



Universidad
Complutense
Madrid



Universidad
Rey Juan Carlos



Eficacia del uso de nanopartículas de Fe(0) en la inmovilización de Cu y Ni en un suelo ácido

MASTER UNIVERSITARIO EN RESTAURACIÓN DE ECOSISTEMAS

Presentado por:

D^a MARÍA ALISA ALVAREZ

Tutor director:

Dra. M^a CARMEN LOBO BEDMAR

Dra. M^a DEL MAR GIL DÍAZ

Tutor Académico:

Dr. ALBERTO MASAGUER

Madrid, a 22 de septiembre de 2017

Dra. M^a CARMEN LOBO BEDMAR y Dra. M^a DEL MAR GÍL DÍAZ

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado: "Eficacia del uso de nanopartículas de Fe(0) en la inmovilización de Cu y Ni en un suelo ácido", ha sido realizado bajo nuestra dirección por la alumna D^a MARÍA ALISA ALVAREZ.

En MADRID, 22 de septiembre 2017.



Fdo: Dra. M^a Carmen Lobo Bedmar



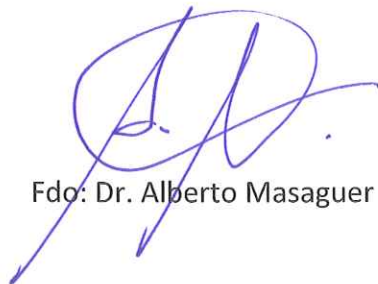
Fdo: Dra. M^a del Mar Gil Díaz

Dr. ALBERTO MASAGUER RODRIGUEZ

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado: "Eficacia del uso de nanopartículas de Fe(0) en la inmovilización de Cu y Ni en un suelo ácido", ha sido realizado bajo mi tutorización académica por la alumna D^a MARÍA ALISA ALVAREZ.

En MADRID, 22 de septiembre 2017.



Fdo: Dr. Alberto Masaguer Rodriguez

**FORMULARIO DE AUTORIZACIÓN PARA LA INCLUSIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE MASTER EN
LOS ARCHIVO ABIERTOS INSTITUCIONALES DE LAS UNIVERSIDADES QUE IMPARTEN LA
TITULACIÓN**

TÍTULO DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER:

“Eficacia del uso de nanopartículas de Fe(0) en la inmovilización de Cu y Ni en un suelo ácido”

1.- ESTUDIANTE (AUTOR)

APELLIDOS Y NOMBRE: Alvarez, María Alisa	Pasaporte: 33051226N
TITULACIÓN: MASTER UNIVERSITARIO EN RESTAURACIÓN DE ECOSISTEMAS	

2.- TUTOR DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

APELLIDOS Y NOMBRE: Dra. M ^a CARMEN LOBO BEDMAR Dra. M ^a DEL MAR GÍL DÍAZ	DNI: 05231809E 20266582V
DEPARTAMENTO O INSTITUCIÓN: IMIDRA (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario)	


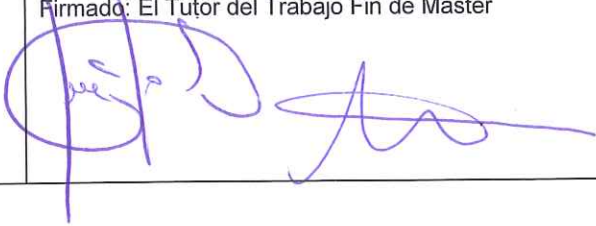
Los abajo firmantes:

AUTORIZAN

NO AUTORIZAN

El depósito y puesta a disposición del Trabajo Fin de Máster en los Repositorios Institucionales de las Universidades que imparten la titulación, de acceso libre y gratuito a través de Internet, y otorgando las condiciones de uso de la licencia Creative Commons *reconocimiento-uso no comercial-sin obra derivada*.

Más información en: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es>

Firmado: El Autor 	Firmado: El Tutor del Trabajo Fin de Máster 
--	---

RESUMEN

La utilización de nanopartículas de Fe(0) (nZVI) es una tecnología emergente de utilidad para inmovilizar in situ metales pesados en suelo reduciendo su movilidad y biodisponibilidad. En este estudio se evaluó la eficacia de la aplicación de una suspensión comercial de nZVI a dosis del 1 y 5% en la inmovilización de Cu y Ni, en un suelo ácido contaminado con cada metal de forma individual y con ambos metales de manera simultánea. Se evaluó el efecto de la aplicación de las nZVI en las propiedades fisicoquímicas y el impacto en la fitotoxicidad del suelo.

Se obtuvieron mejores resultados para Ni que para Cu siendo la dosis del 5% la más efectiva en la inmovilización, alcanzando reducciones del potencial de lixiviación de alrededor del 25% para el Cu y 48% para el Ni. La extracción secuencial mostró una disminución significativa de Cu y Ni en las fracciones fácilmente disponibles y un incremento en la fracción de óxidos principalmente. La aplicación de nZVI supuso un aumento del Fe lixiviable en el suelo. El tratamiento redujo moderadamente la bioaccesibilidad del Ni. La presencia de Cu disminuyó la efectividad de las nZVI para inmovilizar Ni, por el contrario el Ni influyó en menor medida en la inmovilización de Cu. No se observaron efectos negativos en las propiedades fisicoquímicas del suelo. La inmovilización del Ni redujo la fitotoxicidad del suelo en la germinación de *Medicago sativa* y *Vicia sativa*.

Teniendo en cuenta estos resultados se puede concluir que el empleo de nZVI para la inmovilización de Ni es un método prometedor para la remediación de suelos ácidos contaminados con este metal. Respecto al Cu, el tratamiento presentó una eficacia limitada en las condiciones ensayadas. Serían necesarios estudios posteriores que evalúen otras dosis de nZVI, así como la estabilidad de la inmovilización a largo plazo.

Palabras clave: suelo, metales pesados, contaminación, nZVI, biodisponibilidad, nanorremediación.

ABSTRACT

The use of nanoscale zero-valent iron (nZVI) is an emerging technology useful for immobilizing heavy metals in situ in soil, reducing their mobility and bioavailability. This study evaluated the efficacy of applying a commercial suspension of nZVI at doses of 1 and 5% for Cu and Ni immobilization, in an acidic soil contaminated with each metal individually and both metals simultaneously. The effect of the application of nZVI on physico-chemical properties and the impact on soil phytotoxicity were evaluated.

Better results were obtained for Ni than for Cu, being the dose of 5% the most effective. Reductions in the leaching potential of around 25% for Cu and 48% for Ni were achieved. Sequential extraction showed a significant decrease of Cu and Ni in readily available fractions and an increase in the oxide fraction mainly. The application of nZVI resulted in an increase in leachable Fe in the soil. The treatment moderately reduced the bioaccessibility of Ni. The presence of Cu decreased the effectiveness of nZVI to immobilize Ni, whereas Ni had less influence on the Cu immobilization. No negative effects on the physico-chemical properties of the soil were observed. Immobilization of Ni reduced soil phytotoxicity in the germination of *Medicago sativa* and *Vicia sativa*.

Based on these results it can be concluded that the use of nZVI for Ni immobilization is a promising method for remediation of acidic soils contaminated with Ni. For Cu, the treatment had limited efficacy under the tested conditions. Further studies evaluating other doses of nZVI and the stability of the immobilization at long-term would be necessary.

Key words: soil, heavy metals, contamination, nZVI, bioavailability, nanoremediation.

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	<i>Problemática de contaminación de suelos con metales pesados</i>	1
1.2	<i>Níquel. Fuente de contaminación, niveles de referencia, efectos en la salud y medio ambiente</i>	2
1.3	<i>Cobre. Fuente de contaminación, niveles de referencia, efectos en salud y medio ambiente</i>	4
1.4	<i>Tecnologías de descontaminación de suelos. Nanorremediación.</i>	5
2.	OBJETIVO GENERALES Y ESPECÍFICOS	8
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1	<i>Suelo</i>	8
3.2	<i>Propiedades fisico-químicas</i>	9
3.2.1	<i>pH y conductividad eléctrica (CE)</i>	9
3.2.2	<i>Materia orgánica oxidable</i>	9
3.2.3	<i>Nitrógeno total</i>	10
3.2.4	<i>Fósforo asimilable</i>	10
3.2.5	<i>Macronutrientes asimilables (Ca, Mg, Na y K)</i>	10
3.2.6	<i>Textura</i>	11
3.2.7	<i>Concentración de metales totales en suelo</i>	11
3.3	<i>Contaminación del suelo</i>	12
3.4	<i>Nanopartículas de Fe(0)</i>	13
3.5	<i>Ensayos de inmovilización de Cu y Ni con nZVI</i>	13
3.6	<i>Evaluación de la efectividad en la inmovilización</i>	14
3.6.1	<i>Lixiviación de metales según el test TCLP (Toxicity Characteristic Leaching Procedure) (US-EPA, 1992)</i>	14
3.6.2	<i>Extracción secuencial de metales según Tessier et al. (1979)</i>	15

3.6.3	<i>Bioaccesibilidad de los metales mediante el método IVBA (In vitro bioaccessibility assay for lead in soil) (US-EPA, 2013)</i>	16
3.6.4	<i>Test de fitotoxicidad: índice de germinación</i>	17
3.7	<i>Análisis estadístico</i>	17
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1	<i>Inmovilización de Cu y Ni en el suelo</i>	18
4.2	<i>Disponibilidad de hierro</i>	25
4.4	<i>Impacto sobre las propiedades físico-químicas del suelo</i>	28
4.5	<i>Impacto en la fitotoxicidad de los suelos</i>	31
5.	CONCLUSIONES	34
6.	AGRADECIMIENTOS.....	35
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	36

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Problemática de contaminación de suelos con metales pesados

La contaminación es un problema global que afecta a todos los componentes del ambiente - suelos, agua, aire y seres vivos- ya que al estar interconectados entre sí, lo que sucede en uno repercute o se transfiere de algún modo a los demás (Cardona García, 2012). Particularmente, la contaminación del suelo es una de las mayores preocupaciones entre las amenazas a los recursos del suelo en Europa y en todo el mundo, estando expresado en la propuesta de Directiva de protección del suelo del Parlamento Europeo COM (2006)/231 de septiembre de 2006.

Los metales pesados, junto con los aceites minerales, son los contaminantes más frecuentes en suelos europeos (Tóth et al., 2016). Las fuentes de estos contaminantes en el medio ambiente son difíciles de identificar, ya que podrían ser una combinación de fuentes naturales y antropogénicas, tanto difusas como puntuales (Bayen, 2012). Las fuentes antropogénicas de contaminación por metales pesados están relacionadas con el uso intensivo de aguas residuales para riego, lodos de depuradora, plaguicidas, insecticidas, emisiones de escape de vehículos, efluentes industriales, minería y fundición (Kabata-Pendias, 2011; Nicholson et al., 2003; Shi et al., 2009; Sipter et al., 2008), incluso los productos farmacéuticos pueden contener metales pesados como impurezas inorgánicas (Andreu et al., 2016).

El suelo contaminado con metales pesados afecta negativamente a todo el ecosistema (Satpathy et al., 2014). Debido a su no degradabilidad, toxicidad, persistencia y capacidad de lixiviación, los metales pesados son especialmente preocupantes en cualquier sistema ambiental (Kabata-Pendias 2011; Kumar et al., 2017; Zou et al., 2017). La acumulación de metales pesados en el ambiente terrestre se ha convertido en un problema global (Li et al., 2014; Tóth et al., 2016) ya que, la exposición continua de la biota da como resultado la acumulación de metales pesados en los tejidos de los

organismos, y a su vez, el aumento de la concentración de metales acumulados en cada nivel trófico sucesivo (Abbasi et al., 2015). Esta situación representa inevitablemente amenazas obvias para los seres humanos por las potenciales consecuencias graves para la salud (Zhang et al., 2015).

En el ser humano, se sabe que la exposición crónica a metales pesados y metaloides, incluso a niveles relativamente bajos, puede causar efectos adversos (Qu et al., 2012) debido a su potencial para acumularse en diferentes partes del cuerpo (Khan et al., 2010). Los metales pesados pueden producir efectos tóxicos, como la carcinogenicidad, la mutagenicidad y la teratogenicidad (Qu et al., 2012). Estas sustancias podrían llegar a los seres humanos a través de diversas vías: contacto dérmico, a través de la cadena de suelo-alimentos y la inhalación (Zhang et al., 2015).

La biodisponibilidad de los metales es un factor clave para determinar el riesgo para las plantas y otros organismos del suelo (Adriano, 2001). Se refiere a la fracción química biológicamente disponible que puede ser absorbida por un organismo y puede reaccionar con su maquinaria metabólica. Para que un metal sea biodisponible, tendrá que ser móvil y transportarse a través de una membrana y estar en una forma accesible para los organismos (Bolan et al., 2013). La biodisponibilidad y la movilidad dependen de las propiedades físicas y químicas del suelo, de la especiación del metal y del organismo biológico (Vangronsveld y Cunningham, 1998).

1.2 Níquel. Fuente de contaminación, niveles de referencia, efectos en la salud y medio ambiente

El níquel (Ni) se libera al ambiente durante la combustión del petróleo y del carbón, el refinado de metales, la fabricación y rectificado de aleaciones de Ni, la fabricación de baterías, la galvanoplastia y la fabricación de acero inoxidable, así como del humo del cigarrillo y las emisiones de los vehículos motorizados (Adriano, 2001; Andrew et al. 2003). La generación de polvo producto de la explotación minera de Ni también es una fuente de emisión a la atmósfera (Pasquet et al., 2016).

Aunque el Ni es tóxico para organismos a niveles elevados, se requieren trazas de este elemento para varios procesos biológicos. Es un elemento esencial en animales, microorganismos y plantas, es un constituyente de enzimas y proteínas (Adriano, 2001).

En general, en plantas, cuando la concentración de Ni en los tejidos vegetales es superior a las 50 ppm pueden sufrir síntomas de toxicidad (clorosis de hojas seguido por necrosis), aunque los niveles varían dependiendo de la especie. En peces, la exposición a niveles bajos de Ni en periodos prolongados puede generar efectos tóxicos como la calcificación esquelética y alteración de la capacidad de difusión de las branquias (Adriano, 2001).

El Ni es un elemento particularmente conocido por causar problemas de salud humana (Marín et al., 2015). Entre los efectos agudos pueden mencionarse neumonitis, formación de membrana hialina, edema pulmonar y hemorragia, degeneración hepática, congestión cerebral y renal, dermatitis y reacciones alérgicas. Los efectos crónicos están asociados a cáncer de las vías respiratorias y asma (Adriano, 2001).

La exposición ocupacional al Ni es la más habitual (Adriano, 2001), aunque también pueden producirse exposiciones ambientales a partir de fuentes antropogénicas (Andrew et al., 2003). La inhalación, principalmente en ambientes ocupacionales, y la ingestión son las principales vías de exposición al Ni en los seres humanos (Adriano, 2001). La exposición dérmica puede ocurrir por contacto de la piel con el suelo, agua, o metales, incluyendo el acero inoxidable o monedas que contienen Ni (ATSDR, 2005).

Según la ORDEN 2770/2006, de 11 de agosto, de la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio (Comunidad de Madrid), se establecen los siguientes niveles genéricos de referencia para el Ni: 15600 mg/kg para suelos de uso industrial, 1560 mg/kg en suelos de uso urbano y 405 mg/kg en otros usos del suelo.

1.3 Cobre. Fuente de contaminación, niveles de referencia, efectos en salud y medio ambiente

El cobre (Cu) es uno de los metales más importantes de la sociedad (Adriano, 2001). Debido a las amplias aplicaciones del Cu en los sectores industriales y productos del hogar, los iones cúpricos Cu(II) se encuentran en efluentes industriales, tales como los de fundición de cobre, galvanoplastia y la fabricación de dispositivos electrónicos, incluyendo placas de circuitos (Li et al., 2014). Las industrias como la minería y el refinado de petróleo producen aguas residuales y lodos que contienen una alta concentración de cationes de Cu (Shen et al., 2009). El Cu también se utiliza ampliamente en la fabricación de fertilizantes, bactericidas y fungicidas, y como alguicida en la depuración de aguas. A su vez, se emplea como aditivo en alimentos, antibióticos y otros fármacos para animales. Es por esto que el empleo de agroquímicos, lodos de depuradora y estiércol en los campos agrícolas ha contribuido a aumentar los niveles de Cu en los suelos (Adriano, 2001; Kabata-Pendias, 2011).

En bajas concentraciones en la dieta, es un elemento esencial para todos los organismos, incluyendo a los seres humanos y otros animales. Sin embargo, concentraciones elevadas pueden dar lugar a efectos tóxicos (ATSDR, 2004). En general, el rango de toxicidad para la mayoría de los cultivos va de 20 a 100 mg/kg en tejidos vegetales, siendo la clorosis el síntoma de toxicidad. En peces, el Cu interfiere efectivamente con el transporte de iones en branquias, la concentración de iones plasmáticos, los parámetros hematológicos y las actividades enzimáticas, deformidades vertebrales y trastornos neurológicos, reducción de la producción de huevos, anomalías en los alevines y la supervivencia reducida de jóvenes. La toxicidad del Cu en seres humanos es muy rara y se limita a individuos que consumen alimentos o bebidas ácidas que han tenido contacto prolongado con recipientes de Cu (Adriano, 2001). Concentraciones elevadas pueden causar malestar gastrointestinal e irritación del tracto respiratorio (Wang et al., 2015).

Según la ORDEN 2770/2006, de 11 de agosto, de la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio (Comunidad de Madrid), se establecen los siguientes niveles genéricos de referencia para el Cu: 8000 mg/kg para suelos de uso industrial, 800 mg/kg en suelos de uso urbano y 80 mg/kg en otros usos del suelo.

1.4 Tecnologías de descontaminación de suelos. Nanorremediación.

Existen diferentes tecnologías disponibles para el tratamiento de suelos contaminados con metales pesados, tanto in situ como ex situ. Los métodos comúnmente usados tales como excavación del suelo, encapsulación, lavado, vitrificación, entre otros, no sólo son costosos en términos económicos y energéticos, sino que también suelen ser perjudiciales para el suelo (Michalkova et al., 2014). La nanorremediación es una tecnología emergente de aplicación in situ que puede emplearse para inmovilizar y/o degradar contaminantes (Rathor et al., 2017) y, por ende, reducir la movilidad y la biodisponibilidad de los mismos (Kidd et al., 2015).

El uso de nanomateriales ha generado mucho interés debido a sus propiedades únicas (Shen et al., 2009): tamaño de partícula (entre 1,0-100 nm), elevada relación superficie/volumen y alta reactividad in situ (Gupta et al., 2011; Kumari et al., 2016). Entre sus diversas aplicaciones, se encuentra su utilización para el saneamiento de emplazamientos contaminados con hidrocarburos, compuestos organoclorados plaguicidas y metales (Kumari et al., 2016; Mueller et al., 2011; Stefaniuk et al. 2016).

Las nanopartículas más estudiadas en procesos de descontaminación son las de hierro con valencia cero (nZVI) (Li & Zhang, 2007; Stefaniuk et al. 2016). Varios estudios han informado sobre la aplicabilidad del tratamiento para la inmovilización de Zn, Cd, Pb, Ni, Cu, Ag, U, Hg, Cr en aguas obteniendo altas eficiencias (Klimkova et al., 2011; Li et al., 2008; Li et al., 2014; Li & Zhang, 2006; Li & Zhang, 2007; Wang, et al., 2015; Xiao et al., 2011). En suelos se han realizado ensayos para la inmovilización de As, Cr, Pb, Zn, Cd, Ni, Hg (Gil-Díaz et al., 2014a, 2014b, 2016, 2017a, 2017b; Moazallahi et al., 2016; Rathor et

al., 2017; Wang et al., 2014), no habiéndose encontrado antecedentes de aplicación de nZVI para la inmovilización de Cu en suelos.

Las partículas de nZVI tienen una estructura conformada por un núcleo de hierro metálico (Fe(0)) y una corteza superficial de óxidos e hidróxidos de hierro formados a partir de la oxidación del hierro (Li & Zhang, 2007) (Figura 1).

Los mecanismos específicos de inmovilización de metales pesados con nZVI dependen del potencial redox estándar (E^0) del contaminante metálico (Li & Zhang, 2007; O'Carroll et al., 2013). El hierro posee un potencial estándar relativamente bajo ($E^0 = -0.41$ V), por lo que es un buen donante de electrones. En metales con un potencial estándar más positivo que el del hierro (por ejemplo, Cr, As, Cu, U y Se), el principal mecanismo de secuestro es la reducción electroquímica y precipitación (Li & Zhang, 2007). Los metales que tienen un E^0 más negativo o similar al de Fe(0), (por ejemplo, Cd y Zn) se inmovilizan por adsorción a los óxidos e hidróxidos de hierro de la corteza superficial. Metales con E^0 ligeramente más positivos que Fe(0) (por ejemplo, Pb y Ni) se pueden inmovilizar mediante reducción y adsorción. Otros posibles mecanismos son la oxidación y co-precipitación por los óxidos de hierro dependiendo de los factores geoquímicos y condiciones tales como pH, Eh, concentración inicial y especiación de metales contaminantes (Figura 1) (O'Carroll et al., 2013).

Las nZVI tienen fuertes fuerzas de atracción interpartículas, por lo tanto tienden a aglomerarse en partículas de tamaño micrométrico, las cuales tienen una movilidad limitada en medios porosos (O'Carroll et al., 2013). Las nanopartículas que comienzan a depositarse sobre la superficie de las partículas del suelo, se van acumulando y atraen otras partículas en suspensión, obstaculizando los poros del suelo (Cecchin et al., 2017). Para evitar esta dificultad, varios polímeros se han incluido para estabilizar la suspensión de nZVI (Karn et al., 2009; O'Carroll et al., 2013). Estos polímeros cubren superficialmente las nZVI creando una capa electrónicamente negativa, lo que promueve una aversión de

las partículas entre sí y con partículas de suelo, aumentando la migración en el suelo y evitando la aglomeración (Cecchin et al., 2017).

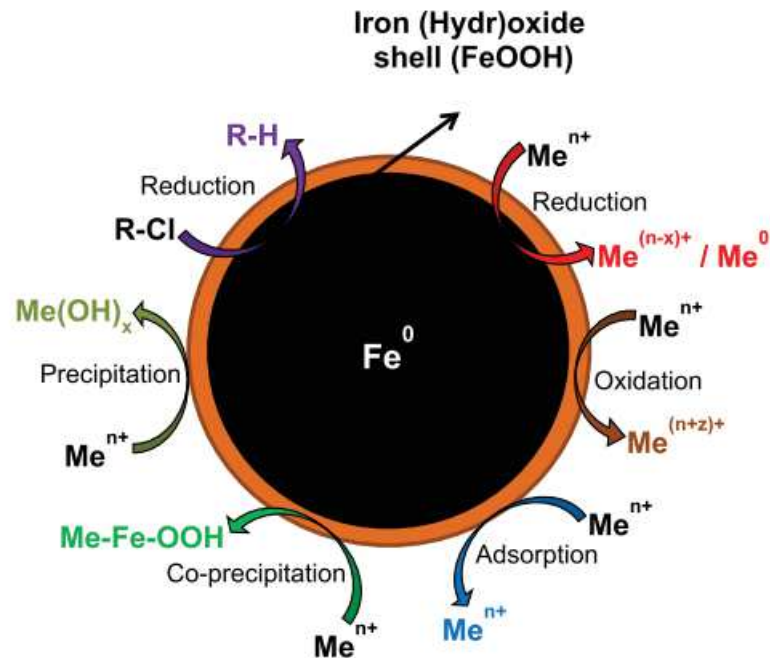


Figura 1. Estructura de núcleo-corteza superficial de nZVI que representa los diversos mecanismos para la eliminación de metales y compuestos clorados (O'Carroll et al., 2013).

Diferentes ensayos han encontrado efectivo el uso de nZVI para la inmovilización de Cu y Ni en medio acuoso (Li et al., 2014; Li & Zhang, 2007; Rathor et al., 2017). Sin embargo, hasta la fecha no se han encontrado trabajos que evalúen su efectividad en suelos y, que a su vez analicen la influencia de la presencia simultánea de los dos contaminantes en el suelo. Es por esto que se plantea la hipótesis de que la aplicación de las nZVI en suelos ácidos puede ser una técnica efectiva en la inmovilización de Cu y Ni, disminuyendo el riesgo de movilidad de los mismos y, por tanto, su introducción a la cadena trófica.

2. OBJETIVO GENERALES Y ESPECÍFICOS

El objetivo general del presente estudio es evaluar la eficacia de las nZVI en la inmovilización de cobre y níquel en un suelo ácido contaminado.

Los objetivos específicos consisten en:

- Determinar el grado de inmovilización del Cu y Ni en un suelo ácido contaminado tratado a diferentes dosis de nZVI.
- Evaluar el efecto de la presencia de Cu y Ni de manera conjunta en la eficacia de la inmovilización por las nZVI.
- Valorar posibles efectos de las nZVI en las propiedades físico-químicas del suelo.
- Evaluar el impacto de la aplicación de las nZVI en la fitotoxicidad del suelo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Laboratorio de suelos del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), situado en la Finca “El Encín”, en Alcalá de Henares (Madrid).

3.1 Suelo

Se utilizaron muestras procedentes del horizonte superficial (0-30 cm de profundidad) de un suelo franco arenoso de una zona agrícola de Daganzo (Madrid). Inicialmente las muestras de suelo se secaron al aire y se tamizaron empleando un tamiz de 2 mm. Posteriormente se procedió a la caracterización de las propiedades físico-químicas del suelo original, de acuerdo a los métodos oficiales de análisis de suelos (MAPA, 1994) (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del suelo utilizado en los ensayos

<i>Propiedades físico-químicas</i>	
<i>pH</i>	5,35
<i>CE (dS/m)</i>	0,53
<i>N (%)</i>	0,06
<i>MO (%)</i>	0,81
<i>P (mg/kg)</i>	39
<i>Ca (mg/kg)</i>	594
<i>Mg (mg/kg)</i>	90
<i>Na (mg/kg)</i>	31
<i>K (mg/kg)</i>	155
<i>Ni (mg/kg)</i>	<LD
<i>Cu(mg/kg)</i>	9
<i>Cd (mg/kg)</i>	<LD
<i>Cr (mg/kg)</i>	9
<i>Pb (mg/kg)</i>	10
<i>Zn (mg/kg)</i>	30
<i>Arena (%)</i>	64,3
<i>Limo (%)</i>	25,5
<i>Arcilla (%)</i>	13,2

CE: conductividad eléctrica; MO: materia orgánica; LD: límite de detección

3.2 Propiedades físico-químicas

3.2.1 pH y conductividad eléctrica (CE)

Se midieron en suspensión usando una relación 1:2,5 (p/v) de suelo y agua destilada. Se pesaron 10 g de suelo tamizado de cada muestra, se añadieron 25 ml de agua destilada. Cada 5 minutos se agitó la suspensión durante un intervalo de 25 minutos. El pH y la conductividad se midieron con un pH-metro *Crison–MultiMeter MM 41* que determina ambos parámetros de manera simultánea, con electrodos específicos para cada uno de ellos.

3.2.2 Materia orgánica oxidable

Se determinó mediante el método Walkley-Black modificado. El carbono orgánico del suelo se oxida con dicromato potásico en presencia de ácido sulfúrico y posteriormente se valora el exceso de oxidante con sulfato ferroso amónico (sal de Mohr).

La cantidad de carbono orgánico oxidado se calcula a partir de la cantidad de dicromato reducido.

Se pesaron 0,2 g de suelo molido y posteriormente se añadieron 10 ml de dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$) y 20 ml de ácido sulfúrico concentrado 95-98% (H_2SO_4). Se dejó reposar aproximadamente media hora. El exceso de oxidante se valoró con un potenciómetro automático *Metrohm728 Stirrer* utilizando sulfato ferroso amónico 0,5 N [$(SO_4)_2Fe (NH_4)_2 \cdot 6H_2O$]. El porcentaje de materia orgánica oxidable en el suelo se obtuvo multiplicando el carbono orgánico obtenido por el factor de Van Bemmelen (1,724).

3.2.3 Nitrógeno total

Se determinó el contenido de nitrógeno orgánico total mediante el método Kjeldahl. Este método se basa en la mineralización del nitrógeno orgánico y la posterior valoración del amonio producido mediante la adición de un álcali a partir de una muestra 0,1 g de suelo molido. El amonio mineralizado se destila en arrastre de vapor sobre ácido bórico (H_3BO_3) y se valora con una solución ácida estándar utilizando un analizador *FOSS Tecator™-2300- Kjeltec Analyzer Unit*.

3.2.4 Fósforo asimilable

Se determinó por extracción con bicarbonato de sodio a pH 8,5 según el procedimiento de Olsen et al. (1954). Se agitó durante 30 minutos la mezcla de 5 g de suelo molido y 100 ml de la solución extractora ($NaHCO_3$ 0,5 M). Posteriormente se filtró y se tomaron 10 ml del filtrado que se mezclaron en un matraz con 1,5 ml de H_2SO_4 1,5 M, se añadieron 10 ml de agua destilada y se agitó manualmente. Se añadieron 8 ml de ácido ascórbico, se enrasó y se midió la absorbancia del compuesto coloreado formado a 660 nm utilizando un espectrofotómetro UV/Visible *Thermo Spectronic HELIOS α* . La concentración de fósforo se calculó por interpolación en una curva de calibrado.

3.2.5 Macronutrientes asimilables (Ca, Mg, Na y K)

Los cationes intercambiables del suelo se desplazan mediante extracciones sucesivas con una solución 1 N de acetato de amonio ($C_2H_3O_2NH_4$) a pH 7. Se pesaron 10 g

de suelo tamizado y se agregaron 25 ml de acetato de amonio, se agitó durante 10 minutos con un agitador rotativo *J.P. Selecta–Rotaterm* y se centrifugó durante otros 10 minutos en una centrífuga *Sigma 3-16* a 3500 rpm. El sobrenadante obtenido se filtró y se enrasó a 100 ml. Posteriormente los cationes se cuantificaron mediante espectrometría de absorción atómica de llama (*AA240FS, Varian, Victoria, Australia*).

3.2.6 Textura

Se determinó mediante el método del densímetro de Bouyoucos (PROTON – Areómetro Bouyoucos). Este método se basa en la Ley de Stokes, la cual relaciona la concentración de partículas de arena, limo y arcilla con la densidad de una suspensión de suelo. Con los datos obtenidos de los porcentajes de arcilla, limo y arena, se puede determinar la clase de textura con el triángulo textural (USDA, 1993).

Se utilizó como dispersante una disolución sobresaturada de metafosfato de sodio (NaPO_3) en la proporción 50 g/l con agua de grifo a 20 °C aproximadamente. Se mezclaron 100 ml de disolución con 40 g de suelo y se dejó reposar durante 10 minutos. Se trasvasó a un vaso y se removi6 con un agitador de varilla *Proeti SA* durante 3 minutos, se transfiri6 a una probeta de un litro, se agit6 manualmente y se dej6 estabilizar. A continuaci6n se introduce el densímetro en la suspensi6n y tras 40 segundos de estabilizaci6n se anota la primera lectura. De acuerdo a la metodología USDA, a partir de la primera lectura de densidad se estima el porcentaje de arena (>0,05 mm), y el porcentaje de arcilla (<0,002 mm) seg6n la medida tomada a las 2 horas. Posteriormente por diferencia entre el contenido de arcillas y arenas se estiman el porcentaje de limo.

3.2.7 Concentraci6n de metales totales en suelo

Para obtener las concentraciones de metales pesados se sometió el suelo a una extracci6n en medio ácido en un digestor de microondas. El método se basa en la aplicaci6n de una radiaci6n de microondas sobre una muestra de suelo, lo que provoca un calentamiento de la misma como consecuencia de la migraci6n de iones y la rotaci6n de los dipolos permanentes de las moléculas de agua. Durante el calentamiento la muestra es

digerida por una mezcla ácida de HCl + HNO₃ añadida al vaso de reacción, provocando el paso de todos los iones presentes en la muestra a la disolución y dejando un residuo de sílice insoluble que se desecha.

Se utilizaron 0,5 g de muestra previamente molida en un molino de bolas, se colocaron en vasos de teflón y posteriormente se añadieron 2 ml de HCl (37%) y 6 ml de HNO₃ (69%), se dejó reaccionar durante 1 hora en la campana de gases y se introdujeron en el microondas (*Multiwave 3000 GO-Anton Paar*) para la digestión. Posteriormente, el contenido de los vasos se filtró y se colocó en matraces enrasando a 50 ml con agua mili-Q. Por último, la concentración de los distintos metales se cuantificó utilizando espectrometría de absorción atómica de llama.

3.3 Contaminación del suelo

El suelo original fue contaminado con Cu y Ni individualmente, y Cu y Ni de manera conjunta, a niveles superiores a las concentraciones genéricas de referencia para protección de la salud humana en suelos de uso urbano en la Comunidad de Madrid (orden 2770/2006). Para la contaminación del suelo con cada metal, se partió de una disolución madre cuya concentración, y características de la sal correspondiente se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Datos relativos a las concentraciones de Ni y Cu, y las sales empleadas para la contaminación del suelo

<i>Metal</i>	<i>Concentración teórica (mg/kg)</i>	<i>Sales</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>Volumen de solución añadido al suelo (ml)</i>	<i>Peso de sal utilizada (g)</i>
<i>Cu</i>	1000	CuSO ₄ 5H ₂ O	249,68	400	3,93
<i>Ni</i>	2000	NiSO ₄ 6H ₂ O	262,86	400	8,96
<i>Cu + Ni</i>	Cu: 1000	CuSO ₄ 5H ₂ O	249,68	400	3,93
	Ni: 2000	NiSO ₄ 6H ₂ O	262,86		8,96

*Marca comercial de las sales empleadas PANREAC (Pureza 99-100%)

Se pesó 1 kg de suelo en 3 bandejas de plástico y posteriormente se añadió la disolución contaminante correspondiente (Figura 2 A y B). Las bandejas se mantuvieron en una cámara de incubación durante un mes al 60% de la capacidad de campo y a 25°C, para la consolidación del suelo contaminado.

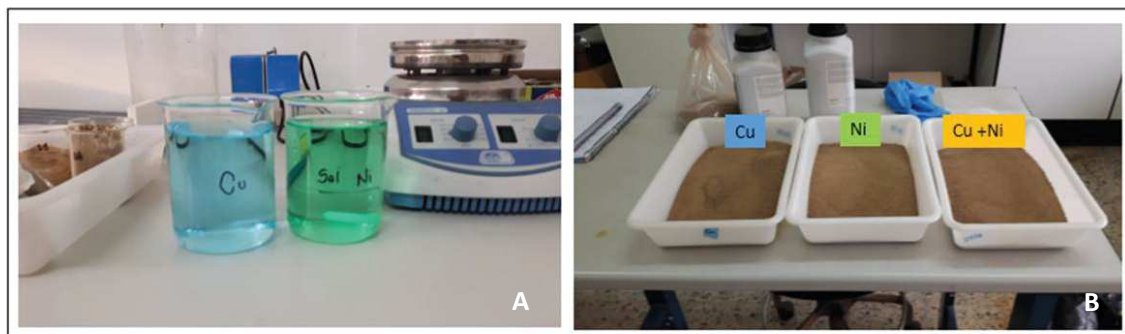


Figura 2. A) Disoluciones de Ni y Cu. B) Bandejas con el suelo a contaminar con los diferentes metales.

3.4 Nanopartículas de Fe(0)

En los ensayos de descontaminación se utilizó una suspensión acuosa estabilizada de nanopartículas de hierro con valencia cero (nZVI). La marca comercial utilizada fue NANO FER 25S, suministrada por NANO IRON s.r.o (República Checa).

Según las especificaciones técnicas del producto, el contenido de Fe(0) en la dispersión es de 14-18%, un 2-6% corresponde a magnetita (Fe_3O_4), un 77% es agua y un 3% es surfactante (sal sódica del ácido poliacrílico). La granulometría es $d_{50} < 50$ nm, la superficie específica es mayor a $25 \text{ m}^2/\text{g}$ y el pH de la dispersión es fuertemente alcalino (11-12).

3.5 Ensayos de inmovilización de Cu y Ni con nZVI

Transcurrido el periodo de consolidación de la contaminación se procedió al tratamiento de los tres suelos contaminados: **suelo + Cu; suelo + Ni; Suelo + (Cu + Ni)**, a diferentes dosis de nZVI, **0% (control), 1% y 5%**.

En el tratamiento a una dosis de 1% se añadió 1 g de suspensión NANO FER 25S en 100 g de suelo. Considerando que el promedio de Fe(0) en la suspensión es de 16%, en este tratamiento, la dosis corresponde a 0,16 g de Fe(0) en 100 g de suelo. Del mismo modo, el tratamiento al 5% supone 0,8 g de Fe(0) en 100 g de suelo. Se utilizaron recipientes plásticos de 150 ml y cada tratamiento se realizó por triplicado (Figura 3).



Figura 3. Recipientes con los diferentes tratamientos y repeticiones correspondientes.

Una vez aplicadas las nZVI se humedeció con agua destilada (22 ml para el control, 21 ml para la dosis del 1% y 17 ml para la dosis del 5%) y se procedió a la homogeneización mediante el empleo de una varilla de vidrio para favorecer el contacto con el suelo. Posteriormente se agitaron durante 72 horas en un agitador orbital (*Infors AG CH-4103 Bottmingen*). Este tiempo fue considerado de acuerdo a trabajos previos (Gil-Díaz et al., 2014b, 2016, 2017b; Wang et al., 2014). En este sentido, Gil-Díaz et al. (2014b) no encontraron diferencias significativas entre 72 horas y 1 mes en la inmovilización de Pb y Zn en distintos suelos. Transcurrido este tiempo se dejaron secar las muestras al aire para su posterior análisis.

3.6 Evaluación de la efectividad en la inmovilización

3.6.1 Lixiviación de metales según el test TCLP (Toxicity Characteristic Leaching Procedure) (US-EPA, 1992)

Es un método de extracción de elementos lixiviables en una muestra de suelo mediante una simulación de lixiviación. Este método se utilizó para determinar las concentraciones de Cu, Ni y Fe que pueden ser potencialmente lixiviables.

El análisis de TCLP se realizó a partir de 1 g de suelo mezclado con 20 ml del reactivo TCLP (CH_3COOH 0,1 M y NaOH 0,0643 M, a $\text{pH } 4,93 \pm 0,05$) en un tubo de centrífuga. Los tubos permanecieron en un agitador de rodillos (OVAN RM 120-DE) durante 18 horas y se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm en una centrífuga

HITACHI CR 22N. El sobrenadante se retiró con una pipeta Pasteur plástica y se filtró, colocando el extracto en tubos plásticos donde se acidificaron con 120 µl de HNO₃ (69%). Se midió Fe, Cu y Ni utilizando espectrometría de absorción atómica de llama.

3.6.2 Extracción secuencial de metales según Tessier et al. (1979)

Este procedimiento analítico incluye la extracción química secuencial, mediante diferentes reactivos, de los metales asociadas a las fracciones del suelo: intercambiable (Fi), carbonatos (FC), óxidos e hidróxidos de Fe y Mn (FOx), materia orgánica (FMO) y fracción residual (FR). La disponibilidad relativa sigue la secuencia de FI > FC > FOx > FMO > FR. Estos metales fueron medidos posteriormente mediante espectroscopía de absorción atómica de llama. La suma de las concentraciones de los metales estudiados en las fracciones FI y FC se consideró como la fracción fácilmente disponible (FFD).

FI: se pesaron 2,5 g de suelo en un tubo de centrifuga y se añadieron 25 ml de MgCl₂ (1 M, pH 7). Los tubos se agitaron a temperatura ambiente en un agitador de rodillos durante 1 hora y se centrifugan a 10000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró y se acidificó con 60 µl de HNO₃ (69%).

FC: sobre el residuo de suelo que quedó tras realizar el procedimiento de extracción de la FI, se añadieron 25 ml de acetato de sodio (CH₃COONa/CH₃COOH) (1M, pH 5). Se agitó a temperatura ambiente en agitador de rodillos durante 5 horas, se centrifugó en las mismas condiciones que la FI. El sobrenadante se filtró y acidificó con 120 µl de HNO₃ (69%).

FOx: sobre el residuo de suelo que quedó del fraccionamiento FC, se incorporaron 25 ml de reactivo NH₂OH HCl (0,04 M al 25% de CH₃COOH). Se agitó durante 6 horas a 96°C en un baño de agua (*Bunsen BTG-1*), agitando manualmente cada cierto tiempo. Se centrifugó en las mismas condiciones que las fracciones anteriores y el sobrenadante se filtró y acidificó con 60 µl de HNO₃ (69%).

FMO: al residuo obtenido tras la extracción de la FOx se le añadieron 5 ml de H₂O₂ al 30% y 3 ml de HNO₃ 0,01 M y se mantuvo en agitación a 85°C durante 5 horas en baño de agua. A continuación se añadieron 2 ml más de H₂O₂ al 30% y se dejó en agitación 1 hora en las mismas condiciones. Posteriormente, se agregaron 15 ml de NH₄NO₃ 1 M y se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente, se centrifugó en las mismas condiciones que las fracciones anteriores, se extrajo el sobrenadante y se acidificó con 60 µl de HNO₃ (69%).

FR: la concentración de metales en la fracción residual se determinó por digestión en microondas del residuo obtenido tras la extracción de la FMO, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.7.

3.6.3 Bioaccesibilidad de los metales mediante el método IVBA (*In vitro bioaccessibility assay for lead in soil*) (US-EPA, 2013)

Esta técnica analiza la bioaccesibilidad in vitro (IVBA) del plomo en el suelo simulando las condiciones de pH y temperatura del sistema digestivo de los seres humanos y animales. Si bien este método ha sido descrito para el plomo, en este caso se ha aplicado para los metales en estudio. El reactivo consiste en una disolución de glicina (0,3 M) que se ajusta a pH=1,5 con HCl. Mediante esta técnica se extraen los metales que estarían disponibles en el sistema digestivo y que, por lo tanto, podrían ser asimilados y quedar disponibles para su distribución en tejidos y órganos en caso de ingestión del suelo contaminado.

Se colocaron 0,3 g de suelo en un tubo de centrifuga y se añadieron 30 ml de reactivo. La mezcla se agitó durante 1 hora a 37°C en un baño de agua. A continuación, el sobrenadante se separó del suelo por centrifugación (5000 rpm durante 10 minutos). El extracto obtenido se filtró y los metales presentes se cuantificaron mediante espectrometría de absorción atómica de llama.

3.6.4 Test de fitotoxicidad: índice de germinación

La fitotoxicidad de las muestras de suelo contaminado y del suelo después de los diferentes tratamientos con nZVI fue determinada por el test de germinación de Zucconi (Zucconi et al., 1985). Consiste en evaluar el potencial de germinación de las semillas en un soporte (papel de filtro en placa Petri) humedecido con extracto del suelo. El extracto de suelo se obtuvo mezclando 2 g de suelo con 20 ml de agua destilada a 60 °C y agitándolo durante 30 minutos. A continuación, el extracto se filtró y se colocaron 6 ml en cada una de las placas Petri. Se utilizaron dos especies: *Vicia sativa* (veza) y *Medicago sativa* (alfalfa). Para la primera especie se colocaron 7 semillas por placa y el periodo de incubación en oscuridad a 25°C fue de 5 días. Para la segunda especie se colocaron 12 semillas por placa y el periodo de incubación fue de 3 días bajo las mismas condiciones que en el caso anterior. A su vez, se realizaron controles para cada especie, colocando la misma cantidad de semillas en placas humedecidas con 6 ml agua destilada bajo las mismas condiciones de incubación. Las placas Petri se sellaron con Parafilm para mantener la humedad. Tras el periodo de incubación se determinó el porcentaje de semillas germinadas y se midió la longitud de las raíces. Únicamente las semillas con raíces de longitud mayor a 5 mm se consideraron como germinadas. Estos datos se comparan con los controles. La relación que determina el índice de germinación es la siguiente:

$$\text{IG} = \%G \text{ Lm/Lb}$$

Donde IG: índice de germinación (%); %G: el porcentaje de semillas germinadas respecto al control; Lm: longitud media de las raíces en los diferentes tratamientos; Lb: longitud media de las raíces en los blancos.

3.7 Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó utilizando el programa estadístico SPSS versión 19.0.0.1 (SPSS Inc; IBM Company). Se llevó a cabo un análisis de Modelo Lineal General (GLM) para los factores dosis de nZVI y tipo de contaminación. Se aplicó un ANOVA de dos vías seguido del test de Tukey ($p < 0,05$) para determinar las diferencias significativas entre las medias.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Inmovilización de Cu y Ni en el suelo

La inmovilización de Cu y Ni en los suelos tratados a las diferentes dosis de nZVI se evaluó mediante los métodos TCLP y fraccionamiento Tessier.

En la Figura 4 se muestran los resultados de las pruebas TCLP para cada uno de los tratamientos en los suelos contaminados con Cu y con Cu+Ni. En el suelo contaminado únicamente con Cu, la dosis de 5% de nZVI redujo significativamente ($p < 0,001$) el potencial de lixiviación del Cu, disminuyendo moderadamente la concentración en un 21% respecto al suelo control. En el suelo contaminado con Cu+Ni, las dosis de nZVI de 1 y 5% redujeron significativamente ($p < 0,001$) la cantidad de Cu lixiviable en un 16 y 28%, respectivamente. Al comparar los resultados de TCLP para ambos suelos, se observó que la presencia de Ni favoreció significativamente la lixiviación de Cu ($p < 0,05$) en suelos control, mientras que entre los suelos tratados a una misma dosis de nZVI, no existen diferencias significativas.

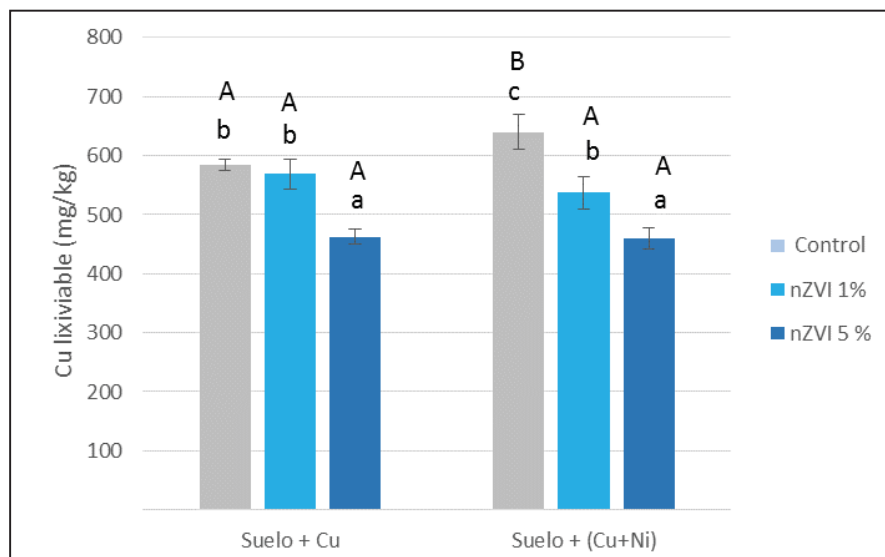


Figura 4. Concentración media de Cu lixiviado según TCLP en los diferentes suelos. Barras con distinta letra difieren significativamente ($p < 0,05$); letras minúsculas comparan entre dosis de nZVI para un mismo tipo de contaminación; letras mayúsculas, entre tipos de contaminación a la misma dosis.

En la Figura 5, se muestran los resultados de TCLP para el Ni en los suelos contaminados con Ni y con Cu+Ni. En el suelo contaminado únicamente con Ni, se observó que las dosis de nZVI de 1% y 5% redujeron significativamente ($p < 0,001$) la cantidad de Ni lixiviable en un 36% y 54%, respectivamente. En el suelo contaminado con Cu+Ni, la dosis de 5% de nZVI redujo significativamente ($p < 0,01$) el potencial de lixiviación del Ni en un 42%. Al comparar los resultados de TCLP para ambos suelos, se observó que la presencia de Cu disminuyó significativamente ($p < 0,001$) la eficacia del tratamiento con nZVI para inmovilizar Ni. A una dosis del 1% de nZVI, el Ni lixiviable en los suelos contaminados con ambos metales fue un 53% más elevado respecto al suelo contaminado únicamente con Ni; y a una dosis de 5% de nZVI, fue un 36% mayor.

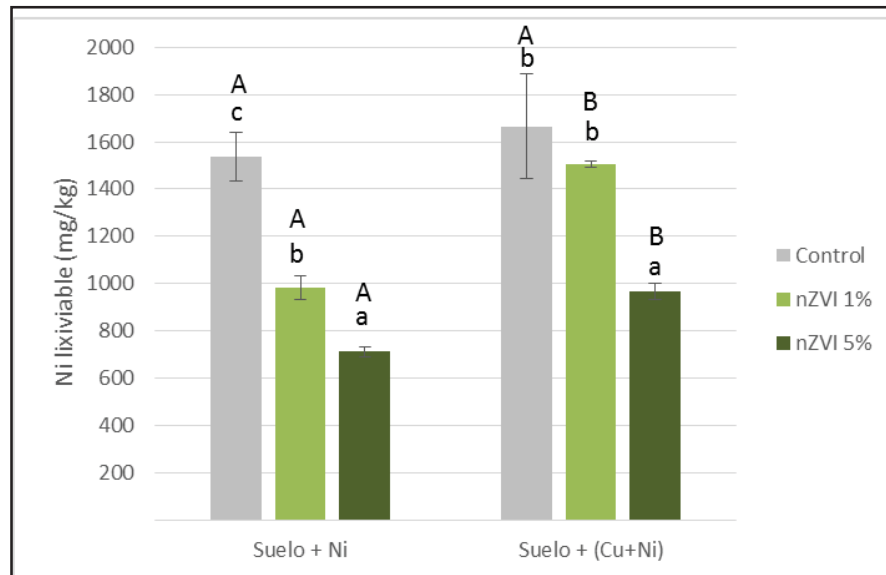


Figura 5. Concentración media de Ni lixiviado según TCLP en los diferentes suelos. Barras con distinta letra difieren significativamente ($p < 0,05$); letras minúsculas comparan entre dosis de nZVI para un mismo tipo de contaminación; letras mayúsculas entre tipos de contaminación a la misma dosis.

En la Tabla 3 se muestra las variaciones en la concentración media de Cu y Ni en las fracciones del suelo obtenidas utilizando el procedimiento de extracción secuencial Tessier para las diferentes condiciones investigadas. En los suelos control, la extracción secuencial reveló que el Cu y el Ni se asocian mayoritariamente con las fracciones fácilmente disponibles del suelo (FFD). Esto implicaría mayor riesgo ya que estos

elementos estarían más disponibles para su asimilación por parte de la vegetación y otros organismos del suelo, y a su vez, serían más fácilmente lixiviables.

Tabla 3. Concentración media y desviación estándar (mg/kg) de Cu y Ni en las diferentes fracciones del suelo para cada tratamiento.

Suelo	Metal	Dosis nZVI	FFD	FOx	FMO	FR
Cu	Cu	control	843 ± 34,4 c A	94,0 ± 11,5 a A	49,0 ± 8,54 a A	14,7 ± 0,58 a A
		1%	713 ± 15,5 b A	219 ± 22,6 b A	56,0 ± 13,9 a A	16,7 ± 0,58 a A
		5%	599 ± 28,0 a A	273 ± 23,6 c A	61,0 ± 8,50 a A	12,7 ± 1,15 a A
Cu+Ni	Cu	control	869 ± 35,4 b A	81,0 ± 7,00 a A	36,7 ± 11,9 a A	17,7 ± 4,62 a A
		1%	767 ± 4,36 a B	201 ± 18,6 b A	51,3 ± 3,79 ab A	18,0 ± 3,61 a A
		5%	688 ± 45,4 a B	233 ± 30,7 b A	70,7 ± 11,9 b A	18,7 ± 2,08 a B
Cu+Ni	Ni	control	2096 ± 115 b A	16,7 ± 0,58 a A	3,67 ± 0,58 a B	5,67 ± 0,58 a A
		1%	2010 ± 36,1 b B	192 ± 19,7 b A	33,0 ± 1,00 b A	6,00 ± 0,00 a A
		5%	1428 ± 98,1 a B	498 ± 26,4 c A	70,3 ± 5,03 c A	9,00 ± 0,00 a A
Ni	Ni	control	1931 ± 52,9 c A	50,0 ± 1,70 a B	12,3 ± 0,58 a A	6,67 ± 0,58 a A
		1%	1420 ± 40,5 b A	570 ± 28,8 b B	99,7 ± 12,2 b B	11,3 ± 0,58 a B
		5%	1073 ± 40,1 a A	769 ± 39,8 c B	102 ± 9,17 b B	16,0 ± 1,00 a B

Medias seguidas de distinta letra presentan diferencias significativas ($p < 0,05$); letras minúsculas comparan entre dosis para un mismo tipo de contaminación; mayúsculas para diferentes tipos de contaminación a la misma dosis. FFD: fácilmente disponible, FOx: óxido de Fe/Mn, FMO: materia orgánica, FR: residual.

En la Figura 6 se muestra la concentración de Cu expresada en (%) en las diferentes fracciones obtenidas por extracción secuencial en los suelos con Cu y con Cu+Ni para cada uno de los tratamientos con nZVI. La concentración de Cu en la FFD al aplicar las nZVI se redujo significativamente en ambos suelos, mientras que aumentó principalmente en las FOx. La dosis de 5% fue comparativamente más eficaz, y consiguió una disminución de la concentración de Cu en la FFD de 29% para el suelo contaminado únicamente con Cu, y un 20% para el suelo contaminado con ambos metales. Esto evidencia que la presencia de Ni disminuyó la efectividad de las nZVI para inmovilizar Cu. La concentración de Cu en la FOx se incrementó alrededor de 3 veces al aplicar nZVI al 5% en ambos suelos. En la FMO se

observó un leve incremento en la concentración de Cu al aumentar la dosis de nZVI. Por el contrario, la FR no presentó diferencias significativas entre los tratamientos.

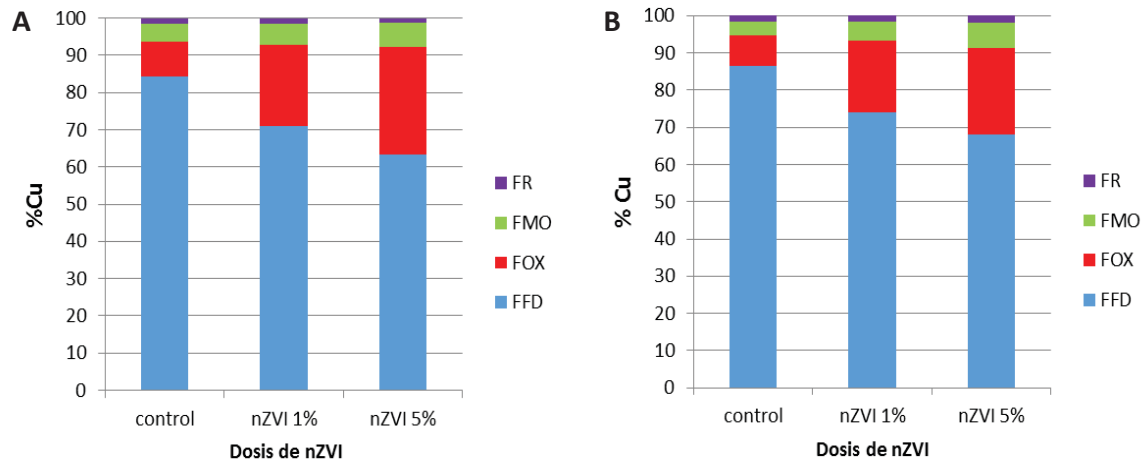


Figura 6. Concentración de Cu (%) en las diferentes fracciones obtenidas por extracción secuencial en el suelo+Cu (A) y suelo+(Cu+Ni) (B) para cada tratamiento.

En el caso del Ni (Figura 7), tras la aplicación de las nZVI, el fraccionamiento en el suelo presentó un comportamiento similar al del Cu, aunque se obtuvieron mayores eficacias en la inmovilización, especialmente a la dosis del 5%, que redujo un 44% la concentración en la FFD en el suelo contaminado únicamente con Ni y un 31% en el suelo contaminado con ambos metales. Esto evidencia que la presencia de Cu en el suelo disminuyó la efectividad de las nZVI para inmovilizar Ni, siendo el efecto más notorio que en el caso inverso. La FOX a dosis de 5% representó un 37% más que en el control para el suelo contaminado únicamente con Ni y un 24% más en el suelo contaminado con ambos metales. Del mismo modo, la concentración de Ni en la FMO representó un 5% más que en el control en el suelo contaminado únicamente con Ni y un 3% en el suelo con Cu+Ni respecto a los controles. A la dosis del 5% se observó que las fracciones de Ox y MO fueron 1,5 y 1,4 veces mayores en el suelo con Ni respecto al contaminado con Cu+Ni, debido a la mayor disponibilidad de Ni en este último.

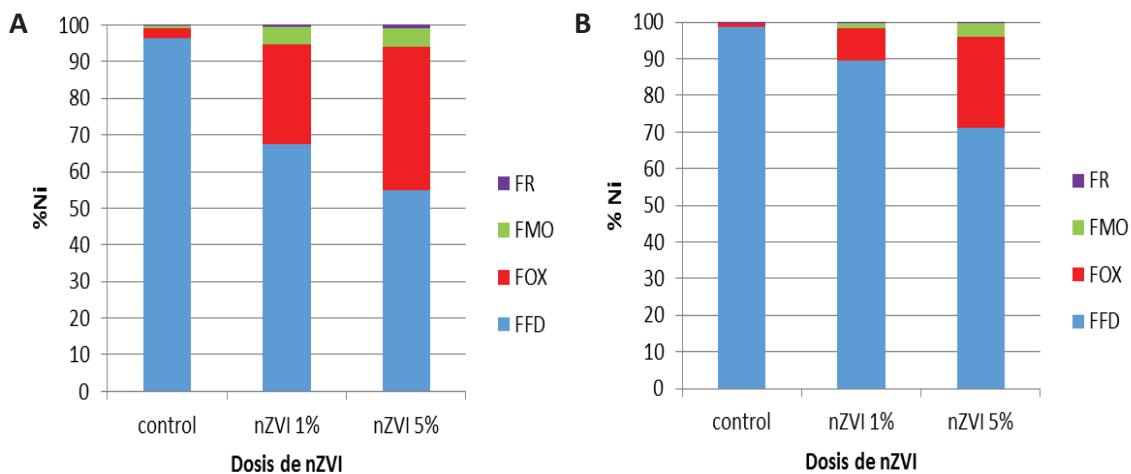


Figura 7. Concentración de Ni (%) en las diferentes fracciones obtenidas por extracción secuencial en el suelo + Ni (A) y suelo + (Cu+Ni) (B) para cada tratamiento.

Varios trabajos han investigado el efecto de diferentes tipos de nanopartículas de hierro en la inmovilización de Cu y Ni. En general, se han obtenido efectividades de inmovilización más altas para ambos metales en muestras acuosas comparadas con las obtenidas en el presente trabajo. Li & Zhang (2007) encontraron efectividades del 99,7% para Cu(II) y 71% para Ni(II) en soluciones acuosas con varios metales pesados, partiendo de una concentración inicial de 100 mg/l de cada ion y agregando 5 g/l de nZVI. Rathor et al. (2017) observaron un descenso de la efectividad de las nZVI al aumentar la concentración de Ni en el suelo, ya que a concentraciones de 25 mg/kg, se reducía la disponibilidad de Ni un 85%, mientras que para concentraciones de 150 mg/kg, la reducción era tan solo del 35%. Liu & Zhao (2007) trataron tres suelos (ácido, neutro y calcáreo) con nanopartículas de fosfato de hierro, y encontraron la menor efectividad en la reducción de Cu-TCLP en el suelo ácido (39%). Esto sugiere que otros tipos de nanopartículas de hierro también muestran dificultad para inmovilizar Cu en suelos ácidos.

Una de las posibles explicaciones a la moderada efectividad de las nZVI para inmovilizar Cu hallada en el presente ensayo, podría relacionarse con las condiciones de pH del suelo. A pH alcalino predominan las cargas negativas aumentando la posibilidad de

fijación de metales con carga positiva respecto a pH ácido (Liu & Zhao, 2007). En condiciones ácidas predominan las cargas positivas (Tiberg et al., 2016), por tanto, los óxidos de Fe están cargados positivamente. Tiberg et al. (2016) indican que la inmovilización del Cu por ZVI es altamente dependiente del pH y del contenido de materia orgánica, encontrando que la estabilización del Cu con ZVI sería más eficaz en suelos con un pH superior a 6. Kumpiene et al. (2006) trataron un suelo ácido contaminado con As, Cr y Cu, y encontraron que el Cu era el contaminante más crítico debido a su permanencia en las fracciones más móviles.

Según los resultados obtenidos a partir de TCLP y Tessier, en el suelo contaminado con ambos metales, la dosis del 1% de nZVI no fue efectiva en la inmovilización de Ni y con la dosis de 5% se obtuvieron menores efectividades en presencia de Cu. Esto coincide con los resultados de Li & Zhang (2007) que obtuvieron efectividades mayores en la inmovilización de Ni en soluciones acuosas que contenían únicamente este ion metálico (> 80%), respecto a soluciones que contenían varios metales pesados (71%). La competencia entre los diferentes cationes metálicos puede disminuir la efectividad de la inmovilización de Ni en el suelo. En este sentido, Gil-Díaz et al. (2017b) en un estudio de inmovilización de diferentes metales y metaloides en suelos concluyeron que la presencia de varios metales afectaba a su inmovilización.

El mecanismo de acción de las nZVI, según lo descrito por Li et al. (2014) y Li & Zhang (2007) para el Cu en muestras acuosas, consiste en una reducción química y precipitación estando retenido en la superficie de las nZVI como Cu(0). En el caso del Ni, tanto Ni(0) como Ni(II) están presentes en la superficie del nZVI, es decir que pueden ocurrir varios mecanismos, la reducción y procesos de adsorción y complejación con óxidos e hidróxidos superficiales (sorción física) (Li & Zhang, 2007; O'Carroll et al. 2013). Li & Zhang, (2007) explican la reducción basándose en los potenciales de oxidación de los iones metálicos. El Cu (E° : 0,34 V) presenta un potencial de oxidación mucho más positivo que el Fe (E° : -0,41 V), por lo que el mecanismo de eliminación es predominantemente la reducción y la precipitación. Por otro lado el Ni (E° : -0,24 V), con potencial ligeramente

más positivo que el Fe, puede ser inmovilizado en la superficie tanto en formas metálicas como iónicas. En otras palabras, para ambos iones la termodinámica de la reacción de reducción es favorable estando los electrones del Fe en un estado de energía más alta que el del par redox de los iones metálicos diana (Cu y Ni).

Según lo obtenido a partir del fraccionamiento Tessier, en los suelos no tratados, tanto el Cu como el Ni se encontraron mayoritariamente en las FFD del suelo, mientras que su concentración en las FR y FMO fue mínima. Al añadir las nZVI, en general se observó que disminuyeron las concentraciones de Cu y Ni en las FFD y se incrementaron en las fracciones menos disponibles del suelo, principalmente en la fracción asociada a óxidos e hidróxidos (FOx). Resultados similares fueron obtenidos por otros autores empleando diferentes tipos de agentes inmovilizantes. En este sentido, Tiberg et al. (2016) encontraron que al tratar el suelo con ZVI, el Cu formó complejos de superficie con óxidos e hidróxidos de Fe, en cambio en suelos no tratados el Cu se acomplejó con la materia orgánica del suelo. Liu & Zhao (2007) también observaron la transformación de las especies de Cu fácilmente disponibles en fracciones más estables, principalmente en la FR y FOx, después de la aplicación de nanopartículas de fosfato de hierro a un suelo ácido. Al igual que los trabajos citados anteriormente, Kumpiene et al. (2006) encontraron en un suelo contaminado con As, Cr y Cu y tratado con ZVI, que el Cu pasa de la FFD a la FOx, aunque una gran concentración de Cu intercambiable estaba todavía presente después del tratamiento. En ese trabajo, la movilidad del Cu disminuyó pero en menor grado que otros elementos, coincidiendo con lo obtenido en el presente estudio. Hartley et al. (2004) también reportan el hecho de que a pesar de que los óxidos de hierro eran capaces de absorber tanto los aniones como los cationes, no era suficientemente eficaz para la retención de Cu.

En base a los antecedentes expuestos el empleo de nZVI para inmovilizar Cu y Ni presenta mayores eficiencias en aguas (Li & Zhang, 2007; Rathor et al., 2017) que en suelos (Rathor et al., 2017). A su vez es importante destacar que no se han encontrado trabajos anteriores que empleen nZVI para inmovilizar Cu en suelos. Tampoco se han

encontrado antecedentes que analicen el efecto de la presencia conjunta de Ni y Cu en suelo, en la eficacia de la inmovilización mediante nZVI. Sería relevante estudiar dosis mayores de nZVI con el objetivo de evaluar si podría incrementarse la inmovilización de estos metales. En el trabajo de Gil-Díaz et al. (2017b) se estudiaron dosis de 1, 5 y 10% de nZVI para diferentes metales, observando en algunos casos mejores resultados a las dosis más altas.

4.2 Disponibilidad de hierro

Paralelamente, se evaluó el impacto del tratamiento con nZVI en la disponibilidad de Fe en los suelos, mediante los métodos de TCLP y Tessier. En la Figura 8, se muestran los resultados de TCLP para el Fe en los suelos contaminados con Cu, Ni y con Cu+Ni. En los tres suelos se observaron incrementos significativos ($p < 0,001$) de Fe lixiviable al aumentar la dosis de nZVI y respecto a los controles. En promedio, el Fe aumentó de 3 mg/kg en el suelo sin nZVI a 32 y 71 mg/kg en las dosis de 1 y 5%, respectivamente. Gil-Díaz et al. (2014a) también encontraron que los suelos tratados a una dosis de 10% de nZVI lixiviaron cantidades más altas de Fe respecto a suelos no tratados.

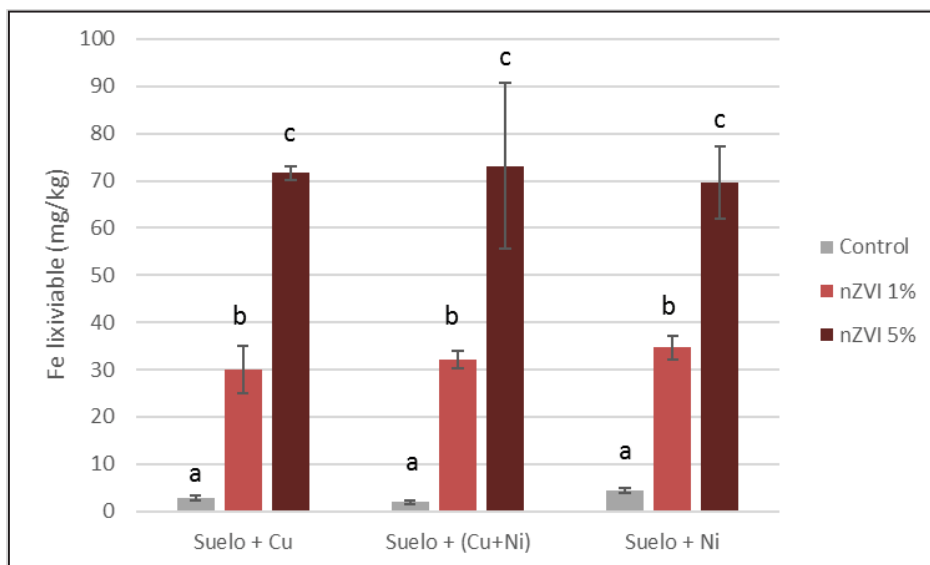


Figura 8. Concentración media de Fe lixiviable según TCLP en los diferentes suelos y tratamientos. Barras con distinta letra difieren significativamente ($p < 0,05$) entre dosis de nZVI para un mismo tipo de contaminación.

En la Tabla 4 se muestra la concentración media de Fe en las fracciones de suelo obtenidas utilizando el procedimiento de extracción secuencial Tessier para las diferentes condiciones investigadas.

Tabla 4. Concentración media y desviación estándar (mg/kg) de Fe en las diferentes fracciones del suelo para cada tratamiento.

Suelo	Dosis nZVI	FFD	FOx	FMO	FR
Cu	control	9,67 ± 0,58 a A	812 ± 72,7 a A	45,7 ± 18,2 a A	6603 ± 635 a A
	1%	115 ± 4,04 b A	2417 ± 240 b A	99,7 ± 45,1 a A	7488 ± 241 ab A
	5%	698 ± 26,9 c A	7064 ± 564 c A	307 ± 70,0 b A	8374 ± 460 b A
Cu+Ni	control	11,3 ± 1,15 a A	751 ± 46,4 a A	35,7 ± 6,03 a A	7349 ± 479 a A
	1%	230 ± 17,6 b B	2207 ± 219 b A	92,7 ± 47,9 a A	6883 ± 242 a B
	5%	681 ± 51,83 c A	7195 ± 361 c A	383 ± 87,1 b A	8448 ± 155 b A
Ni	control	7,97 ± 0,21 a A	498 ± 5,86 a A	39,8 ± 3,22 a A	7055 ± 557 a A
	1%	288 ± 10,4 b B	2054 ± 218 b A	117 ± 48,2 a A	8223 ± 367 b B
	5%	695 ± 22,1 c A	6330 ± 118 c A	389 ± 76,4 b A	9171 ± 109 b B

Medias seguidas de distinta letra presentan diferencias significativas ($p < 0,05$); letras minúsculas comparan entre dosis a un mismo tipo de contaminación; mayúsculas para diferentes tipos de contaminación a la misma dosis. FFD: fácilmente disponible, FOx: óxido de Fe / Mn, FMO: materia orgánica, FR: residual.

En los suelos control, la extracción secuencial reveló que el Fe se encuentra asociado mayoritariamente con la FR. Al añadir las nZVI en los tres tipos de suelos, en general se observó un aumento en la concentración de Fe en todas las fracciones del suelo proporcional a la dosis de nZVI, observándose mayores incrementos en las FFD y FOx. Esto se debe a que el Fe(0) es un buen donante de electrones, actuando como precursor para óxidos de hierro debido a la oxidación espontánea de Fe(0) a Fe(II) y Fe(III) (Kanel et al., 2005; O'Carroll et al., 2013). En promedio, el contenido de Fe a una dosis de 5% de nZVI se incrementó 10 veces en la FOx y 73 veces en las FFD respecto al suelo control. Por el contrario, Gil-Díaz et al. (2016) observaron que la aplicación de nZVI no supuso grandes incrementos de Fe en la FFD, encontrándose principalmente en la FR y FOx después del tratamiento. Esto puede ser debido a las condiciones de pH del suelo ya que en este

trabajo, las condiciones más ácidas podrían haber favorecido la movilidad del Fe, lo que pone de manifiesto la importancia de las propiedades del suelo respecto al impacto de la nanoremediación. Gil-Díaz et al. (2014a) también observaron incrementos significativos del Fe asociado a óxidos respecto al control a una dosis del 10% de nZVI. Este efecto puede ser de gran interés desde el punto de vista de aumentar la fertilidad de los suelos tratados.

4.3 Bioaccesibilidad de los metales mediante el método IVBA (In vitro bioaccessibility assay for lead in soil)

Mediante el método IVBA se evaluó la bioaccesibilidad de Cu y Ni en los suelos control y en los tratados con nZVI (Tabla 5). Los resultados indicaron que el tratamiento con nZVI a las dosis estudiadas no fue eficaz en la disminución de la bioaccesibilidad de Cu en caso de ingesta de los suelos contaminados, ya que no presentaron diferencias significativas respecto al suelo sin tratar. Por el contrario, el tratamiento con nZVI redujo moderadamente la concentración bioaccesible de Ni. La dosis del 5% fue la que presentó mayor eficacia, reduciendo en un 22% el Ni bioaccesible en los suelos contaminados únicamente con este metal y un 16% en el suelo con ambos metales. Estos resultados coinciden con los anteriormente comentados, observando menor efectividad en el caso de contaminación con más de un metal.

Según los resultados obtenidos, en las condiciones de pH y temperatura del sistema digestivo de los seres humanos y animales, las concentraciones de Cu y Ni disponibles serían elevadas, tanto en el suelo control sin nZVI como para los suelos tratados a una dosis de 1 y 5% de nZVI. Esto se debe principalmente a la condición de extrema acidez (pH: 1,5) que aumenta la disponibilidad de los metales. En este sentido, Kumpiene et al. (2006) encontraron que el tratamiento con ZVI no fue efectivo en la reducción de la bioaccesibilidad del Cu. En contraste con lo obtenido en este trabajo, Liu & Zhao (2007) encontraron que la bioaccesibilidad de Cu (a pH 2,3), se redujo significativamente (63 y 66%) cuando suelos ácidos fueron tratados con nanopartículas de fosfato de hierro. Asimismo observaron importantes reducciones en los valores de TCLP y

fracciones biodisponibles de Tessier. En general, estas diferencias pueden ser debidas al mayor pH de la disolución. En tal sentido, Obrycki et al. (2016) compararon la bioaccesibilidad de plomo con solución de glicina a dos valores de pH, 1,5 y 2,5, obteniendo resultados muy diferentes, con mayor grado de inmovilización al mayor pH. Los autores afirmaron que los efectos del tratamiento tienden a ser más pronunciados a pH 2,5 porque la solubilidad del Pb disminuye a medida que el pH aumenta.

Tabla 5. Concentración bioaccesible media y desviación estándar (mg/kg) de Cu y Ni de los suelos para cada tratamiento

Suelo	Metal	Dosis	Concentración
Cu	Cu	Control	940 ± 16,6 a A
		1% nZVI	941 ± 79,0 a A
		5% nZVI	890 ± 26,7 a A
Cu+Ni	Cu	Control	984 ± 39,7 a A
		1% nZVI	939 ± 48,4 a A
		5% nZVI	905 ± 3,80 a A
Ni	Ni	Control	2076 ± 107 b A
		1% nZVI	1985 ± 142 ab A
		5% nZVI	1752 ± 34,3 a B
Ni	Ni	Control	2033 ± 44,0 c A
		1% nZVI	1841 ± 39,6 b A
		5% nZVI	1583 ± 30,1 a A

Medias seguidas de distinta letra presentan diferencias significativas ($p < 0,05$); letras minúsculas comparan entre dosis para un mismo tipo de contaminación; mayúsculas para diferentes tipos de contaminación a la misma dosis.

4.4 Impacto sobre las propiedades físico-químicas del suelo

En la Tabla 6 se muestran las propiedades físico-químicas de los suelos después del tratamiento a diferentes dosis de nZVI. En general se observó un ligero aumento de pH al añadir las nZVI, esto se debe a que el pH de la suspensión de nanopartículas es

fuertemente alcalino (alrededor de 11-12). Este efecto también fue observado por otros autores en suelos tratados con nZVI (Gil-Díaz et al., 2016, 2017b). Respecto a la conductividad eléctrica, en el suelo contaminado con Cu no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. En los suelos contaminados con Ni y Cu+Ni se observó una ligera disminución de la conductividad eléctrica al aumentar la dosis de nZVI, lo que podría relacionarse con la inmovilización de Ni y Cu, y de otros iones como nitratos, percloratos y fosfatos (Li & Zhang, 2007; Wu et al., 2013). El efecto fue más notorio para la contaminación con Ni, probablemente debido a que la efectividad de la inmovilización fue mayor para este metal que para el Cu. El contenido de P asimilable disminuyó significativamente al aumentar la dosis de nZVI debido a la capacidad de estas nanopartículas para inmovilizar fosfatos. Gil-Díaz et al. (2016) en suelo y Wu et al. (2013) en agua, observaron importantes disminuciones de P asimilable en tratamientos con nZVI. El Na asimilable aumentó significativamente al aumentar la dosis de nZVI debido al surfactante empleado para estabilizar las nanopartículas (sal sódica del ácido poliacrílico), como previamente se explicó en la sección de materiales y métodos. Sin embargo, los valores obtenidos son normales para este parámetro en los suelos. Gil-Díaz et al. (2016) también obtuvieron incrementos significativos de Na al aplicar las nZVI en el suelo. Parámetros como materia orgánica, N, Ca, Mg, K, no mostraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. En base a estos resultados, puede decirse que la aplicación de las nZVI no produjo efectos negativos en las propiedades físico-químicas del suelo bajo las condiciones de ensayo.

Tabla 6. Valores medios de parámetros físico-químicos de los suelos contaminado con Cu, Ni y (Cu+Ni) en los diferentes tratamientos.

Parámetros	Tratamientos								
	Suelo + Cu			Suelo + Ni			Suelo + (Cu+Ni)		
	Control	1% nZVI	5% nZVI	Control	1% nZVI	5% nZVI	Control	1% nZVI	5% nZVI
pH	4,63 ± 0,02 a	5,33 ± 0,16 b	5,98 ± 0,05 c	5,39 ± 0,02 b	5,26 ± 0,01 a	5,66 ± 0,01 c	4,58 ± 0,01 a	4,77 ± 0,01 b	5,24 ± 0,06 c
CE (dS/m)	1,36 ± 0,10 a	1,27 ± 0,12 a	1,21 ± 0,22 a	2,15 ± 0,07 c	1,97 ± 0,03 b	1,53 ± 0,07 a	2,97 ± 0,04 b	2,87 ± 0,11 b	2,03 ± 0,08 a
N (%)	0,06 ± 0,00 a	0,06 ± 0,01 a	0,06 ± 0,00 a	0,06 ± 0,00 a	0,06 ± 0,00 a	0,06 ± 0,00 a	0,06 ± 0,00 a	0,06 ± 0,00 a	0,06 ± 0,00 a
MO (%)	0,86 ± 0,08 a	0,91 ± 0,04 a	0,79 ± 0,02 a	0,85 ± 0,12 a	0,80 ± 0,06 a	0,75 ± 0,08 a	0,83 ± 0,01 a	0,71 ± 0,07 a	0,84 ± 0,12 a
P (mg/kg)	32,7 ± 1,20 c	21,00 ± 1,00 b	10,7 ± 0,60 a	20,3 ± 0,60 c	15,7 ± 1,20 b	12,3 ± 1,50 a	27,7 ± 1,50 b	15,3 ± 1,20 a	12,3 ± 1,20 a
Ca (mg/kg)	619 ± 140 a	829 ± 64,0 a	750 ± 45,0 a	835 ± 37,0 a	824 ± 40,0 a	769 ± 17,0 a	761 ± 179 a	676 ± 87,0 a	750 ± 45,0 a
Mg (mg/kg)	84,0 ± 8,70 a	90,3 ± 12,3 a	84,3 ± 9,00 a	85,7 ± 4,00 a	81,0 ± 2,0 b a	71,7 ± 6,10 a	87,7 ± 3,50 a	94,7 ± 3,20 a	78,7 ± 15,30 a
Na (mg/kg)	22,0 ± 2,60 a	49,3 ± 2,50 b	107 ± 14,0 c	21,7 ± 2,30 a	43,3 ± 1,20 b	86,7 ± 6,0 c	28,7 ± 5,50 a	48,3 ± 7,80 b	94,3 ± 8,30 c
K (mg/kg)	171 ± 9,00 a	185 ± 5,00 a	178 ± 8,00 a	180 ± 1,00 a	184 ± 8,00 a	164 ± 4,00 a	184 ± 5,00 a	185 ± 3,00 a	169 ± 8,00 a

Valores seguidos de distinta letra presentan diferencias significativas entre dosis para el mismo tipo de contaminación ($p < 0,05$). CE: conductividad eléctrica; MO: materia orgánica.

4.5 Impacto en la fitotoxicidad de los suelos

Los resultados obtenidos a partir del test de germinación de Zucconi et al. (1985) permitieron evaluar la fitotoxicidad de las muestras de suelo contaminado (control) y del tratado con nZVI. Esta prueba ha sido aplicada para evaluar la fitotoxicidad de suelos contaminados (Boluda et al., 2011; Devesa-Rey et al., 2008).

Las especies utilizadas en el ensayo fueron *Medicago sativa* y *Vicia sativa*. De acuerdo con Zucconi (Zucconi et al., 1985) se establecieron los siguientes criterios: valores de Índice de Germinación (IG) inferiores al 50% sugieren una fitotoxicidad alta (TA); los valores IG entre el 50% y el 80% indican fitotoxicidad moderada (TM); y valores IG superiores al 80% sugieren que no hay fitotoxicidad (ST). En las Figuras 9 y 11 se presentan los resultados del Índice de germinación, y en las Figuras 10 y 12 se muestran fotografías de las placas Petri con las semillas de *Medicago* y *Vicia* germinadas en los diferentes tratamientos.

En los suelos contaminados únicamente con Cu se observó que para ambas especies no hubo diferencias significativas entre los tres tratamientos y que, tanto el suelo control como el tratado con nZVI no presentaron toxicidad para estas especies.

En los suelos contaminados únicamente con Ni, en ambas especies se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la dosis de nZVI al 5% y los demás tratamientos. Tanto el suelo control, como el suelo tratado a una dosis del 1% de nZVI presentaron una alta toxicidad para estas especies, en cambio, el suelo tratado a una dosis del 5% de nZVI presentó moderada toxicidad.

En los suelos contaminados con Cu y Ni de manera conjunta, se observó que en *Medicago*, tanto el suelo control como los tratamientos a 1 y 5% de nZVI presentaron una alta toxicidad para esta especie. En *Vicia* el suelo control y el suelo tratado a una dosis del 1% de nZVI presentaron alta toxicidad, en cambio, el suelo tratado a una dosis del 5% de nZVI presentó moderada toxicidad ($p < 0,05$).

Al comparar los resultados de IG obtenidos para ambas especies en suelos contaminados con Ni con los contaminados con Cu+Ni, se observó que la reducción de la fitotoxicidad es menor para los suelos contaminados con ambos metales. Esto puede

relacionarse con los resultados obtenidos en TCLP y Tessier, que indicaron una reducción significativa de la efectividad de los tratamientos de las nZVI para el Ni en presencia de Cu. Es decir que al haber mayor concentración de metal disponible en los suelos contaminados con ambos metales, la fitotoxicidad del suelo fue mayor. Kumpiene et al. (2006) encontraron una reducción de la fitotoxicidad al tratar el suelo con ZVI como consecuencia de la disminución de la disponibilidad de As y Cr. Gil-Díaz et al. (2014a) obtuvieron una mayor efectividad en la inmovilización de As en suelo aplicando una dosis más alta (10% nZVI), así como una mayor reducción de la fitotoxicidad del suelo. En este sentido, dada la moderada efectividad de las nZVI para la inmovilización de Cu y Ni encontrada en el presente trabajo, se podrían ensayar dosis superiores de nZVI.

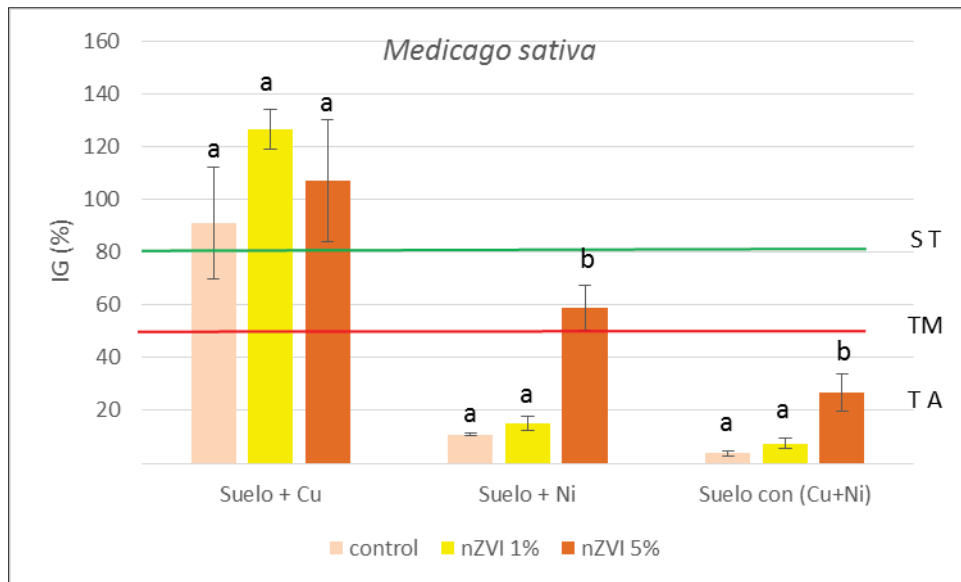


Figura 9. Índice de germinación (%) para *Medicago sativa* en los distintos tratamientos. Barras con distinta letra difieren significativamente entre dosis para el mismo tipo de contaminación ($p < 0,05$).

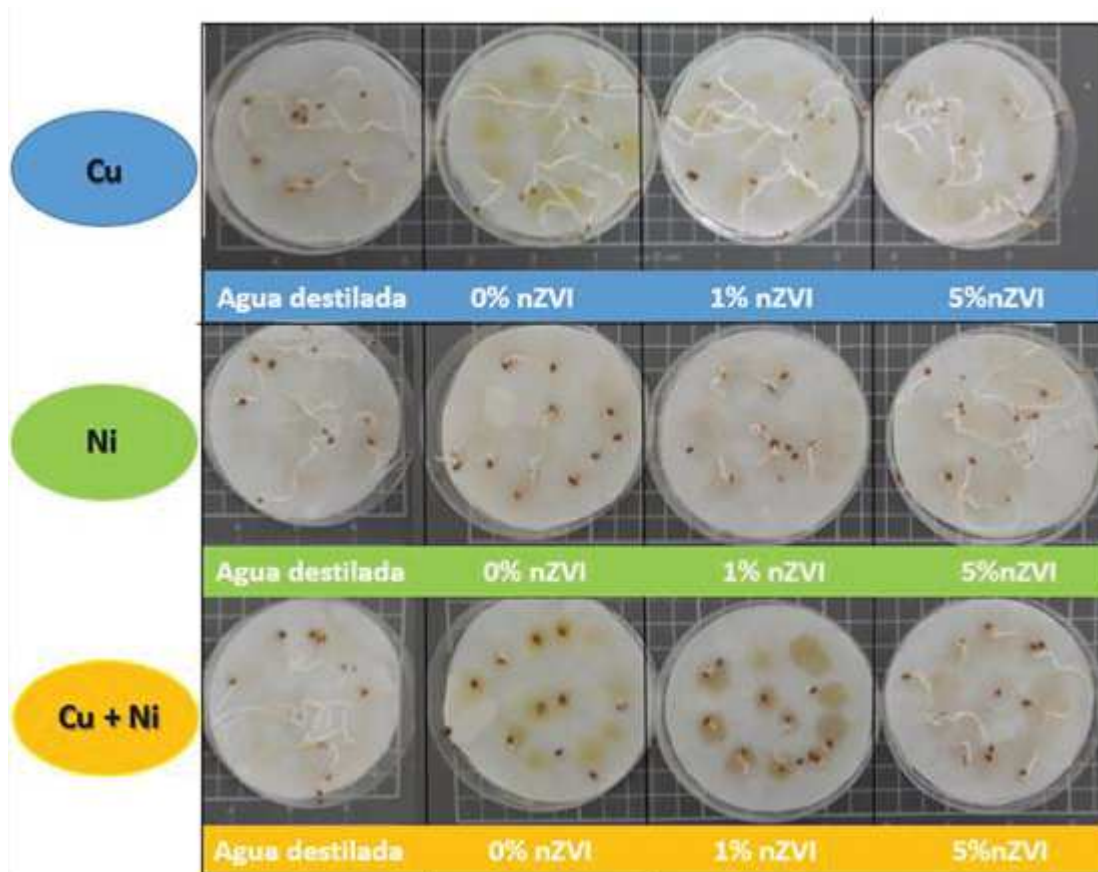


Figura 10. Germinación de *Medicago sativa* en extractos de suelos contaminados con Cu; Ni; Cu+Ni en cada uno de los tratamientos.

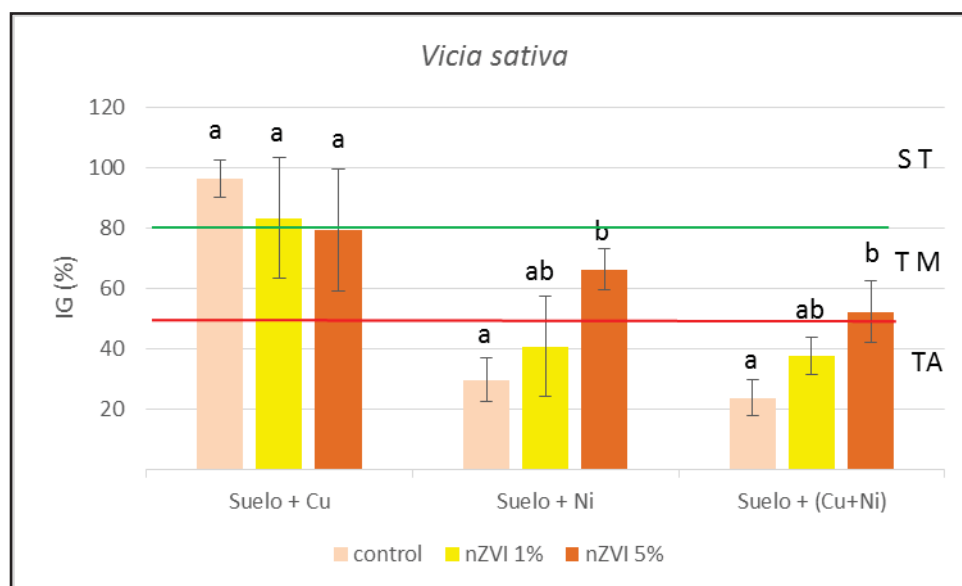


Figura 11. Índice de germinación (%) para *Vicia sativa* en los distintos tratamientos. Barras con distinta letra difieren significativamente entre dosis para el mismo tipo de contaminación ($p < 0,05$).

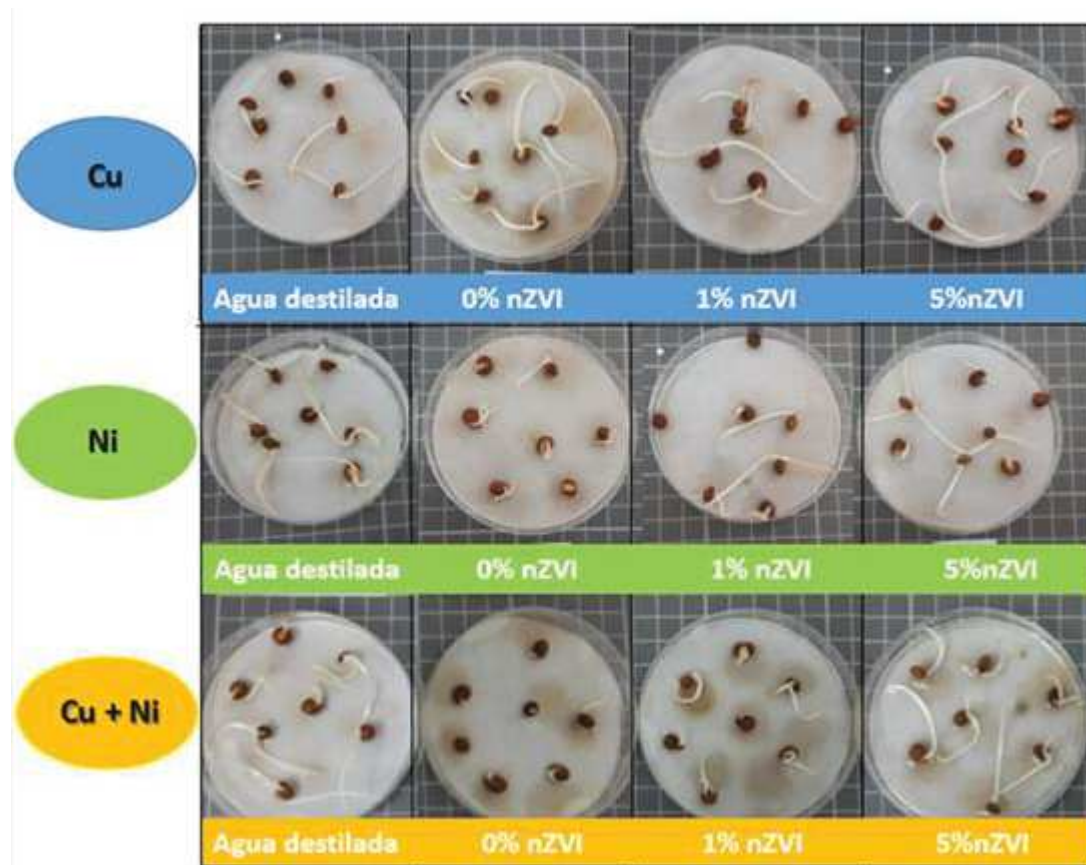


Figura 12. Germinación de *Vicia sativa* en extractos de suelos contaminados con Cu; Ni; Cu+Ni en cada uno de los tratamientos.

5. CONCLUSIONES

Los métodos Tessier y TCLP fueron útiles para evaluar la biodisponibilidad de Cu y Ni en el suelo, y permitieron analizar la efectividad de la aplicación de las diferentes dosis de nZVI y el efecto de la presencia de ambos metales de manera simultánea.

La aplicación de nZVI resultó ser más efectiva para la inmovilización de Ni que para el Cu en un suelo ácido en las condiciones ensayadas, obteniéndose reducciones del potencial de lixiviación de alrededor del 25% para el Cu y 48% para el Ni.

Tanto para el Cu como para el Ni, la inmovilización fue dependiente de la dosis de nZVI y de la presencia de otros cationes metálicos. Al aumentar la dosis se redujo la disponibilidad de estos metales, obteniéndose mayores efectividades a dosis de 5%. La presencia de otro metal disminuyó la efectividad del tratamiento. Este efecto fue más acusado en la inmovilización de Ni en presencia de Cu.

La aplicación de las nZVI aumentó la disponibilidad de Fe en el suelo. A su vez, debido a las características químicas de la suspensión de nZVI, se produjo un incremento en el contenido de Na disponible en el suelo y un ligero aumento de pH, mientras que el contenido de fósforo asimilable disminuyó. En general a las dosis de nZVI ensayadas, estas variaciones no suponen un impacto negativo en las propiedades del suelo.

La aplicación de las nZVI redujo la toxicidad del Ni en la germinación de *Vicia sativa* y *Medicago sativa*. En el caso del Cu no se observó toxicidad a ninguna de las dosis ensayadas.

Teniendo en cuenta estos resultados se puede concluir que el empleo de nZVI para la inmovilización de Ni es un método prometedor para la remediación de suelos ácidos contaminados con este metal. Respecto al Cu, el tratamiento presentó una eficacia limitada en las condiciones ensayadas. Serían necesarios posteriores estudios que evalúen otras dosis de nZVI, así como la estabilidad de la inmovilización a largo plazo.

6. AGRADECIMIENTOS

Se agradece la financiación para la realización del presente trabajo a los Proyectos CTM2016-78222-C2-1-R (MINECO) y FP16-NANOREMED (IMIDRA, Comunidad de Madrid).

A mis directoras, M^ª Carmen Lobo Bedmar y Mar Gil Díaz por el apoyo durante del desarrollo de este trabajo y, por las explicaciones y los conocimientos transmitidos. Por facilitarme todos los recursos para llevar a cabo este trabajo.

Al personal técnico del IMIDRA por la ayuda y enseñanzas respecto a metodologías de trabajo.

Al programa BEC.AR (Argentina) por otorgarme la beca que me permitió realizar el Máster Universitario en Restauración de Ecosistemas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, N., Jaspers, V., Chaudhry, M., Ali, S., & Malik, R. (2015). Influence of taxa, trophic level, and location on bioaccumulation of toxic metals in bird's feathers: A preliminary biomonitoring study using multiple bird species from Pakistan. *Chemosphere*, 120, 527-537.
- Adriano, D. (2001). Trace elements in terrestrial environments. New York: Springer.
- Andreu, V., Gimeno-García, E., Pascual, J., Vazquez-Roig, P., & Picó, Y. (2016). Presence of pharmaceuticals and heavy metals in the waters of a Mediterranean coastal wetland: Potential interactions and the influence of the environment. *Science of the Total Environment*, 540, 278-286.
- Andrew, A., Warren, A., Barchowsky, A., Temple, K., Klei, L., & Soucy, N. et al. (2003). Genomic and Proteomic Profiling of Responses to Toxic Metals in Human Lung Cells. *Environmental Health Perspectives*, 111 (6).
- ATSDR, 2004. DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS de los EE.UU., Servicio de Salud Pública Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs132.pdf Acceso abril de 2017.
- ATSDR, 2005. DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS de los EE.UU., Servicio de Salud Pública Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs15.pdf Acceso abril de 2017.
- Bayen, S. (2012). Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems: A review. *Environment International*, 48, 84-101.

- BOCM Boletín Oficial de la Comunidad de Madrid, Agosto 11, 2006. Niveles genéricos de referencia de metales pesados y otros elementos traza en suelos contaminados de la comunidad de Madrid. Orden 2770/2006. http://www.madrid.org/rlma_web/html/web/FichaNormativa.icm%3FID%3D1073. Acceso febrero de 2017.
- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., Kirkham, M.B., & Scheckel, K. (2014). Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils - to mobilize or to immobilize? *J. Hazard. Mater.*, 266, 141-166.
- Boluda, R., Roca-Pérez, L., & Marimón, L. (2011). Soil plate bioassay: An effective method to determine ecotoxicological risks. *Chemosphere*, 84(1), 1-8.
- Cardona García, A. I., 2012. Procesos de atenuación natural de la degradación del suelo. En Millán, R. y Lobo, M.C. (eds.) *Evaluación y recuperación de emplazamientos degradados y/o contaminados*, capítulo 4, pp. 51-80. CIEMAT.
- Cecchin, I., Reddy, K., Thomé, A., Tessaro, E., & Schnaid, F. (2017). Nanobioremediation: Integration of nanoparticles and bioremediation for sustainable remediation of chlorinated organic contaminants in soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 119, 419-428.
- COM (2006)/231. Estrategia temática para la protección del suelo. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=LEGISSUM:l28181&from=ES> Acceso agosto de 2017.
- Devesa-Rey, R., Moldes, A., Díaz-Fierros, F., & Barral, M. (2008). Toxicity of Anllóns River Sediment Extracts Using Microtox and the Zucconi Phytotoxicity Test. *Bulletin of Environmental Contamination And Toxicology*, 80(3), 225-230.
- Gil-Díaz, M., Alonso, J., Rodríguez-Valdés, E., Pinilla, P., & Lobo, M. (2014a). Reducing the mobility of arsenic in brownfield soil using stabilised zero-valent iron nanoparticles. *Journal of Environmental Science And Health, Part A*, 49(12), 1361-1369.

- Gil-Díaz, M., Pérez-Sanz, A., Ángeles Vicente, M., & Carmen Lobo, M. (2014b). Immobilisation of Pb and Zn in Soils Using Stabilised Zero-valent Iron Nanoparticles: Effects on Soil Properties. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 42(12), 1776-1784.
- Gil-Díaz, M., Díez-Pascual, S., González, A., Alonso, J., Rodríguez-Valdés, E., Gallego, J., & Lobo, M. (2016). A nanoremediation strategy for the recovery of an As-polluted soil. *Chemosphere*, 149, 137-145.
- Gil-Díaz, M., Alonso, J., Rodríguez-Valdés, E., Gallego, J., & Lobo, M. (2017a). Comparing different commercial zero valent iron nanoparticles to immobilize As and Hg in brownfield soil. *Science Of The Total Environment*, 584-585, 1324-1332.
- Gil-Díaz, M., Pinilla, P., Alonso, J., & Lobo, M. (2017b). Viability of a nanoremediation process in single or multi-metal(loid) contaminated soils. *Journal Of Hazardous Materials*, 321, 812-819.
- Gupta, K., Bhattacharya, S., Chattopadhyay, D., Mukhopadhyay, A., Biswas, H., & Dutta, J. et al. (2011). Ceria associated manganese oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and arsenic(V) sorption behavior. *Chemical Engineering Journal*, 172(1), 219-229.
- Hartley, W., Edwards, R., & Lepp, N. (2004). Arsenic and heavy metal mobility in iron oxide-amended contaminated soils as evaluated by short- and long-term leaching tests. *Environmental Pollution*, 131(3), 495-504.
- Kabata-Pendias, A. (2011). Trace elements in soils and plants. Boca Raton: CRC.
- Kanel, S., Manning, B., Charlet, L., & Choi, H. (2005). Removal of Arsenic(III) from Groundwater by Nanoscale Zero-Valent Iron. *Environmental Science & Technology*, 39(5), 1291-1298.

- Karn, B., Kuiken, T., & Otto, M. (2009). Nanotechnology and in Situ Remediation: A Review of the Benefits and Potential Risks. *Environmental Health Perspectives*, 117(12), 1823-1831.
- Khan, S., Rehman, S., Zeb Khan, A., Amjad Khan, M., & Tahir Shah, M. (2010). Soil and vegetables enrichment with heavy metals from geological sources in Gilgit, northern Pakistan. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 73(7), 1820-1827.
- Kidd, P., Mench, M., Álvarez-López, V., Bert, V., Dimitriou, I., & Friesl-Hanl, W. et al. (2015). Agronomic Practices for Improving Gentle Remediation of Trace Element-Contaminated Soils. *International Journal Of Phytoremediation*, 17(11), 1005-1037.
- Klimkova, S., Cernik, M., Lacinova, L., Filip, J., Jancik, D., & Zboril, R. (2011). Zero-valent iron nanoparticles in treatment of acid mine water from in situ uranium leaching. *Chemosphere*, 82(8), 1178-1184.
- Kumar, M., Gogoi, A., Kumari, D., Borah, R., Das, P., Mazumder, P., & Tyagi, V. (2017). Review of Perspective, Problems, Challenges, and Future Scenario of Metal Contamination in the Urban Environment. *Journal Of Hazardous, Toxic, And Radioactive Waste*, 21(4), 04017007.
- Kumari, B., & Singh, D. (2016). A review on multifaceted application of nanoparticles in the field of bioremediation of petroleum hydrocarbons. *Ecological Engineering*, 97, 98-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.08.006>
- Kumpiene, J., Ore, S., Renella, G., Mench, M., Lagerkvist, A., & Maurice, C. (2006). Assessment of zerovalent iron for stabilization of chromium, copper, and arsenic in soil. *Environmental Pollution*, 144(1), 62-69.
- Li, S., Wang, W., Yan, W., & Zhang, W. (2014). Nanoscale zero-valent iron (nZVI) for the treatment of concentrated Cu(II) wastewater: a field demonstration. *Environ. Sci.: Processes Impacts*, 16(3), 524-533.

- Li, X., & Zhang, W. (2007). Sequestration of Metal Cations with Zerovalent Iron Nanoparticles. A Study with High Resolution X-ray Photoelectron Spectroscopy (HR-XPS). *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(19), 6939-6946.
- Li, X. Q., & Zhang, W. X. (2006). Iron nanoparticles: The core-shell structure and unique properties for Ni(II) sequestration. *Langmuir*, 22(10), 4638-4642.
- Li, X., Cao, J., & Zhang, W. (2008). Stoichiometry of Cr(VI) Immobilization Using Nanoscale Zerovalent Iron (nZVI): A Study with High-Resolution X-Ray Photoelectron Spectroscopy (HR-XPS). *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(7), 2131-2139.
- Liu, R., Zhao, D. (2007). In situ immobilization of Cu(II) in soils using a new class of iron phosphate nanoparticles. *Chemosphere*, 68(10), 1867-1876.
- MAPA (1994). *Métodos Oficiales de Análisis*, vol. III, Secretaría General Técnica Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, 219–324.
- Marín, A., Andrades, M., Iñigo, V., & Jiménez-Ballesta, R. (2015). Mn and Ni contents in soils of a qualified denomination of origin region: Rioja D.O.Ca, Spain. *International Journal of Environmental Studies*, 73(1), 32-47.
- Michálková, Z., Komárek, M., Šillerová, H., Della Puppa, L., Joussein, E., & Bordas, F. et al. (2014). Evaluating the potential of three Fe- and Mn-(nano)oxides for the stabilization of Cd, Cu and Pb in contaminated soils. *Journal Of Environmental Management*, 146, 226-234.
- Moazallahi, M., Baghernejad, M., Jafari Haghighi, M., & Saffari, M. (2016). Stabilization of lead in two artificial contaminated calcareous soils using stabilized nanoscale zero-valent iron particles with/without chelating agents. *Archives of Agronomy And Soil Science*, 63(4), 565-577.
- Mueller, N., Braun, J., Bruns, J., Černík, M., Rissing, P., Rickerby, D., & Nowack, B. (2011). Application of nanoscale zero valent iron (NZVI) for groundwater

remediation in Europe. *Environmental Science And Pollution Research*, 19(2), 550-558.

Nicholson, F., Smith, S., Alloway, B., Carlton-Smith, C., & Chambers, B. (2003). An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Science of The Total Environment*, 311(1-3), 205-219.

O'Carroll, D., Sleep, B., Krol, M., Boparai, H., & Kocur, C. (2013). Nanoscale zero valent iron and bimetallic particles for contaminated site remediation. *Advances in Water Resources*, 51, 104-122.

Obrycki, J., Scheckel, K., & Basta, N. (2016). Soil solution interactions may limit Pb remediation using P amendments in an urban soil. *Environmental Pollution*, 220, 549-556.

Olsen, J.K.; Cole, C.V.; Watanabe, F.S.; Dean, L.A. (1954). Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate. USDA. Circ. 939. US Gov. Print. Office. Washington, D.C.

Pasquet, C., Le Monier, P., Monna, F., Durlet, C., Brigaud, B., & Losno, R. et al. (2016). Impact of nickel mining in New Caledonia assessed by compositional data analysis of lichens. *Springerplus*, 5(1).

Qu, C., Ma, Z., Yang, J., Liu, Y., Bi, J., & Huang, L. (2012). Human Exposure Pathways of Heavy Metals in a Lead-Zinc Mining Area, Jiangsu Province, China. *Plos ONE*, 7(11), e46793.

Rathor, G., Chopra, N., & Adhikari, T. (2017). Remediation of Nickel Ion from Soil and Water Using Nano Particles of Zero-Valent Iron (nZVI). *Oriental Journal of Chemistry*, 33(2), 1025-1029.

Satpathy, D., Reddy, M., & Dhal, S. (2014). Risk Assessment of Heavy Metals Contamination in Paddy Soil, Plants, and Grains (*Oryza sativa*L.) at the East Coast of India. *Biomed Research International*, 2014, 1-11.

- Shen, Y., Tang, J., Nie, Z., Wang, Y., Ren, Y., & Zuo, L. (2009). Preparation and application of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles for wastewater purification. *Separation and Purification Technology*, 68(3), 312-319.
- Shi, W., Shao, H., Li, H., Shao, M., & Du, S. (2009). Progress in the remediation of hazardous heavy metal-polluted soils by natural zeolite. *Journal of Hazardous Materials*, 170(1), 1-6.
- Sipter, E., Rózsa, E., Gruiz, K., Tátrai, E., & Morvai, V. (2008). Site-specific risk assessment in contaminated vegetable gardens. *Chemosphere*, 71(7), 1301-1307.
- Stefaniuk, M., Oleszczuk, P., & Ok, Y. (2016). Review on nano zerovalent iron (nZVI): From synthesis to environmental applications. *Chemical Engineering Journal*, 287, 618-632.
- Tessier, A., Campbell, P., & Bisson, M. (1979). Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry*, 51(7), 844-851.
- Tiberg, C., Kumpiene, J., Gustafsson, J., Marsz, A., Persson, I., Mench, M., & Kleja, D. (2016). Immobilization of Cu and As in two contaminated soils with zero-valent iron – Long-term performance and mechanisms. *Applied Geochemistry*, 67, 144-152.
- Tóth, G., Hermann, T., Szatmári, G., & Pásztor, L. (2016). Maps of heavy metals in the soils of the European Union and proposed priority areas for detailed assessment. *Science of The Total Environment*, 565, 1054-1062.
- USDA (United States Department of Agriculture) (1993). *Soil Survey Manual*. [online] Disponible en: http://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/ref/?cid=nrcs142p2_054262. Acceso mayo 2017.

- US-EPA (1992). Environmental Protection Agency. Method 1311. Toxicity characteristic leaching procedure.
<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1311.pdf>
- US-EPA (2013). Environmental Protection Agency. Method 1340. Validated Test Method 1340: In Vitro Bioaccessibility Assay for Lead in Soil.
<https://www.epa.gov/hw-sw846/validated-test-method-1340-vitro-bioaccessibility-assay-lead-soil>
- Vangronsveld, J., & Cunningham, S.D., 1998. Introduction to the concepts. In: Vangronsveld, J., & Cunningham, S.D. (Eds.), Metal-contaminated Soils. In Situ Inactivation and Phytoremediation. Springer, New York, pp. 1e15.
- Wang, J., Liu, G., Li, T., Zhou, C., & Qi, C. (2015). Zero-Valent Iron Nanoparticles (NZVI) Supported by Kaolinite for Cu and Ni Ion Removal by Adsorption: Kinetics, Thermodynamics, and Mechanism. Australian Journal of Chemistry.
- Wang, Y., Fang, Z., Kang, Y., & Tsang, E. (2014). Immobilization and phytotoxicity of chromium in contaminated soil remediated by CMC-stabilized nZVI. Journal of Hazardous Materials, 275, 230-237.
- Wu, D., Shen, Y., Ding, A., Qiu, M., Yang, Q., & Zheng, S. (2013). Phosphate removal from aqueous solutions by nanoscale zero-valent iron. Environmental Technology, 34(18), 2663-2669.
- Xiao, S., Ma, H., Shen, M., Wang, S., Huang, Q., & Shi, X. (2011). Excellent copper(II) removal using zero-valent iron nanoparticle-immobilized hybrid electrospun polymer nanofibrous mats. Colloids and Surfaces A: Physicochemical And Engineering Aspects, 381(1-3), 48-54.
- Zhang, X., Zhong, T., Liu, L., & Ouyang, X. (2015). Impact of Soil Heavy Metal Pollution on Food Safety in China. PLOS ONE, 10(8), e0135182.

Zou, B., Jiang, X., Duan, X., Zhao, X., Zhang, J., Tang, J., & Sun, G. (2017). An Integrated H-G Scheme Identifying Areas for Soil Remediation and Primary Heavy Metal Contributors: A Risk Perspective. *Scientific Reports*, 7(1).

Zucconi, F., Monaco, A., Forte, M., & De Bertoldi, M. (1985). Phytotoxins during the stabilization of organic matter. In *Composting of agricultural and other wastes*; Gasser, J.K.R., Ed.; Elsevier, 73-85.