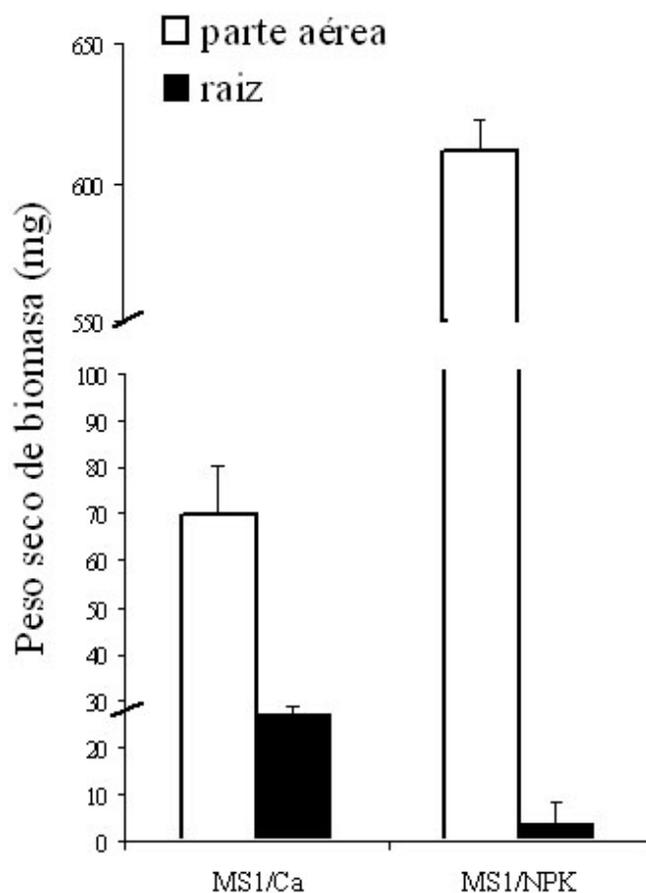
La capacidad de acumular metales de las especies hiperacumuladoras presenta una gran variabilidad natural entre poblaciones y dentro de la misma población. El caso de la hiperacumuladora de Cd *T. caerulescens* es el mejor conocido: el ecotipo del sur de Francia (denominado Ganges) tiene mayor capacidad de acumular Cd que otros ecotipos (Roosens *et al.*, 2003). Sin embargo, también se ha encontrado variación natural en el género *Alyssum*. Algunos de nuestros resultados indican diferencias de 17 veces en la hiperacumulación de Ni dentro de la misma población de *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* (denominada Samil): la concentración de Ni en hojas oscilaba entre 1.800 y 31.200 mg kg<sup>-1</sup> (Fig. 5, datos sin publicar). En 125 y 45 individuos de *A. murale* y *A. corsicum*, respectivamente, las concentraciones medias de Ni en hoja oscilaban entre 4.200 y 20.400 mg kg<sup>-1</sup> (Li *et al.*, 2003). Variaciones similares (entre 4.000 y 21.000 mg kg<sup>-1</sup>) fueron encontradas en nueve poblaciones diferentes de *A. bertolonii* (Galardi *et al.*, 2007). Esta diversidad genética se puede explotar a través de la reproducción tradicional de plantas para conseguir hiperacumuladoras mejoradas que presenten una mayor productividad y capacidad de acumulación metálica, lo que permitiría extraer anualmente una mayor cantidad de metales (eficiencia de la fitoextracción) que las plantas silvestres. Chaney y sus colaboradores han evaluado la variabilidad genética de *A. murale* y *A. corsicum* tras la recolección de semillas de un gran número de individuos. Con la reproducción de líneas parentales seleccionadas de las dos especies de *Alyssum*, estos autores consiguieron concentraciones de Ni en hoja de hasta 22.000 mg kg<sup>-1</sup> y producción de biomasa de hasta 20 Mg ha<sup>-1</sup> en condiciones de campo (Li *et al.*, 2003). En base a estos resultados y usando datos de precios de mercado del Ni, estos autores estimaron un beneficio neto de 1.749 \$ ha<sup>-1</sup> para un cultivo anual. En estos cálculos tuvieron en cuenta la variación del precio de Ni en un período de 15 años y los costes derivados de la renta del terreno, el mantenimiento y cosecha del cultivo y la recuperación del Ni a partir de su biomasa. Como resultado de esta investigación se concedió una Patente U.S. a esta propuesta de "fitominería" (Chaney *et al.*, 1998).



**Figura 5.** Variación natural en la concentración de Ni de raíz y hoja de *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* encontrada en diferentes individuos de una población (Samil). Con una línea punteada se indica el umbral para la hiperacumulación de Ni (1.000 mg kg<sup>-1</sup>).

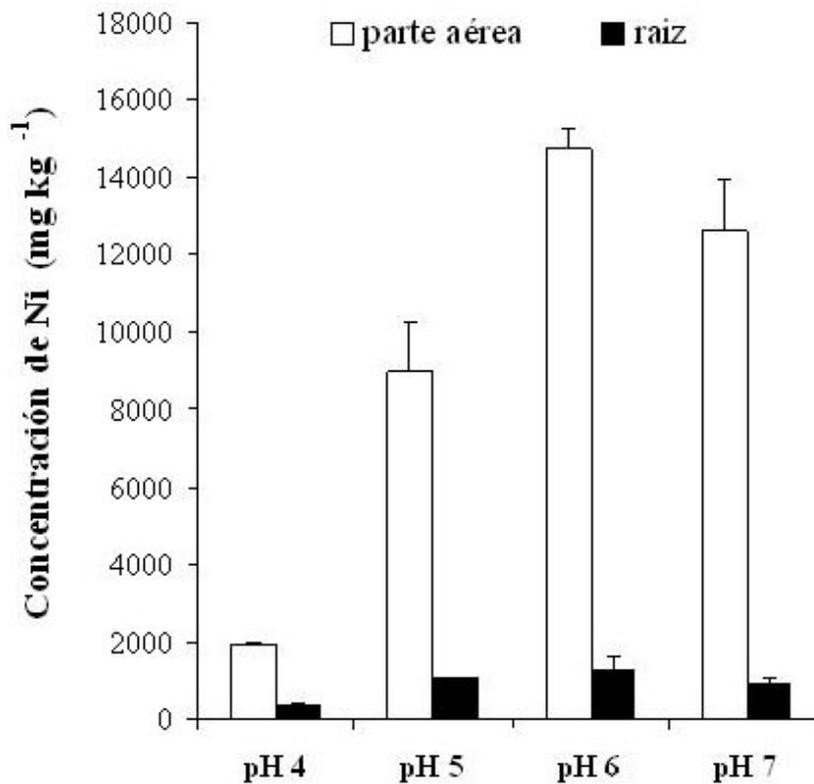
## Mejora del crecimiento de las plantas hiperacumuladoras de Ni: optimización de las prácticas de manejo del suelo

Un importante objetivo de la fitoextracción es maximizar el crecimiento de las hiperacumuladoras. En algunos ensayos de fertilización del suelo se han conseguido incrementos significativos de la biomasa de diferentes especies del género *Alyssum*, sin dilución significativa de la concentración de Ni. El cultivo puede ser, entonces, cosechado en el momento de máxima acumulación metálica en la biomasa aérea, que frecuentemente se da en el estado de media floración (Angle *et al.* 2001). Robinson *et al.* (1997) consiguieron aumentar tres veces la biomasa de *A. bertolonii* (hasta 9 t ha<sup>-1</sup>) con fertilización NPK. La fertilización también hacía multiplicar por 10 la biomasa de *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* desarrollada en suelos de mina contaminados con metales (Fig. 6, Kidd y Monterroso, 2005).



**Figura 6.** Biomasa radicular y aérea de *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* desarrollada en suelos de mina contaminados con metales (MS1) encalados (Ca) o fertilizados (NPK).

Dependiendo del metal en cuestión, las prácticas de manejo del suelo, como la modificación del pH y la fertilización, pueden tener diferentes efectos sobre la absorción. Por ejemplo, se ha demostrado que la acidificación del suelo favorece la hiperacumulación de Cd o Zn, aunque un exceso de acidez puede inducir fitotoxicidad de Al o Mn (Brown *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 2006). Por el contrario, la absorción y acumulación de Ni aumenta con el aumento de pH (Li *et al.*, 2003). En disoluciones hidropónicas, nosotros también hemos observado un aumento de la acumulación de Ni en *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* (población Samil) al aumentar el pH de la disolución nutritiva (Fig. 7, datos sin publicar).



**Figura 7.** Concentración de Ni en raíz y partes aéreas de plantas de *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* desarrolladas en cultivos hidropónicos con valores crecientes de pH.

### Mejora de la acumulación de Ni en las plantas hiperacumuladoras: interacciones planta-microorganismos-suelo en la rizosfera

Aunque las plantas hiperacumuladoras tienen una extraordinaria capacidad para absorber metales pesados, esta capacidad depende de la biodisponibilidad de los metales en el suelo y, particularmente, del suministro a partir de formas menos disponibles para la planta (McGrath *et al.*, 1997, Wenzel *et al.*, 2003). Los metales aparecen en el suelo unidos a fracciones con distinto grado de labilidad: cambiables, ligados a materia orgánica, a óxidos de hierro y manganeso, y a estructuras minerales. El equilibrio dinámico que se establece entre estas fracciones, más que el contenido total de metales, determina la movilidad y biodisponibilidad, siendo el pH, el potencial redox, y la cantidad y tipos de materia orgánica y arcillas los factores edáficos más importantes en su control (Korcak y Fanning, 1985). Además, las condiciones de la interfase raíz-suelo (rizosfera) pueden ser modificadas por la planta, a través de producción de exudados radiculares y rizo-depósitos (mucílago y restos celulares), y por la actividad microbiana como la liberación de sideróforos o reacciones redox (Adriano *et al.*, 2001; Lombi *et al.*, 2001; Puschenreiter *et al.*, 2003; Wenzel *et al.*, 2003) (**Fig. 8**).

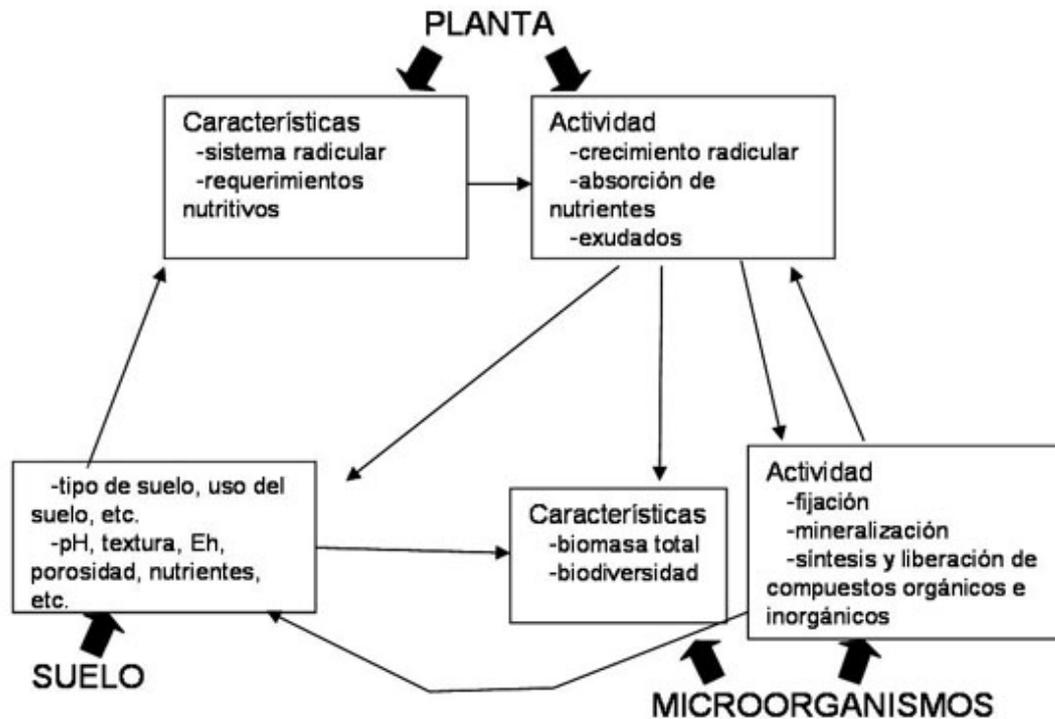
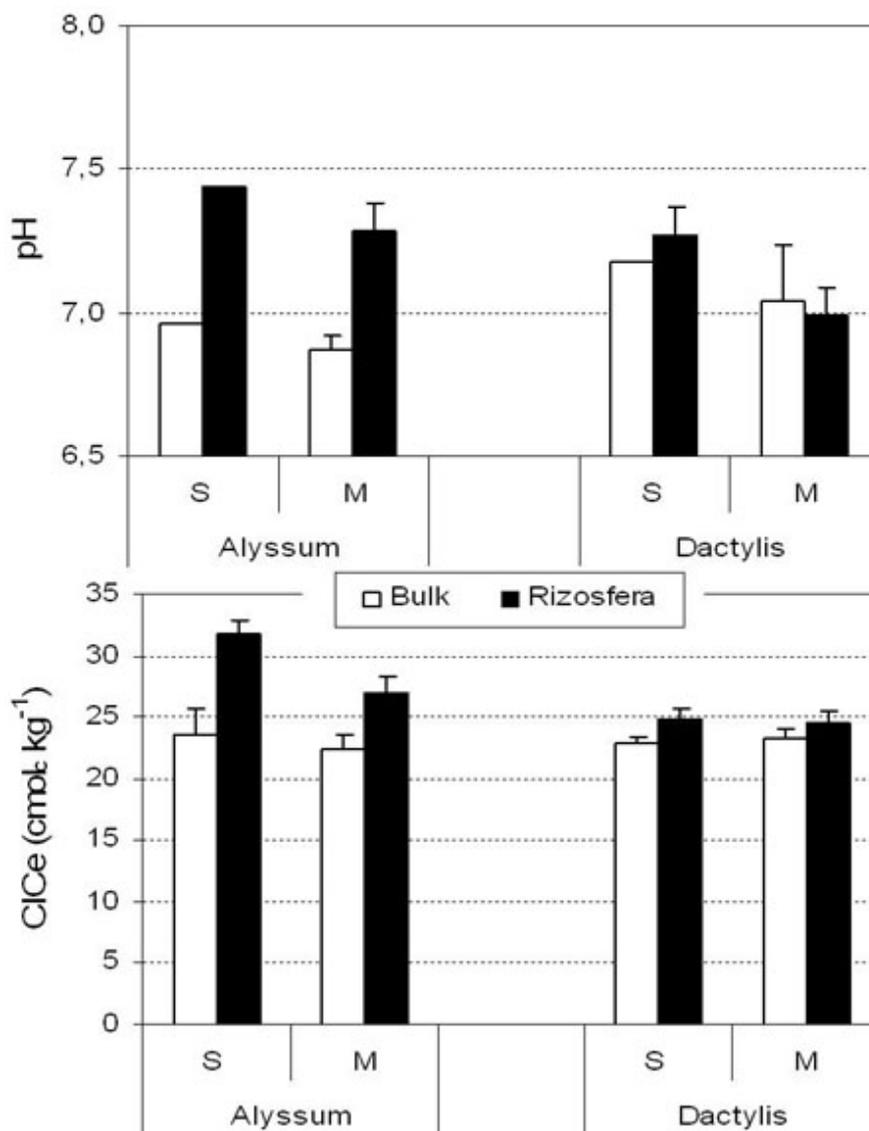
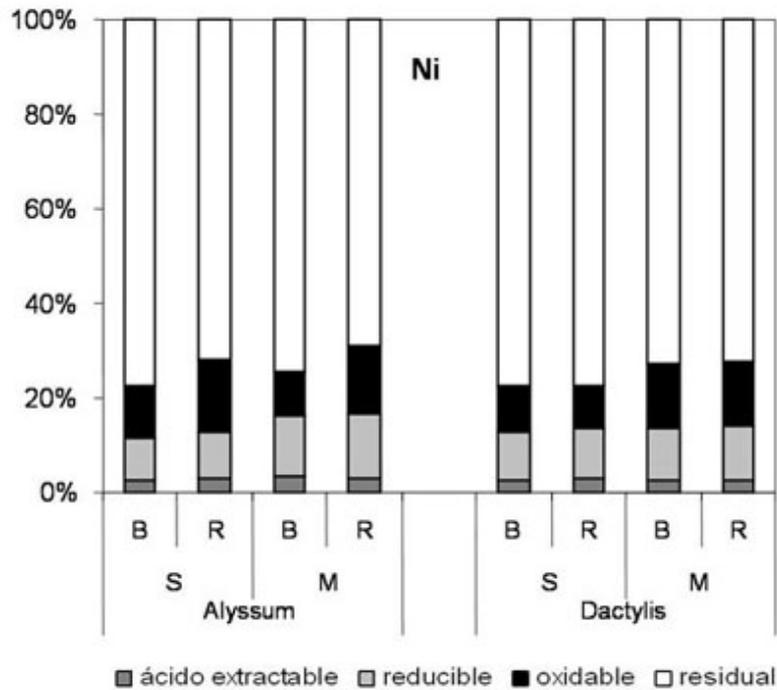


Figura 8. Interacciones planta-microorganismos-suelo.

Numerosos estudios han relacionado el almacenamiento y translocación de Ni en las plantas hiperacumuladoras con la presencia de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular (como malato, oxalato, citrato) y complejos aminoácido-Ni. El análisis de extractos de tejidos ricos en metales de distintas hiperacumuladoras de Nueva Caledonia han mostrado que el Ni estaba predominantemente ligado al citrato (Lee *et al.*, 1977, 1978). En las especies de *Alyssum* mediterráneas (*A. bertolonii*, subespecies de *A. serpyllifolium*, y *A. troodii*) el malato aparecía consistentemente como el principal ligando asociado al Ni en extractos de agua obtenidos de tejidos foliares (Pelosi *et al.*, 1976; Brooks *et al.*, 1981; Homer *et al.*, 1991). Krämer *et al.* (1996) demostró que en *A. lesbiacum* se translocaba el Ni cuando estaba asociado a histidina. Sin embargo, el papel de los exudados radiculares en la hiperacumulación sigue siendo motivo de debate, y los resultados publicados a veces son contradictorios (Puschenreiter *et al.* 2005a,b; Zhao *et al.* 2001). Estudios recientes de Wenzel y colaboradores apoyan la hipótesis de que las actividades radiculares (como la exudación de ácidos orgánicos) del hiperacumulador de Ni *Thlaspi goesingense* provoca la liberación de Ni soluble a partir de fuentes distintas a la fracción adsorbida, a través de la disolución de la fase sólida del suelo (minerales de la arcilla) promovida por ligandos (Puschenreiter *et al.*, 2003; 2005a,b; Wenzel *et al.*, 2003). Algunos de nuestros resultados, derivados de ensayos de campo e invernadero, mostraron un aumento del pH del suelo y de la capacidad de intercambio catiónico en la rizosfera de la hiperacumuladora *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* (Fig. 9). Asimismo, esta especie inducía un incremento de las fracciones de Ni más biodisponibles a expensas de las fracciones residuales (Ni ligado a silicatos) (Fig. 10), resultados no observados en una especie no hiperacumuladora utilizada como comparación (*Dactylis glomerata*). Como se mencionó anteriormente, la acumulación de Ni en esta especie aumenta con el incremento del pH. Sin embargo, junto con este incremento de la absorción de Ni hemos observado un incremento en la exudación radicular de malonato y citrato (datos sin publicar). Estos resultados podrían apoyar la hipótesis del incremento de la alteración mineral, aunque otros factores como la actividad microbiana también podrían desempeñar un papel importante.

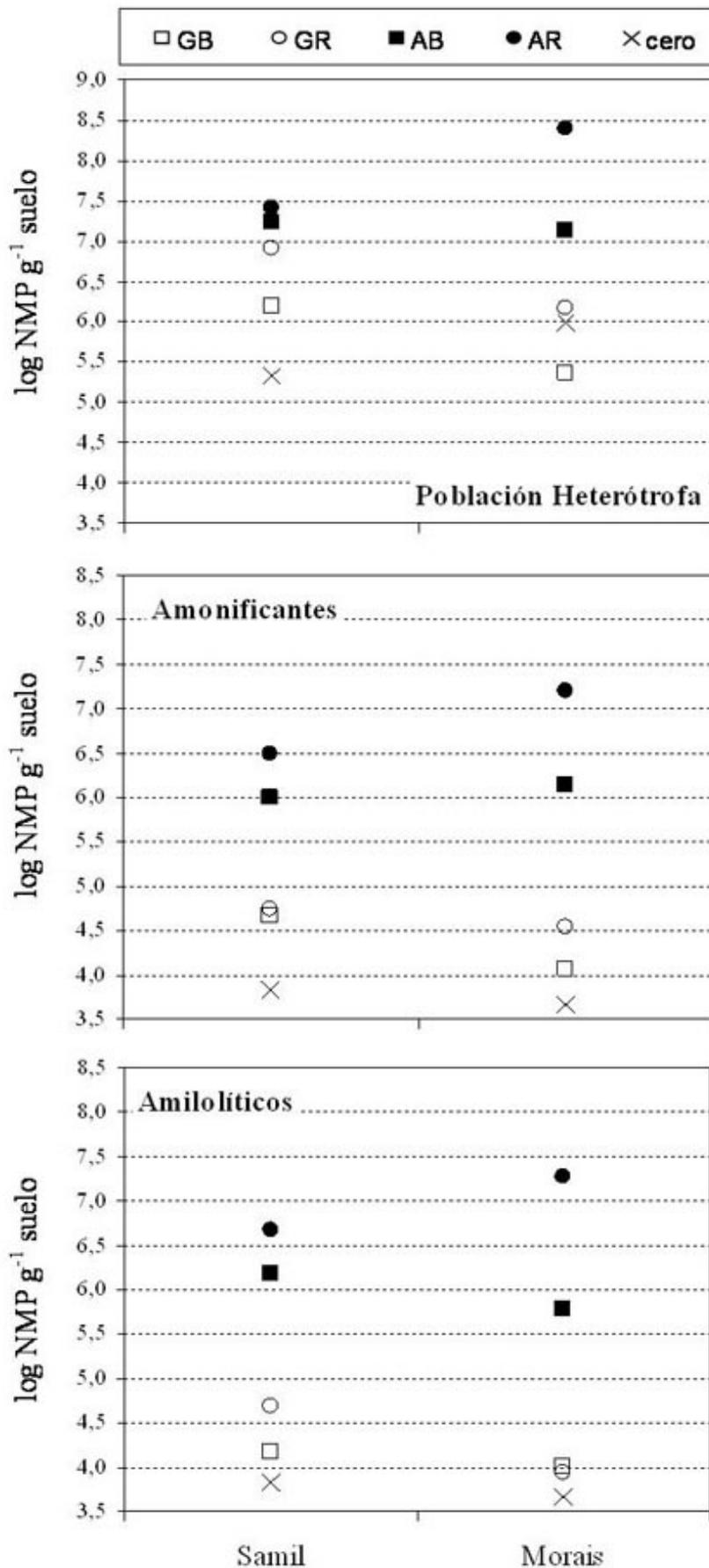


**Figura 9.** Diferencias en el pH del suelo y la capacidad de intercambio catiónico en suelo de la rizosfera y suelo no rizosférico (bulk) asociado a *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* y *Dactylis glomerata* procedente de dos poblaciones del NE de Portugal: Samil (S) y Morais (M).

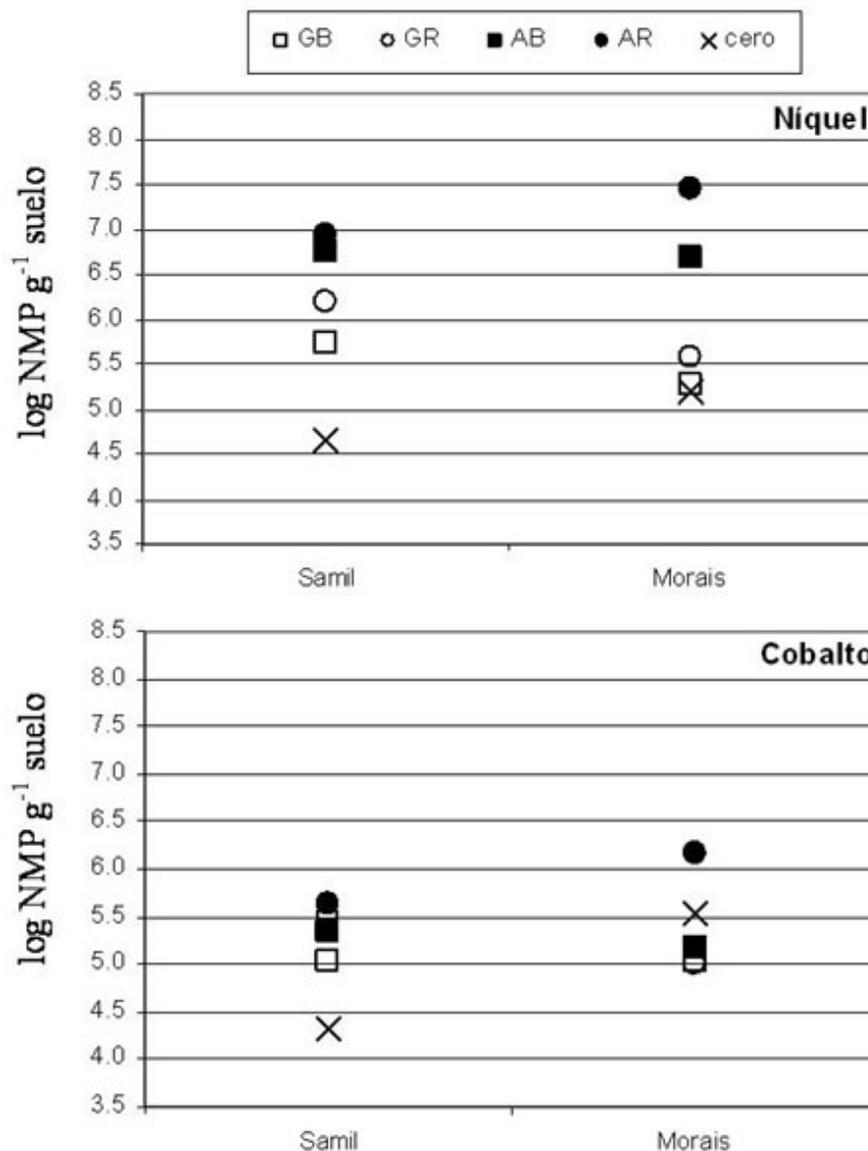


**Figura 10.** Diferencias en el fraccionamiento de Ni en suelo de la rizosfera (R) y suelo no rizosférico (B) asociado a *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* y *Dactylis glomerata* procedente de dos poblaciones del NE de Portugal: Samil (S) y Morais (M).

Se ha demostrado que los microorganismos de la rizosfera aumentaban la concentración de Zn soluble en agua y su acumulación en las hojas de *Thlaspi caerulescens* (Whiting *et al.*, 2001). Similarmente, se producía un aumento en la absorción de Ni por *A. murale* cuando era inoculado con rizobacterias (Abou-Shanab *et al.*, 2003a; Abou-Shanab *et al.*, 2006) y en la rizosfera de esta especie se encontró un mayor porcentaje de bacterias resistentes al Ni que en el suelo no rizosférico (Abou-Shanab *et al.*, 2003b). Los resultados de nuestros estudios indican diferencias significativas en los grupos cultivables de microorganismos del suelo asociados a dos poblaciones de la hiperacumuladora *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum* y la no hiperacumuladora *Dactylis glomerata*, y en su resistencia al Ni, Cr y Co (Fig. 11). *A. serpyllifolium* albergaba mayores densidades de bacterias heterótrofas, amonificantes y amilolíticos, y bacterias resistentes al Ni y al Co (Fig. 12). La tolerancia metálica se correlacionaba con la disponibilidad del metal en el suelo y seguía el orden Ni>Co>Cr. La mayor densidad de bacterias metal-tolerantes en la hiperacumuladora podría estar asociada al incremento de la biodisponibilidad de metal inducido por esta especie, que llevaría a una mayor acumulación en la rizosfera. Estos aspectos microbiológicos son poco considerados en el diseño de estrategias de fitorremediación. La explotación plena de las interacciones planta-microorganismos en estas estrategias requiere más estudios; existe un gran potencial para el desarrollo de inóculos que potencien la absorción de Ni durante la fitoextracción o la fitominería.



**Figura 11.** Número más probable (NMP) de los distintos grupos microbianos cultivables en suelo de la rizosfera (R) y suelo no rizosférico (B) asociado a *A. serpyllifolium* subsp. lusitanicum (A) y a *Dactylis glomerata* (G) en dos localizaciones del NE de Portugal.



**Figura 12.** Resistencia al Ni y Co de bacterias heterótrofos del suelo de la rizosfera (R) y del suelo no rizosférico (B) asociado a *A. serpyllifolium* subsp. *lusitanicum*(A) y a *Dactylis glomerata* (G) en dos localizaciones del NE de Portugal. (Número más probable (NMP) de microorganismos heterótrofos cultivados en medios con los distintos metales).

## Conclusiones

La existencia de plantas hiperacumuladoras de metales pesados se conoce desde antiguo, pero la idea de cultivarlas para extraer los contaminantes del suelo (fitoextracción natural) es relativamente reciente. Esta técnica presenta todavía numerosas limitaciones que impiden realizar la descontaminación de los suelos en poco tiempo. Sin embargo, las investigaciones realizadas hasta el momento ya han dado resultados prometedores. Destacan los estudios dirigidos a obtener un aumento de la productividad de estas especies y de su capacidad de acumulación metálica, a través de la selección y reproducción de cultivares mejorados y de la optimización de las prácticas de manejo del suelo. Paralelamente, los avances realizados en el entendimiento de las relaciones suelo-planta-microorganismos permitirán, en un futuro próximo, modificar las condiciones en la rizosfera de las plantas hiperacumuladoras para potenciar la absorción y la translocación de los metales. Ejemplos claros de estos avances los encontramos en numerosos trabajos sobre distintas especies del género *Alyssum*, el que mayor número de especies hiperacumuladoras incluye.

Parece claro que todavía hay muchas posibilidades de mejora de la fitoextracción natural. En este sentido, para el desarrollo de sistemas efectivos de fitoextracción, será clave la combinación de la información generada en numerosos campos: bioquímica, fisiología de la planta, agronomía, edafología e ingeniería.

## Referencias

- Abou-Shanab, R.A., Angle, J.S. y Chaney, R.L. 2006. Bacterial inoculants affecting nickel uptake by Alyssum murale from low, moderate and high Ni soils. *Soil Biol. Biochem.* 38: 2882-2889.
- Abou-Shanab, R.A., Angle, J.S., Delorme, T.A., Chaney, R.L., van Berkum, P., Moawad, H., Ghanem, K. y Ghazlan, H.A. 2003a. Rhizobacterial effects on nickel extraction from soil and uptake by Alyssum murale. *New Phytol.* 158: 219-224.
- Abou-Shanab, R.A., Delorme, T.A., Angle, J.S., Chaney, R.L., Ghanem, K., Moawad, H. y Ghazlan, H.A. 2003b. Phenotypic characterization of microbes in the rhizosphere of Alyssum murale. *Int. J. Phytorem.* 5: 367-379.
- Adriano, D.C. 2001. *Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals*. Springer-Verlag. New York, .
- Angle, J.S., Chaney, R.L., Baker, A.J.M., Li, Y., Reeves, R., Volk, V., Roseberg, R., Brewer, E., Burke, S. y Nelkin, J. 2001. Developing commercial phytoextraction technologies: practical considerations. *S. Afr. J. Sci.* 97: 619-623.
- Baker, A.J.M. 1981. Accumulators and Excluders - Strategies in the Response of Plants to Heavy-Metals. *J. Plant Nutr.* 3: 643-654.
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R. y Smith, J.A.C. 2000. Metal Hyperaccumulator Plants: A Review of the Ecology and Physiology of a Biological Resource for Phytoremediation of Metal-Polluted Soils. En: *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. (eds Terry, N. y Bañuelos, G.), pp. 85-107
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Sidoli, C.M.D. y Reeves, R.D. 1994. The Possibility of in-Situ Heavy-Metal Decontamination of Polluted Soils Using Crops of Metal-Accumulating Plants. *Resources Cons.Recycling.* 11: 41-49.
- Barceló, J. y Poschenrieder, C. 2003. Phytoremediation: principles and perspectives. *Contributions to Science.* 2: 333-344.
- Boyd, R.S. y Martens, S.N. 1994. Nickel Hyperaccumulated by Thlaspi montanum Var montanum Is Acutely Toxic to an Insect Herbivore. *Oikos.* 70: 21-25.
- Boyd, R.S., Shaw, J.J. y Martens, S.N. 1994. Nickel Hyperaccumulation Defends Streptanthus polygaloides (Brassicaceae) against Pathogens. *Am. J. Bot.* 81: 294-300.
- Brooks, R. 1987. *Serpentine and its Vegetation. A Multidisciplinary Approach*. Dioscorides Press. Croom Helm. London and Sydney .
- Brooks, R. 1998. Geobotany and hyperaccumulators. En: *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals*. ( ed. Brooks , R.), pp. 54-94, Cab International, Wallingford,
- Brooks, R.R., Lee, J., Reeves, R.D. y Jaffre, T. 1977. Detection of Nickeliferous Rocks by Analysis of Herbarium Specimens of Indicator Plants. *J. Geochem. Exploration* 7: 49-57.
- Brooks, R.R., Morrison, R.S., Reeves, R.D., Dudley , T.R. y Akman, Y. 1979. Hyper-Accumulation of Nickel by Alyssum Linnaeus (Cruciferae). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences.* 203: 387-403.
- Brooks, R.R. y Radford, C.C. 1978. Nickel Accumulation by European Species of Genus Alyssum. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences.* 200: 217-224.
- Brooks, R.R., Shaw, S. y Marfil, A.A. 1981. The Chemical Form and Physiological-Function of Nickel in Some Iberian Alyssum Species. *Physiol. Plant.* 51: 167-170.
- Brown, S.L., Angle, J.S., Chaney, R.L. y Baker, A.J.M. 1995. Zinc and cadmium uptake by Thlaspi caerulescens and Silene vulgaris grown on sludge-amended soils in relation to total soil metals and soil pH. *Environ.Sci. Technol.* 29: 1581-1585.

- Burt, R., Fillmore, M., Wilson, M.A., Gross, E.R., Langridge, R.W. y Lammers, D.A. 2001. Soil properties of selected pedons on ultramafic rocks in Klamath Mountains, Oregon. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 32: 2145-2175.
- Chaney, R., Angle, R.S., Baker, A.J.M. y Li, Y.M. 1998. Method for phytomining of nickel, cobalt and other metals from soil. *Patent 5711784*.
- Chaney, R.L. 1983. Plant uptake of inorganic waste constituents. En: *Land Treatment of Hazardous Wastes*. (eds Parr, J.F., Marsh, P.B. y Kla, J.M.), pp. 50-76, Noyes Data Corp., Park Ridge, NJ .
- Chaney, R.L., Hornick, S.B. y Sikora, L.J. 1981a. Review and preliminary studies of industrial land treatment practices. En: *Proc. Seventh Annual Research Symposium on Land Disposal of Municipal Solid and Hazardous Waste and Resource Recovery*, pp. 200-212, EPA-600/9-81-002b.
- Chaney, R.L., Kaufman, S.B., Hornick, S.B., Parr, J.F., Sikora, L.J., Burge, W.D., Marsh, P.B., Willson, G.B. y Fisher, R.H. 1981b. Review of information relevant to land treatment of hazardous wastes. *Report to EPA-Solid and Hazardous Waste Research Division*, 476.
- Chaney, R.L., Li, Y.-M., Brown, S.L., Homer, F.A., Malik, M., Angle, J.S., Baker, A.J.M., Reeves, R.D. y Chin, M. 2000. Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: approaches and progress. En: *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. (eds Terry, N. y Bañuelos, G.), Lewis Publishers, Boca Raton, Florida,
- Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S. y Baker, A.J.M. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*. 8: 279-284.
- Cunningham, S.D. , Berti, W.R. y Huang, J.W. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *TIBTECH*. 13: 393-397.
- Galardi, F., Mengoni, A., Pucci, S., Barletti, L., Massi, L., Barzanti, R., Gabbrielli, R., Gonnelli, C. 2007. Intra-specific differences in mineral element composition in the Ni-hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*: A survey of populations in nature. *Environ. Exp. Bot.* 60: 50-56.
- Ghaderian, S.M., Mohtadi, A., Rahiminejad, M.R., Baker, A.J.M. 2007. Nickel and other metal uptake and accumulation by species of *Alyssum* (Brassicaceae) from the ultramafics of . *Environ. Poll.*145: 293-298.
- Homer, F.A., Reeves, R.D., Brooks, R.R., Baker, A.J.M. 1991. Characterization of the nickel-rich extract from the nickel hyperaccumulator *Dichapetalum gelanoides*. *Phytochem.* 30: 2141-2145.
- Kidd, P.S. y Monterroso, C. 2005. Metal extraction by *Alyssum serpyllifolium* ssp *lusitanicum* on mine-spoil soils from . *Sci. Total Environ.* 336: 1-11.
- Korcak, R. F. y Fanning, D. S. 1985. Availability of applied heavy metals as a function of type of soil material and metal source. *Soil Sci.* 140: 23-34.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., Smith, J.A.C. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379: 635-638.
- Kruckeberg, A.R. 1984. *California Serpentine: Flora, Vegetation, Geology, Soils and Management Problems*. University of California Press. Berkeley, California .
- Lee, J., Reeves, R.D., Brooks, R.R., Jaffré, T. 1977. Isolation and identification of a citrate-complex of nickel from nickel-accumulating plants. *Phytochem.* 16: 1503-1505.
- Lee, J., Reeves, R.D., Brooks, R.R., Jaffré, T. 1978. The relation between nickel and citric acid in some nickel-accumulating plants. *Phytochem.* 17: 1033-1035.
- Li, Y.M., Chaney, R.L., Brewer, E.P., Angle, J.S. y Nelkin, J. 2003. Phytoextraction of nickel and cobalt by hyperaccumulator *Alyssum* species grown on nickel-contaminated soils. *Environ. Sci. & Technol.* 37: 1463-1468.
- Lombi, E., Wenzel, W.W., Gobran, G.R. y Adriano, D.C. 2001. Dependency of phytoavailability of metals on indigenous and induced rhizosphere processes: a review. En: *Trace elements in the rhizosphere*. (eds Gobran, G.R., Wenzel, W.W. y Lombi,

E.), pp. 3-24, CRC Press, Boca Raton,

Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W.H., Cai, Y. y Kennelley, E.D. 2001. A fern that hyperaccumulates arsenic - A hardy, versatile, fast-growing plant helps to remove arsenic from contaminated soils. *Nature*. 409: 579-579.

McGrath, S.P., Shen, Z.G. y Zhao, F.J. 1997. Heavy metal uptake and chemical changes in the rhizosphere of Thlaspi caerulescens and Thlaspi ochroleucum grown in contaminated soils. *Plant Soil*. 188: 153-159.

McGrath, S.P. y Zhao, F.J. 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*. 14: 277-282.

McGrath, S.P., Zhao, F.J. y Lombi, E. 2002. Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. En: *Adv. Agron.* 75: 1-56.

Menezes de Sequeira, E. 1969. Toxicity and movement of heavy metals in serpentinic soils (north-eastern ). *Agronomía Lusitana*. 30: 115-154.

Menezes de Sequeira, E. y Pinto da Silva, A.R. 1992. Ecology of serpentized areas of north-east . En: *The ecology of areas with serpentized rocks. A world view.* (eds Roberts, B.A. y Proctor, J.), pp. 169-197.

Minguzzi, C. y Vergnano, O. 1948. Il contenuto di nichel nelle ceneri di Alyssum bertolonii. *Atti della Società Toscana di Scienze Naturale*. 55: 49-74.

Pelosi, P., Fiorentini, R. y Galoppini, C. 1976. Nature of nickel compounds in Alyssum bertolonii Desv. II. *Agric. Biol. Chem.* 4: 1641-1642.

Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 15-39.

Pollard, A.J. y Baker, A.J.M. 1997. Deterrence of herbivory by zinc hyperaccumulation in Thlaspi caerulescens (Brassicaceae). *New Phytol.* 135: 655-658.

Poschenrieder, C., Tolrà, R. y Barceló, J. 2006. Can metals defend plants against biotic stress? *TRENDS in Plant Sci.* 11: 288-295.

Proctor, J. 1971. Plant Ecology of Serpentine .3. Influence of a High Magnesium/Calcium Ratio and High Nickel and Chromium Levels in Some British and Swedish Serpentine Soils. *J. Ecol.* 59: 827-829.

Proctor, J. 1999. Toxin, nutrient shortages and droughts: the serpentine challenge. *Trends Ecol. Evol.* 14.

Puschenreiter, M., Schnepf, A., Millán, I.M., Fitz, W.J., Horak, O., Klepp, J., Schrefl, T., Lombi, E. y Wenzel, W.W. 2005a. Changes of Ni biogeochemistry in the rhizosphere of the hyperaccumulator Thlaspi goesingense. *Plant Soil*. 271: 205-218.

Puschenreiter, M., Wenzel, W.W., Wieshammer, G., Fitz, W.J., Wieczorek, S., Kanitsar, K. y Kollensperger, G. 2005b. Novel micro-suction-cup design for sampling soil solution at defined distances from roots. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*. 168: 386-391.

Puschenreiter, M., Wieczorek, S., Horak, O. y Wenzel, W.W. 2003. Chemical changes in the rhizosphere of metal hyperaccumulator and excluder Thlaspi species. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde*. 166: 579-584.

Roberts, B.A. y Proctor, J. 1992. *The Ecology of areas with serpentized rocks: a world view*. Kluwer. Dordrecht, .

Robinson, B.H., Chiarucci, A., Brooks, R.R., Petit, D., Kirkman, J.H., Gregg, P.E.H. y DeDominicis, V. 1997. The nickel hyperaccumulator plant Alyssum bertolonii as a potential agent for phytoremediation and phytomining of nickel. *J. Geochem. Exploration* 59: 75-86.

Roosens, N., Verbruggen, N., Meerts, P., Ximenez-Embun, P. y Smith, J.A.C. 2003. Natural variation in cadmium tolerance and its relationship to metal hyperaccumulation for seven populations of Thlaspi caerulescens from western Europe. *Plant Cell Environ.* 26: 1657-1672.

Salt, D.E., Smith, R.D. y Raskin, I. 1998. Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 643-668.

Vassilev, A., Schwitzguébel, J.-P., Thewys, T., van der Lelie, P. y Vangronsveld, J. 2004. The Use of Plants for Remediation of Metal-Contaminated Soils. *The Scientific World Journal* 4: 9-34.

Vergnano Gambi, O., Pancaro, L., Formica, C. 1977. Investigations on a nickel-accumulating plant *Alyssum bertolonii* Desv. I. Nickel, calcium and magnesium content and distribution during growth. *Webbia* 32: 175-188.

Wang, A.S., Angle, J.S., Chaney, R.L., Delorme, T.A., Reeves, R.D. 2006. Soil pH effects on uptake of Cd and Zn by *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 281: 325-33.

Wenzel, W.W., Bunkowski, M., Puschenreiter, M. y Horak, O. 2003. Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environ. Poll.* 123: 131-138.

Whiting, S.N., De Souza, M.P. y Terry, N. 2001. Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environ. Sci. Technol.* 35: 3144-3150.

Whiting, S.N., Reeves, R.D., Richards, D., Johnson, M.S., Cooke, J.A., Malaisse, F., Paton, A., Smith, J.A.C., Angle, J.S., Chaney, R.L., Ginocchio, R., Jaffre, T., Johns, R., McIntyre, T., Purvis, O.W., Salt, D.E., Schat, H., Zhao, F.J. y Baker, A.J.M. 2004. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. *Rest. Ecol.* 12: 106-116.

Zhao, F.J., Hamon, R.E. y McLaughlin, M.J. 2001. Root exudates of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* do not enhance metal mobilization. *New Phytol.* 151: 613-620.