

EVALUACIÓN DE TROMPILLO (*Solanum elaeagnifolium*) EN LA FITOEXTRACCIÓN DE PLOMO Y CADMIO EN SUELOS CONTAMINADOS

EVALUATION OF TROMPILLO (*Solanum elaeagnifolium*) FOR FITOEXTRACTION OF LEAD AND CADMIUM IN CONTAMINATED SOIL

Ricardo Trejo Calzada^{1*}, Oscar Esquivel Arriaga¹, Aurelio Pedroza Sandoval¹
Jesús Guadalupe Arreola Ávila¹, Arnoldo Flores Hernández¹,
José Ruiz Torres¹, Ricardo David Valdéz Cepeda^{2,3}

¹Universidad Autónoma Chapingo, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Apartado Postal No. 8. Carretera Gómez Palacio-Cd. Juárez Km 40. C.P. 35230 Bermejillo, Dgo., MÉXICO.

²Universidad Autónoma Chapingo, Centro Regional Universitario Centro-Norte. Cruz del Sur No. 100, Col. Constelación. Apdo. Postal 196, CP 98085, El Orito, Zacatecas, Zac., MÉXICO.

³Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Matemáticas. Cuerpo Académico de Sistemas Complejos. Paseo Solidaridad s/n. CP 98064, Zacatecas, Zac., MÉXICO.

*Autor responsable correo electrónico: rtrejo@chapingo.uruza.edu.mx

RESUMEN. La contaminación por metales pesados es uno de los problemas más serios de degradación ambiental. En la Región Lagunera de México se han detectado altas concentraciones de plomo en las inmediaciones de plantas metalúrgicas. La fitorremediación es una alternativa para extraer, contener, degradar o inmovilizar contaminantes del suelo. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad del trompillo (*Solanum elaeagnifolium*) de extraer plomo y cadmio de suelos contaminados al adicionar fertilización nitrogenada. Se estableció un experimento con un diseño experimental de bloques al azar con cuatro repeticiones. Se emplearon cinco concentraciones de nitrógeno (0, 50, 100, 150, 200 ppm) y tres variantes de contaminación de metales pesados (500ppm de Pb, 10ppm de Cd, 500ppm de Pb +10ppm de Cd). Se determinó la concentración de plomo y cadmio en hoja, tallo, raíz y fruto mediante espectrofotometría de absorción atómica a los 110 días después de la aplicación de los tratamientos. La concentración de plomo en los tejidos de la planta estuvo entre 3.83 y 6.92 ppm en tanto la concentración de cadmio varió de 0.21 a 0.32 ppm. No se encontraron diferencias significativas en la capacidad extractora de plomo y cadmio por efecto de la fertilización nitrogenada.

Palabras clave: metales pesados, fitorremediación, contaminación, fertilización nitrogenada

SUMMARY. Heavy metal contamination of soil and air is one of the gravest pollution problems. In the Lagunera region, three areas have been detected with a high content of heavy metals, resulting in a serious human health problem. In particular, high concentrations of lead have been detected around metal melting plants in Torreon, Coahuila and Bermejillo, Durango. Phytoremediation is one of several alternatives that have been used to extract, contain, degrade or immobilize heavy metal soil contaminants. However, there are insufficient studies about using plants adapted to arid areas for the establishment of sustainable phytoremediation soil programs. The aim of this study was to evaluate the capability of trompillo (*Solanum elaeagnifolium*) to extract lead and cadmium from contaminated soils. An experiment was set up using a randomized block experimental design with four replications. The treatments were the resulting combination of five nitrogen concentrations (0, 50, 100, 150, 200 ppm) and three contaminants (500ppm of Pb, 10ppm of Cd, 500ppm of Pb + 10ppm of Cd). The concentration of lead and cadmium was determined by atomic spectrophotometry in leaves, stems, roots and fruits 110 days after the treatment applications. The concentration of lead in plant tissues was relatively low, ranging from 4.585 to 9.620 ppm, while the mean for cadmium was 0.2448 ppm. No significant differences were found among the treatments regarding the ability to extract lead and cadmium resulting from nitrogen fertilization.

Key words: contamination, heavy metals, phytoremediation, nitrogen fertilization.

INTRODUCCIÓN

En México, los recursos naturales presentan una gran variabilidad de condiciones ambientales, propiciando un desarrollo de distintas formas de producción, que han

contribuido significativamente al deterioro ambiental (Licona *et al.*, 1994). La contaminación es un cambio no deseado en las características físicas, químicas o biológicas del entorno natural. La contaminación por metales pesados en los suelos es uno de los problemas

más serios de degradación ambiental, ya que pueden ser absorbidos por las plantas y parte de ellos translocados en animales y personas en la cadena alimenticia provocando toxicidad (Sauerbeck, 1982).

Hay evidencia que el plomo (Pb) y el cadmio (Cd) han sido causa de efectos en la salud humana, en los animales y el disturbio de ecosistemas naturales (Valdez-Cepeda *et al.*, 2006). En la Región Lagunera de México se han detectado y reportado áreas contaminadas con metales pesados en suelo y aire que repercuten en un problema serio en la salud humana interfiriendo el desarrollo del sistema neurológico, causando crecimiento retardado y problemas digestivos, en casos extremos causa convulsiones, colapsos e incluso la muerte. Estudios recientes revelan altas concentraciones de plomo en suelo y plantas en áreas aledañas a la planta metalúrgica en Bermejillo, Dgo. (Trejo *et al.*, 2007), representando un alto riesgo para la población de toda la zona urbana dado que el polvo contaminado se esparce fácilmente por el viento.

Indudablemente son necesarias medidas que eviten o reduzcan la presencia de plomo en suelo y por lo tanto reduzcan los riesgos para la salud de los habitantes de la comunidad. Una de las alternativas es la fitorremediación, sin embargo, los ecosistemas desérticos son frágiles y delicados, y la introducción de especies de plantas no adaptadas a este tipo de ambientes con fines de fitorremediación en suelos con metales pesados, puede ser perjudicial para estos ecosistemas, al haber un desplazamiento de las especies nativas por las especies introducidas.

Por ello, nuevos métodos de remediación, necesitan ser investigados, utilizando plantas nativas del desierto como un método alternativo (Sias *et al.*, 1998). El uso de plantas como alternativa para la extracción de metales pesados como el plomo (Pb), cadmio (Cd) y arsénico (As), puede ser auxiliada con medidas de manejo agronómico para hacer más eficiente el proceso (Cunningham y Ow, 1996). En este estudio se propuso evaluar el fertilizante nitrogenado fosfonitrato como coadyuvante en la capacidad fitoextractora del trompillo *Solanum elaeagnifolium* para reducir los niveles de plomo y cadmio en suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y siembra de semilla

La semilla de trompillo se colectó de plantas silvestres del área de Bermejillo. Una vez seleccionada la semilla se dejó secar a temperatura ambiente, fue guardada en un frasco grande de vidrio, bien cerrado. Posteriormente fue sembrada en vasos de unicel de un volumen de 250cc, colocando dos semillas en cada vaso, para un

total de 100 vasos, dejando solo una plántula por vaso. Se evaluó el porcentaje de germinación.

Colecta y análisis de suelo.

Para la colecta se hizo un muestreo de 20 muestras simples de suelo en el estrato de 0 a 30 cm en un área alejada aproximadamente 4 km de la planta metalúrgica. Las muestras simples se combinaron para obtener una muestra compuesta de 4 kg. La muestra compuesta, se puso a secar en papel en laboratorio a medio ambiente por una semana, la muestra seca se homogenizó mediante molido con un rodillo de madera, se seleccionó la muestra de suelo seca, por el método del cuarteo, y posteriormente se paso por un tamiz de 2 mm de diámetro, y finalmente se realizó el análisis físico-químico y metales pesados. Posteriormente la preparación de las muestras de suelo para determinación de plomo y cadmio total en el espectrofotómetro de absorción atómica (EAA) (Modelo Perkin-Elmer 2380).

Para la determinación de plomo y cadmio total a 10 g de suelo se les agregaron 50 ml de ácido nítrico 4 M como solución extractora, se colocaron en baño maría por cuatro horas a 70°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después de agitación durante una hora se filtró y se llevó a lectura en EAA.

Diseño experimental

Se estableció un experimento con trompillo, en un diseño de bloques completamente al azar con dos factores y cuatro repeticiones, el primer factor fue la adición de los metales pesados Pb y Cd en los siguientes niveles: Pb 500 ppm, Cd 10 ppm, Pb 500 ppm + Cd 10 ppm. El segundo factor fue la dosis nitrogenada utilizando fosfonitrato (33-03-000) con 5 niveles (0, 50, 100, 150 y 200 ppm N Kg⁻¹ de suelo). La unidad experimental estuvo constituida por una maceta con 7 kg de suelo. La fuente de plomo fue el nitrato de plomo Pb (NO₃)₂, y la de cadmio fue el cloruro de cadmio Cd(Cl)₂. Los metales fueron agregados en solución acuosa a los 10 días después del transplante una vez establecido el experimento.

Variables evaluadas

En este estudio se evaluaron las variables de tasa fotosintética, peso fresco, peso seco y concentración de plomo y cadmio en raíz, tallo y hoja. Para la determinación de la tasa fotosintética (μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) del trompillo se utilizó un medidor portátil de fotosíntesis LICOR LI6400, con una concentración constante de CO₂ de referencia (400 μmol) utilizando una fuente externa de este gas y el flujo de aire se ajustó a 400 μmol s⁻¹.

A los 110 días de la aplicación de metales pesados y a los 100 días de la fertilización nitrogenada se cosechó hoja, tallo y raíz de las plantas de trompillo para determinar peso fresco, peso seco y la concentración de Pb y Cd. Las muestras secas se molieron en mortero hasta obtener un polvo fino, el cual se sometió a digestión ácida para determinar la concentración de plomo y cadmio de acuerdo al método de la EPA 200.3. Se pesaron 0.5 g de cada una de las muestras y se colocaron en matraces de 250ml, se le agregaron 10 ml de mezcla digestora de ácido nítrico (HNO_3) y ácido perclórico (HClO_4) en una relación 3:2. Las muestras se colocaron en una plancha de calentamiento aproximadamente durante 20 minutos hasta quedar la digestión de un color transparente. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se filtraron con papel Whatman N° 40 y se aforó a 100 ml con agua tridestilada. Posteriormente, se prepararon sub-muestras colocando 2 ml del extracto y 8 ml de agua tridestilada para hacer las lecturas en el EAA por triplicado (Martin *et al.*, 1994).

Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa STATISTICA Kernel release 7.0 (Stat soft Inc., 2004). También se utilizó el paquete estadístico SAS Versión 9.0 (Institute Inc., Cary NC, USA, 2002), para realizar un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias para los datos de fotosíntesis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tasa fotosintética

La medición de la fotosíntesis se llevó a cabo en una hora aproximadamente entre las 1300 y las 1410, por lo que hubo variaciones en la radiación solar. Por tal razón y con el propósito de eliminar el efecto de las variaciones de temperatura y radiación solar se realizó una transformación de los datos observados de fotosíntesis a residuales (Draper y Smith; 1981; Neter *et al.*; 1985). En la Figura 1A, se identifica una tendencia lineal positiva con una prueba de normalidad de los

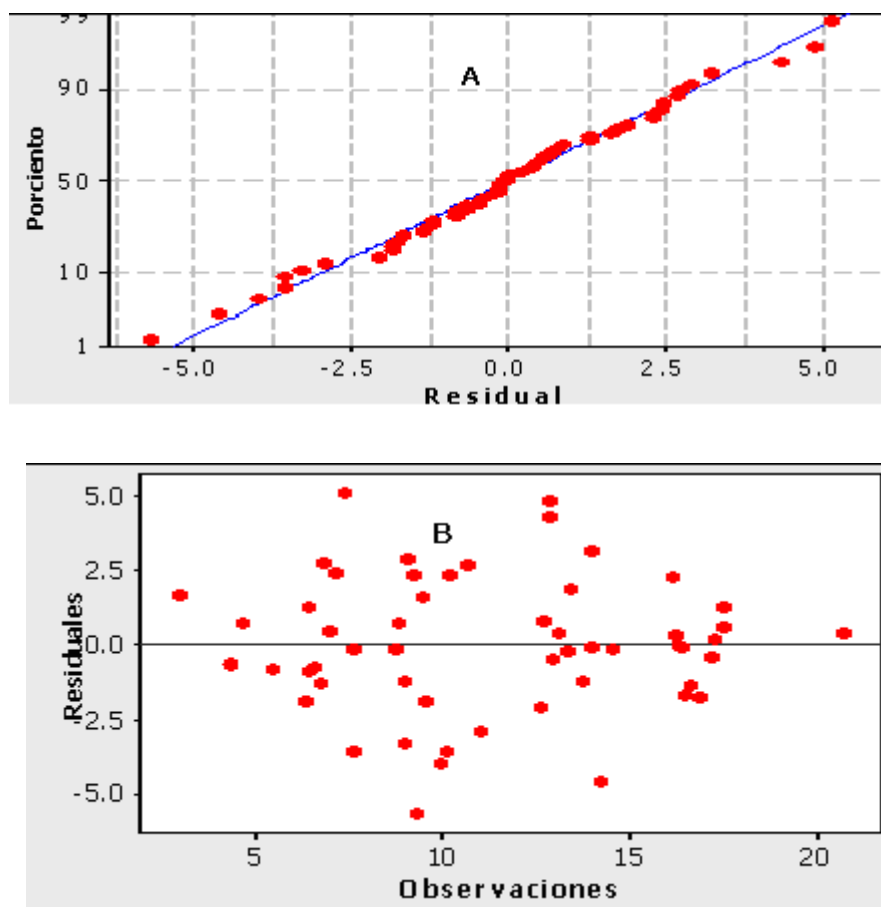


Figura 1. Residuales de los datos de fotosíntesis **A.** Prueba de normalidad de los residuales de fotosíntesis en plantas de trompillo bajo diferentes concentraciones de plomo. **B.** Modelo lineal ajustado a cero de los residuales de tasa fotosintética de trompillo en diferentes concentraciones de plomo.

residuales. Además, en la Figura 1B, se observa que los datos de los residuales tienen un excelente ajuste al modelo lineal. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la fotosíntesis de las plantas de trompillo en los tratamientos de fertilización nitrogenada y presencia de metales pesados.

Las tasas máximas de fotosíntesis se producen cuando los niveles de luz se encuentran entre 400 y 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y a partir de 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se produce por lo general un descenso en la tasa de fotosíntesis por fotoinhibición (Quero *et al.*, 2004). Además se sabe que la tasa fotosintética de plantas C₃ disminuye cuando las temperaturas son altas y que en esas condiciones se incrementa la fotorrespiración. El trompillo se clasifica como una planta C₃, lo que podría explicar la tasa promedio de fotosíntesis relativamente baja (11.13 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en trompillo obtenida en este estudio, dado que las mediciones se llevaron a cabo en temperatura superior a los 30°C. Sin embargo, Sage (2002) ha reportado que las plantas adaptadas a ambientes cálidos pueden poseer una variante de RUBISCO con una mayor afinidad por el CO₂ que les permite una mayor tasa fotosintética en altas temperaturas comparada con la observada en plantas C₃ adaptadas a lugares templados o fríos.

Materia seca

Para el análisis de la materia seca del total de la planta, se sumó la materia seca de raíz, tallo y hojas. Se encontraron diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$) entre tratamientos. Al analizar el efecto de las diferentes dosis de N, y las diferentes concentraciones de los metales por separado se observaron diferencias altamente significativas ($P < 0.005$ y $P < 0.0001$, respectivamente). La interacción dosis nitrogenada con concentraciones de metal no fue significativa ($P > 0.05$). La presencia de plomo en el sustrato disminuyó significativamente la acumulación de materia seca total en trompillo (Cuadro 1) Esto pudiera deberse a efectos de toxicidad o a efectos osmóticos por la mayor concentración del metal en los tejidos de la planta.

En la Figura 2 se muestra la relación que existe entre la acumulación de MS y el efecto que tiene la dosis nitrogenada. El testigo produjo significativamente mayor cantidad de materia seca total comparada con las plantas a las que les fue añadido nitrógeno. La raíz fue el órgano de la planta de trompillo en donde se acumuló mayor cantidad de materia seca, particularmente en los tratamientos a los que se les adicionó nitrógeno. La acumulación de materia seca en hoja y tallo no fue afectada significativamente ($P > 0.05$) por la adición de fertilizante nitrogenado.

Estos resultados podrían atribuirse a la condición natural que guardan las malezas y una probable ausencia de respuesta al nitrógeno en las concentraciones empleadas. Rodríguez-Ortiz *et al.* (2006), reportan altos niveles de plomo y un incremento en la acumulación de materia seca en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum L.*), por efecto de la dosis nitrogenada con nitrato de amonio.

Acumulación de plomo

Las dosis de nitrógeno no tuvieron efectos significativos sobre la acumulación de plomo en la planta de trompillo. Tampoco hubo interacción significativa entre las dosis de nitrógeno y las concentraciones de metales pesados ($P < 0.1893$ y $P < 0.3434$, respectivamente).

En la Figura 3, se muestra la relación que existe entre la concentración de plomo y la dosis nitrogenada a la que fue sometido cada tratamiento, donde se identifica que no hay diferencias significativas por efecto de la dosis nitrogenada. Sin embargo, el tratamiento con 50 ppm de N tuvo la máxima acumulación de Pb en planta total con 6.42 ppm. Se observa que la acumulación de plomo ocurrió de manera creciente de la raíz a la hoja. Esto podría tener una explicación por la alta solubilidad del Pb(NO₃)₂ y un probable rápido transporte a la parte aérea de la planta. Sin embargo, los resultados contrastan con los obtenidos por Sias *et al.* (1998) quienes encontraron en condiciones in situ concentraciones de plomo en raíz, tallo y hoja de

Cuadro 1. Análisis del factor Concentración de Metal Pesado y su efecto en la acumulación de MS en planta total.

Concentración de Pb (ppm)	Concentración de Cd (ppm)	Media MS planta total (g)
0	10	4.7 a
500	10	2.9 b
500	0	2.7 b

Cifras con las mismas letras dentro de una misma columna, son estadísticamente iguales. Prueba de rango múltiple de medias Tukey $\alpha = 0.05$.

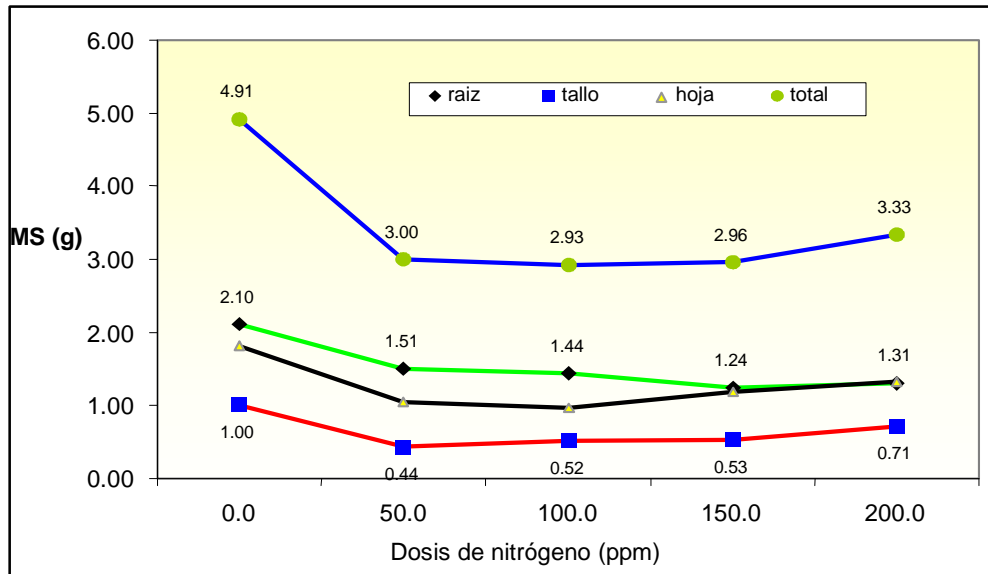


Figura 2. Producción de materia seca (g) en órganos de la planta de trompillo con las Dosis de N (0, 50, 100, 150 y 200 ppm)

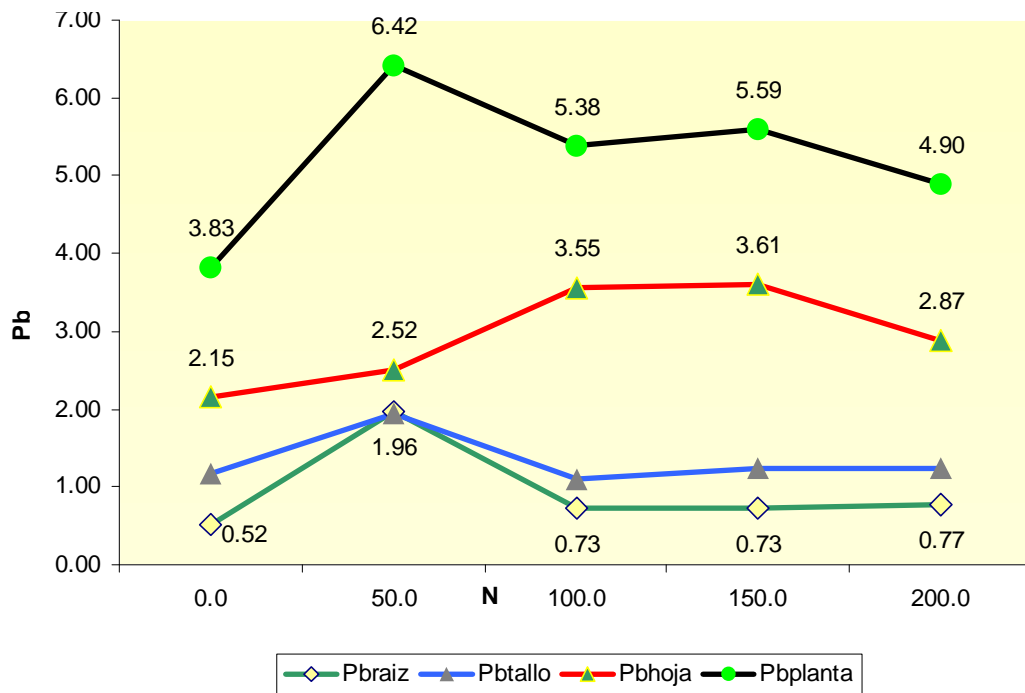


Figura 3. Acumulación de Pb en ppm en los órganos de la planta trompillo en diferentes concentraciones de nitrógeno agregado como fertilizante.

Solanum elaeagnifolium de 1875, 97 y 380 ppm, respectivamente. Igualmente, Trejo *et al.*, (2007), reportan valores de concentraciones de plomo en plantas de trompillo (*Solanum elaeagnifolium*) in situ entre 92.75 y 134 ppm.

El plomo en forma in situ regularmente se encuentra en formas poco solubles y con escasa movilidad por lo

que su mayor acumulación puede ocurrir en la raíz (Sias *et al.*, 1998). La fuente de plomo empleada en este estudio $[Pb(NO_3)_2]$ es muy soluble por lo que es factible que se incorpore rápidamente al flujo de transpiración de la planta y por ende se acumule más en las hojas, provocando efectos nocivos por toxicidad o por estrés osmótico.

La presencia de plomo en el sustrato provocó diferencias significativas en la acumulación de plomo en tallo y hojas (Cuadro 2), lo cual indica que la absorción del metal tiene una relación directa con la presencia de éste en el medio de crecimiento de la planta.

Acumulación de cadmio

Para el análisis de acumulación de Cd en planta de trompillo, el resultado no mostró diferencias significativas ($P > 0.3558$). El análisis permitió identificar que entre bloques, dosis de N, concentración del metal y la interacción Dosis de N*Concentración del Metal no hubo diferencias significativas ($P > F$ 0.6954, 0.1802, 0.9682 y 0.2251, respectivamente).

En la Figura 4, se muestra la relación que existe entre la concentración de cadmio y la dosis nitrogenada a la que fue sometido cada tratamiento. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos de dosis nitrogenada. Sin embargo, sobresalió el tratamiento de 50 ppm de N por kilogramo de suelo para la acumulación de Cd en planta total, con 0.32ppm de Cd acumulado. El órgano vegetal de la planta trompillo acumuló ligeramente más Cd fue la hoja con un rango de 0.07008 a 0.118 ppm de Cd.

Los resultados de este experimento muestran que la acumulación de cadmio esta dada de manera creciente de menor acumulación a mayor acumulación comenzando por la raíz, tallo y hoja, esto podría deberse a que el proceso de transpiración de la planta tiene un efecto de arrastre del metal en forma ascendente por ello esta acumulado mayormente en la hoja. En otras especies (*Armeria maritima* ssp. *Halleri*, *Cardaminopsis halleri* y *Agrostis tenuis*) se ha encontrado que la mayor acumulación de Pb, Cd, Cuy Zn ocurre en las raíces como una estrategia de inmovilización de los metales. Igualmente algunas hojas que acumularon altas concentraciones de plomo se tornaron de color café y cayeron, lo que se asocia con un mecanismo de detoxificación por caída de hojas (Dahmani-Muller et al., 2000) . Asimismo, en trigo se encontró que la

acumulación de Cd ocurrió en un gradiente raíz>Hoja>tallo (Hart, 1998).

La hiperacumulación de cadmio no es frecuente en plantas superiores. Se han identificado solo algunas especies como *Thlaspi caerulescens* que pueden acumular 100 mg kg⁻¹ de peso seco (Baker et al., 2000). Debido a sus propiedades similares se ha propuesto que el Cd y el Zn pueden ser absorbidos y translocados por vías similares (Grant et al., 1998) La habilidad de *T. caerulescens* de acumular Cd se ha considerado hasta ahora como un actividad lateral de un mecanismo de hiperacumulación para Zn que es un metal químicamente relacionado (Kramer, 2000).

Las altas concentraciones de metales tales como plomo, cadmio, y níquel que amenazan los recursos para la supervivencia del ser humano. Estas concentraciones elevadas de metales pesados pueden bioacumularse, tanto en agua para riego agrícola, aire, carne animal y productos lácteos (Sias et al., 1998). La bioacumulación es fácilmente alcanzable debido al hecho de que la mayoría de estos metales tienen estados múltiples de la oxidación y por lo tanto diversas toxicidades.

CONCLUSIONES

No hubo diferencias significativas en la tasa fotosintética de plantas de trompillo por efecto de la aplicación de metales pesados (Pb y Cd) o fertilización nitrogenada al suelo.

La dosis de fertilización nitrogenada no indujo una mayor producción de materia seca y las plantas testigo produjeron significativamente mayor cantidad de materia seca.

La fertilización nitrogenada no tuvo efecto sobre la acumulación de plomo o cadmio en los órganos de trompillo.

La adición de plomo al sustrato provocó una significativa acumulación del metal raíz, tallos y hojas de trompillo, lo que podría indicar un potencial fitoextractor de plomo de esta especie.

La presencia de 10 ppm de cadmio en el suelo no tuvo efecto significativo sobre la acumulación del metal en raíz, tallo y hoja de trompillo.

Cuadro 2. Concentración de plomo en tallo y hoja de trompillo crecido en diferentes concentraciones de plomo y cadmio en el suelo.

Concentración de Pb (ppm)	Concentración de Cd (ppm)	Concentración de Pb en tallo (ppm)		Concentración de Pb en hoja (ppm)
500	0	1.7	a	4.4 a
500	10	1.4	ab	3.5 a
0	10	0.8	b	0.9 b

Cifras con las mismas letras dentro de una misma columna, son estadísticamente iguales. Prueba de rango múltiple de medias Tukey α d"0.05

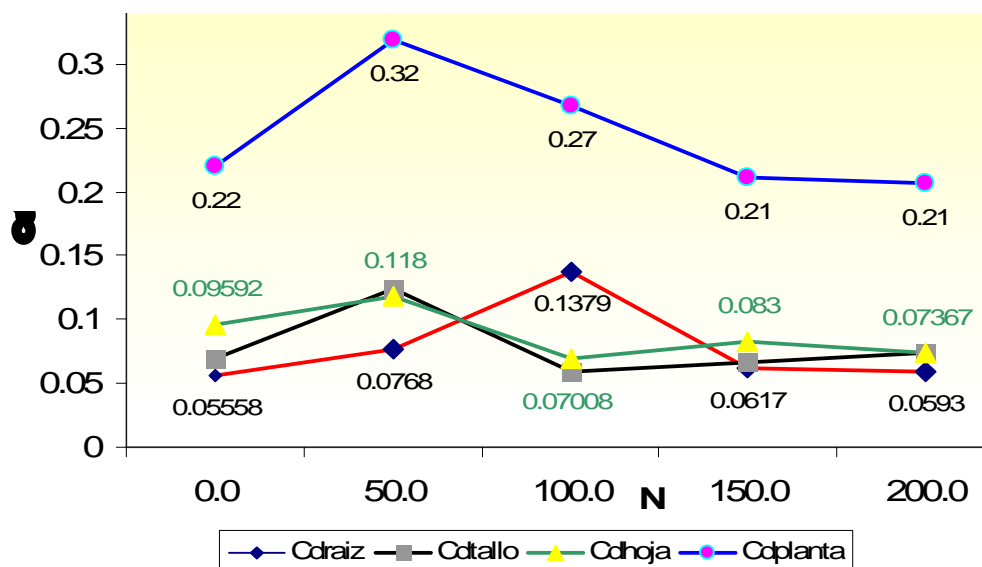


Figura 4. Acumulación de Cd en órganos de trompillo crecido en diferentes concentraciones de nitrógeno como fertilizante

LITERATURACITADA

- Baker, A.J.M.; McGrath, S.P.; Reeves, S.D.; Smith, J.A.C. 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biochemical resource for metal phytoremediation of metal polluted soils. In: Phytoremediation of contaminated soil and water. Terry, N.; Bañuelos, G.; Eds. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida USA. 85-107.
- Cunningham, S.D.; Ow, D.W. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology* 110:715-719.
- Dahmani-Muller, H.; van Oort, F.; Gélie, B.; Balabane, M. 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution* 109(2):231-238.
- Draper, N.R.; Smith, H. (1981). *Applied Regression Analysis*, Second Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Sage, R.F. 2002. Variation in the k_{cat} of Rubisco in C3 and C4 plants and some implications for photosynthesis at high and low temperature. *Journal of Experimental Botany* 53(369):609-620.
- Hart, J.J.; Welch, R.M.; Norvell, W.A.; Sullivan, L.A.; Kochian, L.V. 1998. Characterization of cadmium binding, uptake and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat. *Plant Physiology* 116:1413-1420.
- Kramer, U. 2000. Cadmium for all meals, plants with an unusual appetite. *New Phytol.* 145:1-5.
- Licon V., A.; Duch G., J.; Larios R., J. 1994. Aprovechamiento de los recursos naturales en la agricultura mexicana. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección de Centros Regionales. Programa de Recursos Naturales y Agricultura. Chapingo, México.
- Neter, J.; Wasserman, W.; Kutner, M. 1985. *Applied Linear Statistical Models*. Richard D. Irwin, Inc.
- Quero J., L.; Marañón, T., Villa, R., 2004. Tasas de fotosíntesis en plántulas de alcornoque y roble en distintos micrositios dentro del sotobosque. Área de Ecología, Universidad de Córdoba Dpto. Biología Animal y Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada IRNA, CSIC.
- Sauerbeck, D. (1982) Welche Schwermetallgehalte in Pflanzen dürfen nicht überschritten werden, um Wachstumsbeeinträchtigung zu vermeiden? *Landwirtsch Forsch Sonderheft* 39:105-129
- Sias, S.; Gardea-Torresdey, J.; James, S.; Webb, R. 1998. Survey of northern chihuahuan desert plants for phytoremediation potential. Thesis M.Sc. The University of Texas At El Paso. USA.
- ATSOFT, INC. 2000. STATISTICA for Windows (Computer program manual). Tulsa, OK 74104.
- Martin, T.D.; Creed, J.T.; Brockhoff. 1994. Sample Preparation Procedure for Spectrochemical Determination of Total Recoverable Elements. U. S.
- Environmental Protection Agency. Revision 2.8 EMMC Version 12 p.
- Trejo C., R.; García O., C. N.; Arreola A., J. G., Flores H., A. 2007 Determinación espacial de las concentraciones de plomo en suelo y vegetación del área de Bermejillo, Dgo. En: Oportunidades y retos de la ingeniería agrícola ante la globalización y el cambio climático. Universidad Autónoma Chapingo. México. 120-129.
- Rodríguez-Ortiz, J. C.; Valdez-Cepeda, R. D.; Lara-Mireles, J. L.; Rodríguez Fuentes, H.; Vázquez-Alvarado, R. E.; Magallanes-Quintanar, R.; García-Hernández, J.L. 2006. Soil nitrogen fertilization effects on phytoextraction of cadmium and lead by tobacco (*Nicotiana tabacum L.*). *Bioremediation Journal*. 10(3): 105-114.