



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO**  
**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN DE LA**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

AGO 2013



**INFORME FINAL**

**TÍTULO:**

**SELECCIÓN DE PLANTAS QUE FAVOREZCAN LA  
 BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS  
 DE PLOMO, CINC Y NIQUEL**

**Lic. José Humberto Soriano Francia**  
**(Del 01 - 09 - 2011 al 31 - 08 - 2013 RR. N° 968-2011R)**

**CALLAO - PERÚ**  
**2013**

## INDICE

	<b>Págs.:</b>
<b>I. RESUMEN</b> / .....	<b>5</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> / .....	<b>7</b>
2.1 Exposición del tema .....	7
2.2 Objetivos y Alcances de la Investigación .....	8
2.2.1 Objetivo General .....	8
2.2.2 Objetivos Específicos .....	9
2.2.3 Alcances de la Investigación .....	9
2.3 Planteamiento del Problema de la Investigación ..	9
2.3.1 Descripción y Análisis del Tema .....	14
2.3.2 Planteamiento del problema .....	15
2.3.3 Enunciado del problema .....	15
2.3.4 Justificación de la Investigación .....	15
<b>III. MARCO TEÓRICO</b> / .....	
3.1 Definiciones .....	18
a) Suelo .....	18
b) Suelo Contaminado .....	18

3.2	Antecedentes.....	18
3.2.1	Causas de la contaminación del suelo .....	18
3.2.2	Clasificación .....	19
3.2.3	El problema de la Basura .....	19
3.2.4	Degradación del suelo .....	19
3.3	Tipos de degradaciones .....	22
3.3.1	Degradación de la fertilidad .....	22
3.3.2	Erosión .....	23
3.4	Formas de recuperar suelos contaminados .....	24
3.4.1	Tipos de contaminantes que se pueden eliminar .....	28
3.4.2	Fitoextracción .....	30
a)	Fitoestabilización .....	30
b)	Fitodegradación .....	31
c)	Fitoestimulación .....	31
d)	Fitovolatilización .....	31
<b>IV.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> ✓	
4.1	Material Vegetal .....	32
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS</b> ✓	<b>37</b>
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> ✓	<b>43</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIALES</b> ✓	<b>45</b>
<b>VIII.</b>	<b>APENDICE</b> .....	<b>47</b>
XV	FAZTAW ANEXOS	

**DEDICATORIA:**

A la Doctora *Lucía Herold* mi profesora, por sus sabios consejos que siempre están presente en mi persona.

***Pensamiento:***

*Si bien es cierto que la curiosidad es un buen principio para generar una investigación, la suma de esas curiosidades nos va a permitir realizar trabajos investigativos de intereses colectivos.*

***O.M.C.H.H***

## **ABSTRACT**

Bioremediation is emerging as a branch of biotechnology that seeks to solve the pollution problems through the use of living organisms (microorganisms and plants) able to degrade compounds that cause imbalance in the environment, either soil, sediment, sludge or sea.

The process followed in this work is the Phytoremediation is the use of plants to clean up contaminated environments. Although in developing a strategy is very interesting due to the ability of some plant species absorb, accumulate% tolerate high concentrations of pollutants such as heavy metals, organic compounds and radioactivos. Phytoremediation offers some advantages and disadvantages compared to other types of bioremediation.

Phytoremediation is based primarily on the interactions between plants, soil and microorganisms. The soil is a complex structure that supports the development of plants and microorganisms that feed on organic or inorganic compounds that comprise it. When any of these compounds are in excess with respect to the initial state usually, it is described as a contaminated soil.

Then look for plants is of great importance for conserving the environment by heavy metals in a range not pollute the soil very large, causing desertification.

## **I. RESUMEN**

La biorremediación surge como una rama de la biotecnología que busca resolver los problemas de contaminación mediante el uso de seres vivos (microorganismos y plantas) capaces de degradar compuestos que provocan desequilibrio en el medio ambiente, ya sea suelo, sedimento, fango o mar.

El proceso que sigue el presente trabajo es la fitorremediación que es el uso de plantas para limpiar ambientes contaminados. Aunque se encuentra en desarrollo, constituye una estrategia muy interesante, debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de absorber, acumular %, tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos. La fitorremediación ofrece algunas ventajas y desventajas frente a los otros tipos de biorremediación.

La fitorremediación se basa principalmente en las interacciones entre las plantas, el suelo y los microorganismos. El suelo es una compleja estructura que sirve de soporte para el desarrollo de las plantas y los microorganismos que se alimentan de los compuestos orgánicos o inorgánicos que lo componen. Cuando alguno de estos compuestos se encuentran en exceso con respecto al estado inicial del suelo, éste se describe como un suelo contaminado.

Luego tiene gran importancia buscar plantas adecuadas para la conservación del medio ambiente, por que los metales pesados en un rango no muy grande contaminan los suelos, provocando desertificación.

## II. INTRODUCCIÓN

### 2.1 EXPOSICIÓN DEL TEMA

El crecimiento de la población y el avance de las actividades industriales a partir del siglo XIX trajeron aparejados serios problemas de contaminación ambiental. Desde entonces, los países generan más desperdicios, muchos de ellos no biodegradables o que se degradan muy lentamente en la naturaleza, lo que provoca su acumulación en el ambiente sin tener un destino seguro o un tratamiento adecuado. De este modo, en lugares donde no existe control sobre la emisión y el tratamiento de los desechos, es factible encontrar una amplia gama de contaminantes. Habitualmente, los casos de contaminación que reciben mayor atención en la prensa son los derrames de petróleo. Pero, en el mundo constantemente están sucediendo acontecimientos de impacto negativo sobre el medio ambiente, incluso en el entorno directo, generados por un gran abanico de agentes contaminantes que son liberados al ambiente. Un ejemplo lo constituyen algunas industrias químicas que producen compuestos cuya estructura química difiere de los compuestos naturales, y que son utilizados como refrigerantes, disolventes, plaguicidas, plásticos y detergentes. El problema principal de estos compuestos es que son resistentes a la biodegradación, por lo cual se acumulan y persisten en el ambiente y lo perjudica tanto como a los seres vivos, entre ellos el ser humano.



En las últimas décadas, entre las técnicas empleadas para contrarrestar los efectos de los contaminantes, se comenzó a utilizar una práctica llamada biorremediación. El término biorremediación fue acuñado a principios de la década de los '80, y proviene del concepto de remediación, que hace referencia a la aplicación de estrategias físico-químicas para evitar el daño y la contaminación en suelos. Los científicos se dieron cuenta que era posible aplicar estrategias de remediación que fuesen biológicas, basadas esencialmente en la observación de la capacidad de los microorganismos de degradar en forma natural ciertos compuestos contaminantes.

Entonces, la biorremediación surge como una rama de la biotecnología que busca resolver los problemas de contaminación mediante el uso de seres vivos (microorganismos y plantas) capaces de degradar compuestos que provocan desequilibrio en el medio ambiente, ya sea suelo, sedimento, fango o mar.

## **2.2 OBJETIVOS Y ALCANCES DE LA INVESTIGACIÓN**

### **2.2.1 OBJETIVO GENERAL**

Seleccionar plantas que cumplan un papel biorremediador de suelos contaminados con plomo, cinc y níquel.

### **2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Efectuar un análisis químico cuantitativo de los suelos a tratar.
- Efectuar un análisis químico cuantitativo de las plantas utilizadas como biorremediadores en suelos contaminados con plomo, cinc y níquel.

### **2.2.3 ALCANCES DE LA INVESTIGACIÓN**

- De acuerdo a la naturaleza del problema y teniendo en cuenta los objetivos planteados es una investigación básica.
- Este trabajo beneficiará sobre todo a la preservación del medio ambiente, es decir favorable a la ecología.

## **2.3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN**

Existen diferentes procesos biotecnológicos para limpiar los suelos contaminados. El principio básico consiste en destruir o modificar los materiales contaminantes con el fin de disminuir su peligrosidad o dejen de serlo por completo. Todos los procesos de remediación biológica aprovechan la capacidad degradativa de los microorganismos del suelo y en algunos casos también la capacidad depuradora de las plantas.

En este último aspecto, la fitorremediación podría ser definida como el conjunto de métodos para degradar, asimilar, metabolizar o detoxificar metales pesados, compuestos orgánicos, radioactivos y petroderivados por medio de la utilización de plantas que tengan la capacidad fisiológica y bioquímica para absorber, retener, degradar o transformar dichas sustancias a formas menos tóxicas.

Este sistema de descontaminación y de control de contaminación en diversos ambientes mediante el empleo de plantas (fitorremediación) implica una biotecnología capaz de degradar, acumular, extraer e inmovilizar los contaminantes del suelo, aguas superficiales y subterráneas, es una técnica efectiva, de bajo coste y presenta un impacto ambiental mínimo o nulo respecto a otros métodos de descontaminación físicos y químicos.

Asimismo, podría definírsela como la capacidad de ciertas plantas (terrestres, acuáticas, leñosas, etc.) y los cultivos in vitro derivados de ellas con el fin de remover, contener o transformar productos contaminantes del entorno.

Las bases conceptuales de la fitorremediación provienen de la identificación de plantas que hiperacumulan metales. Existen vegetales que tienen esta capacidad intrínseca pero también pueden

obtenerse plantas con estas cualidades por medio de técnicas propias de la Ingeniería Genética.

Promisoriamente las plantas pueden ser utilizadas como bombas extractoras de bajo costo para depurar suelos y aguas contaminadas, además, algunos procesos degradativos ocurren en forma más rápida con plantas que con microorganismos. Es un método apropiado para descontaminar superficies grandes o para finalizar la descontaminación de áreas restringidas en plazos largos. Sin embargo, es preciso considerar que el proceso se limita a la profundidad de penetración de las raíces o aguas poco profundas.

Asimismo la fitotoxicidad también es un factor limitante en áreas fuertemente contaminadas y como los tiempos del proceso pueden ser muy prolongados, y además la biodisponibilidad de los compuestos o metales es un factor limitante de la captación, es necesario comprender naturaleza de los productos de degradación (fitodegradación).

Ejemplos en laboratorios y en campos se han llevado a cabo tanto en nuestro país como en el exterior, tales como:

- a) Estudio con plantas silvestres de girasol, geranio y mostaza de la India, comprobándose que el geranio tolera más la contaminación

por níquel y por plomo mientras que la mostaza es más tolerante al cadmio.

- b) Rizofiltración a nivel de cultivo in vitro para detoxificar compuestos fenólicos en aguas contaminadas (tales como los derivados de los herbicidas tradicionales y contaminantes como el 2,4D) en la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba por el grupo de investigación de la Dra. Elizabeth Agostini, Rizofiltración para la extracción de Uranio de aguas subterráneas en Asthabula, Ohio, EEUU.
- c) Fitovolatilización de mercurio (Hg) por medio de plantas transgénicas (*Arabidopsis thaliana*) que fueron transformadas con dos genes provenientes de microorganismos que pueden transformar el mercurio iónico en mercurio más estable.
- d) Plantas transgénicas de tabaco con genes provenientes de bacterias que le permiten detoxificar TNT y GTN en suelos de campos minados.
- e) Ensayos de eliminación de arsénico de aguas de bebidas y cifras aplicaciones de la fitorremediación en la UCA.

### **FITOEXTRACCIÓN:**

La fitoextracción utilizar la biomasa vegetal extractiva para remediar suelos contaminados. Una gran cantidad de contaminantes pueden ser captados del suelo, entre ellos pesados y algunos compuestos radiactivos. Existe cierta evidencia a favor a la idea que transportadores específicos estarían dispuestos en las raíces de las plantas e inclusive la alta inespecificidad en la absorción de oligoelementos la simbiosis microbiana en la rizósfera jugaría un rol importante en algunos casos.

El producto de los procesos que acompañan a la fitoextracción en suelos y aguas contaminados son una eliminación de tóxicos, cualidad que permanece en el tiempo. Las plantas contaminadas con estos tóxicos pueden ser luego cortadas, con un control evidente en su disposición, es decir que cosechando el material vegetal se puede compactar para posterior almacenamiento apropiado, o se puede incinerar, incluso con recuperación de algunos metales.

**Fitoestabilización:** Las plantas en general previenen la migración de los contaminantes al reducir la erosión y también minimizado los movimientos del agua en el suelo (lixiviación o movimientos horizontales).

**Fitodegradación:** Algunos contaminantes, particularmente orgánicos, al ser absorbidos por las plantas, son posteriormente metabolizados por estas, degradándose a moléculas inocuas.

**Fitoestimulación:** Las raíces secretan exudados (enzimas y ácidos orgánicos, entre otros) que estimulan el crecimiento de diversas bacterias y hongos en la rizósfera. Estos microorganismos pueden tener diversas características biorremediadoras.

**Fitovolatilización:** Al tomar agua por sus raíces, las plantas absorben también ciertos contaminantes que son luego liberados como gases inocuos dentro de los procesos de respiración de las plantas.

### 2.3.1 DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DEL TEMA

El tema materia de la investigación es hallar, encontrar y seleccionar plantas (hiervas, arbustos, árboles) que tenga como propiedad fundamental acumular en su organismo vegetal metales pesados contaminantes del suelo. Esto da lugar al estudio de que plantas son adecuadas, primero que deben vivir en forma natural en medios muy contaminados y también almacenar en su organismo los metales pesados contaminantes. Esto también da como resultado la conservación del medio, por que los metales pesados en un rango no

muy grande contaminan los suelos, provocando que aparezcan desiertos. Por esta contaminación se mata la vida vegetal.

### **2.3.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El problema que se presenta es seleccionar ciertas plantas que favorezcan la biorremediación de suelos para purificarlos, evitando el envenenamiento de los suelos. Este método es efectivo, porque al encontrar las plantas adecuadas, actuarán absorbiendo los metales contaminantes, mejorando de esta manera los terrenos de cultivo o de pastoreo de animales herbívoros; esto será muy beneficioso para el medio ambiente, además influirá en la economía en forma favorable al preservar los campos.

### **2.3.3 ENUNCIADO DEL PROBLEMA**

De acuerdo a la situación problemática planteada se puede identificar el siguiente problema de investigación. ¿Cómo seleccionar plantas biorremediadoras de suelos contaminados de plomo, cinc y níquel?

### **2.3.4 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

Una de las justificaciones para utilizar la fitorremediación es la contaminación por la actividad minera que contaminan los suelos a través de las aguas de relaves. De este modo llegan a los suelos ciertos elementos químicos como mercurio, cinc, cobre, plomo, níquel, arsénico, etc. Por ejemplo el mercurio que se origina en las industrias



de cemento, industria del papel, plantas de cloro y soda, actividad volcánica, etc.

Otra en la agricultura la gran amenaza son las plagas, y en el intento de controlarles se han utilizado distintos productos químicos, son los llamados plaguicidas que son uno de los principales contaminantes en este ámbito, ya que no solo afectan a los suelos sino también, además de afectar a la plaga, incide sobre otras especies, esto se traduce en un desequilibrio y en la contaminación de los alimentos y de los animales.

Pero generalmente los metales pesados del suelo provienen de fuentes naturales, pero principalmente de las actividades humanas. En particular, la actividad de explotación de minerales metálicos produce abundantes residuos tóxicos que contienen elevadas concentraciones de diversos metales pesados, los cuales son depositados en espacios abiertos. La extracción de Zn, por ejemplo, produce residuos que contienen Pb, Cd, Cu o As (Ullrich et al. 1999) dependiendo de los minerales de alta ley extraídos. Esto provoca que se generen sitios con condiciones inhóspitas y con alta peligrosidad para los organismos vivos; así como un paisaje ecológico degradado. El establecimiento de cubiertas vegetales en los residuos tóxicos está fuertemente restringido por los efectos deletéreos en las plantas o en la germinación de las semillas (Peralta et al. 2001). Entre las estrategias que se han empleado para extraer o inmovilizar a los

metales pesados del ecosistema se tiene a la fitorremediación, en donde se utilizan plantas con mecanismos específicos para disminuir la toxicidad de los contaminantes del ecosistema (Filon Smits, 2005). Algunos reportes documentan que las especies vegetales de ciertas familias taxonómicas presentan cualidades para crecer en sitios contaminados (Brooks, 1998). Otros estudios muestran que especialmente algunas especies ornamentales son tolerantes a metales pesados y pueden representar una alternativa para recuperar o cubrir con vegetación los sitios contaminados. Sin embargo, la información generada sobre los efectos de Los metales en la emergencia de estas plantas es muy escasa (Peralta et. Al. 2001).

*Handwritten signature*

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 DEFINICIONES

**a) Suelo:**

El suelo es la fina capa superior de la corteza terrestre en contacto con la atmósfera y las aguas, que se ha formado lentamente como consecuencia de la acción combinada de cinco factores: clima, material originario, paisaje, factores bióticos (vegetación, fauna y acciones antrópicas) y finalmente el tiempo.

**b) Suelo Contaminado:**

Se considera un suelo contaminado, aquel cuyas características físicas, químicas y biológicas han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes peligrosos de origen humano, en concentración tal que comparten un riesgo para la salud humana o el medio ambiente.

#### 3.2 ANTECEDENTES

##### 3.2.1 CAUSAS DE LA CONTAMINACIÓN DEL SUELO

- a. La contaminación del agua y la atmósfera afectan a los suelos, por las lluvias las sustancias contaminantes se disuelven y se filtran en el suelo, convirtiéndose este en el gran receptor de los

desechos o residuos sólidos de las zonas urbanas o industriales.

- b. Suelo no es un recurso que una vez contaminado por residuos pueda autopurificarse automáticamente. Y si lo hace este estado permanece un largo tiempo, porque es muy lenta la autopurificación.

### 3.2.2 CLASIFICACIÓN

**Contaminación**  
**del**  
**Suelo** { Contaminación Urbana, Industria,  
Contaminación Agrícola

*AAA*

### 3.2.3 EL PROBLEMA DE LA BASURA (métodos de eliminación)

<b>El problema de la Basura (Métodos de Eliminación)</b>	<i>Incineración:</i> Causa una contaminación
	<i>Relleno Sanitario:</i> Terminan algunas veces en tiraderos a cielo abierto.
	Vaciado en el mar:
	<i>En Composteo:</i> Consiste en la Separación y utilización de la materia orgánica, para la fertilización del suelo en forma estratificada terminan en tiraderos a cielo abierto por ser incosteables.

AAA

### 3.2.4 DEGRADACIÓN DEL SUELO

- a. Como se ha expuesto en los temas anteriores, el suelo es un ente de la Naturaleza, cuyas características son el resultado de una larga evolución hasta alcanzar un equilibrio con las condiciones naturales. Y hemos de tener claro que en esas condiciones ambientales no está incluida la acción de las civilizaciones humanas.
  
- b. El suelo es un componente del medio ambiente y como tal debe ser considerado como un suelo virgen, no explotado. Es

evidente que su continua y abusiva utilización por parte del hombre ha truncado su evolución y ha condicionado negativamente sus propiedades. Como resultado el suelo se deteriora, se degrada.

- c. Se considera como degradación del suelo a toda modificación que conduzca al deterioro del suelo.
- d. Según la FAO – UNESCO la degradación es el proceso que rebaja la capacidad actual y potencial del suelo para producir, cuantitativa y cualitativamente, bienes y servicios.
- e. La degradación del suelo es la consecuencia directa de la utilización del suelo por el hombre. Bien como resultado de actuaciones directas, como agrícola, forestal, ganadera, agroquímicos y riego, o por acciones indirectas, como son las actividades industriales, eliminación de residuos, transporte, etc.
- f. Actualmente existe una fuerte tendencia que clama por una utilización racional del suelo.

Las teorías conservacionistas persiguen obtener máximos rendimientos pero con mínima degradación.

g. El cuidado del suelo es esencial para la supervivencia de la raza humana. El suelo produce la mayor parte de los alimentos necesarios, fibras y madera. Y sin embargo, en muchas partes del mundo, el suelo ha quedado tan dañado por un manejo abusivo y erróneo que nunca más podrá producir bienes (FAO, 1976).

### 3.3 TIPOS DE DEGRADACIONES

#### 3.3.1 DEGRADACIÓN DE LA FERTILIDAD

Es la disminución de la capacidad del suelo para soportar vida. Se producen modificaciones en sus propiedades físicas, químicas, fisicoquímicas y biológicas que conllevan a su deterioro.

Puede tratarse de una **degradación química**, que se puede deber a varias causas: pérdida de nutrientes, acidificación, salinización, sodificación, aumento de la toxicidad por liberación o concentración de determinados elementos químicos. El deterioro del suelo a veces es consecuencia de una **degradación física**, por: pérdida de estructura, aumento de la densidad aparente, disminución de la permeabilidad, disminución de la capacidad de retención de agua. En otras ocasiones se habla de **degradación biológica**, cuando se produce una disminución de la materia orgánica incorporada.

### 3.3.2 EROSIÓN

La erosión es la pérdida selectiva de materiales del suelo. Por la acción del agua o del viento los materiales de las capas superficiales van siendo arrastrados. Si el agente es el agua se habla de **erosión hídrica** y para el caso del viento se denomina **erosión eólica**.

a. El concepto de erosión del suelo se refiere a la **erosión antrópica**, que es de desarrollo rápido.

Frente a ella está la **erosión natural o geológica**, de evolución muy lenta.

b. La erosión geológica se ha desarrollado desde siempre en la Tierra, es la responsable del modelado de los continentes y sus efectos se compensan en el suelo, ya que actúan con la suficiente lentitud como para que sus consecuencias sean contrarrestadas por la velocidad de formación del suelo. Así en los suelos de las superficies estables se reproduce el suelo, como mínimo, a la misma velocidad con que se erosiona.

c. Es más, es muy importante destacar que la erosión natural es un fenómeno muy beneficioso para la fertilidad de los suelos.



- d. Efectivamente, como es sabido, todas las propiedades del suelo, y por tanto su profundidad, son consecuencia de una determinada combinación de los factores formadores. En una determinada región aparecerá un suelo cuya profundidad será el resultado de un clima concreto (temperatura y precipitaciones), sometido a la actividad de unos determinados organismos, en un tipo de relieve, que actúan sobre una clase de roca durante un tiempo.
- e. Si no actuase la erosión natural esa profundidad de material edafizado se iría alterándose progresivamente cada vez más conforme el suelo se fuese volviendo más antiguo y llegaría un momento que todos los minerales originales se habrían transformado totalmente, ya no aportarían ningún nutriente nuevo al suelo y este quedaría constituido por un residuo totalmente infértil. Prácticamente toda la Tierra estaría recubierta de una capa inerte, sin posibilidad de soportar vida alguna.

### **3.4 FORMAS DE RECUPERAR SUELOS CONTAMINADOS**

Existen diferentes procesos biotecnológicos para limpiar los suelos contaminados. El principio básico consiste en destruir o modificar los materiales contaminantes con el fin de disminuir su peligrosidad o dejen de serlo por completo. Todos los procesos de remediación biológica aprovechan la capacidad degradativa de los

microorganismos del suelo y en algunos casos también la capacidad depuradora de las plantas.

En este último aspecto, la fitorremediación podría ser definida como el conjunto de métodos para degradar, asimilar, metabolizar o detoxificar metales pesados, compuestos orgánicos, radioactivos y petroderivados por medio de la utilización de plantas que tengan la capacidad fisiológica y bioquímica para absorber, retener, degradar o transformar dichas sustancias a formas menos tóxicas.

Este sistema de descontaminación y de control de contaminantes en diversos ambientes mediante el empleo de plantas (fitorremediación) implica una biotecnología capaz de degradar, acumular, extraer e inmovilizar los contaminantes del suelo, aguas superficiales y subterráneas. Es una técnica efectiva, de bajo coste y presenta un impacto ambiental mínimo o nulo respecto a otros métodos de descontaminación físicos y químicos.

Asimismo, podría definírsela como la capacidad de ciertas plantas (terrestres, acuáticas, leñosas, etc.) y los cultivos in vitro derivados de ellas con el fin de remover, contener o transformar productos contaminantes del entorno.

Las bases conceptuales de la fitorremediación provienen de la identificación de plantas que hiperacumulan metales. Existen vegetales que tienen esta capacidad intrínseca pero también pueden obtenerse plantas con estas cualidades por medio de técnicas propias de la Ingeniería Genética.

Promisoriamente, las plantas pueden ser utilizadas como bombas extractoras de bajo costo para depurar suelos y aguas contaminadas, además, algunos procesos degradativos ocurren en forma más rápida con plantas que con microorganismos. Es un método apropiado para descontaminar superficies grandes o para finalizar la descontaminación de áreas restringidas en plazos largos. Sin embargo, es preciso considerar que el proceso se limita a la profundidad de penetración de las raíces o aguas poco profundas.

Asimismo, la fitotoxicidad también es un factor limitante en áreas fuertemente contaminadas y como los tiempos del proceso pueden ser muy prolongados, y además la biodisponibilidad de los compuestos o metales es un factor limitante de la capacidad, es necesario comprender mejor la naturaleza de los productos de degradación (fitodegradación).

Ejemplos en laboratorio y en campo se han llevado a cabo tanto en nuestro país como en el exterior, tales como:

- a) Estudio con plantas silvestres de girasol, geranio y mostaza de la India, comprobándose que el geranio tolera más la contaminación por níquel y por plomo mientras que la mostaza es más tolerante al cadmio.
  
- b) Rizofiltración a nivel de cultivo in vitro para detoxificar compuestos fenólicos en aguas contaminadas (tales como los derivados de los herbicidas tradicionales y contaminantes como el 2,4D) en la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba por el grupo de investigación de la Dra. Elizabeth Agostini.

Rizofiltración para la extracción de Uranio de aguas subterráneas en Asthabula, Ohio, EEUU.

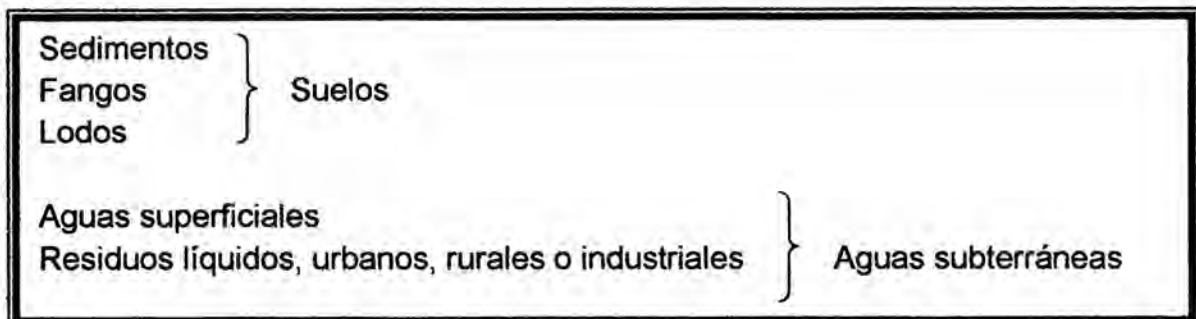
- c) Fitovolatilización de mercurio (Hg) por medio de plantas transgénicas (*Arabidopsis thaliana*) que fueron transformadas con dos genes provenientes de microorganismos que pueden transformar el mercurio iónico en mercurio más estable.
  
- d) Plantas transgénicas de tabaco con genes provenientes de bacterias que le permiten detoxificar TNT y GTN en suelos de campos minados.

- e) Ensayos de eliminación de arsénico de aguas de bebida y otras aplicaciones de la fitorremediación en la UCA.

### 3.4.1 TIPOS DE CONTAMINANTES QUE SE PUEDEN ELIMINAR

- Metales pesados (cromo, arsénico, cadmio, plomo, zinc, cobre, mercurio).
- Hidrocarburos derivados del petróleo.
- Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX)
- Bifenilos policlorados (PCB).
- Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH)
- Tricloroetileno (TCE) y otros compuestos organoclorados.
- Residuos de pesticidas.
- Escorias de municiones y explosivos.
- Nutrientes (nitratos, amonio, fosfatos).

### ¿Qué se descontamina?



La fitorremediación para restaurar ambientes contaminados involucra plantas verdes para la remoción de metales y

contaminantes orgánicos. Su mejor uso es en sitios con contaminación poco profunda y susceptibles a alguna de sus seis aplicaciones: Fitovolatilización, Fitodegradación, Fitoestimulación, Fitoestabilización, Fitoextracción y Rizofiltración.

En el siguiente cuadro se pueden apreciar los tipos de fitorremediación posibles (1):

<b>Tipo</b>	<b>Proceso Involucrado</b>	<b>Contaminación Tratada</b>
Fitoextracción	Las plantas se usan para concentrar metales en las partes.	Cadmio, cobalto, cromo, níquel, mercurio, plomo, plomo selenio.
Fitodegradación	Las plantas acuáticas y terrestres captan, almacenan y degradan compuestos orgánicos para dar subproductos menos tóxicos o no tóxicos.	Municiones (TNT, DNT, RDX, nitrobenceno, nitrotolueno), atrazina, solventes clorados, DDT, pesticidas fosfatados, fenoles y nitrilos, etc.
Fuente: (1) <a href="http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec_36.asp">http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/ec_36.asp</a>		

*Handwritten signature*

### 3.4.2 FITOEXTRACCIÓN

La fitoextracción utiliza la biomasa vegetal extractiva para remediar suelos contaminados. Una gran cantidad de contaminantes pueden ser captados del suelo, entre ellos metales pesados y algunos compuestos radiactivos. Existe cierta evidencia a favor a la idea que transportadores específicos estarían dispuestos en las raíces de las plantas e inclusive la alta inespecificidad en la absorción de oligoelementos la simbiosis microbiana en la rizósfera jugaría un rol importante en algunos casos.

El producto de los procesos que acompañan a la fitoextracción en suelos y aguas contaminados son una eliminación de tóxicos, cualidad que permanece en el tiempo. Las plantas contaminadas con estos tóxicos pueden ser luego cortadas, con un control evidente en su disposición, es decir que cosechando el material vegetal se puede compactar para posterior almacenamiento apropiado, o se puede incinerar, incluso con recuperación de algunos metales.

**a) Fitoestabilización:** Las plantas en general previenen la migración de los contaminantes al reducir la erosión y también minimizando los movimientos del agua en el suelo (lixiviación o movimientos horizontales).

- b) Fitodegradación:** Algunos contaminantes, particularmente orgánicos, al ser absorbidos por las plantas, son posteriormente metabolizados por estas, degradándose a moléculas inocuas.
- c) Fitoestimulación:** Las raíces secretan exudados (enzimas y ácidos orgánicos, entre otros) que estimulan el crecimiento de diversas bacterias y hongos en la rizósfera. Estos microorganismos pueden tener diversas características biorremediadoras.
- d) Fitovolatilización:** Al tomar agua por sus raíces, las plantas absorben también ciertos contaminantes que son luego liberados como gases inocuos dentro de los procesos de respiración de las plantas.



#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

##### Material vegetal

Se utilizaron semillas de *Dahlia x hortorum* Willd (dalia), *Tagetes erecta* L. (tagetes) y *Cosmos bipinnatus* Cav. (cosmos). Previamente se hicieron pruebas de germinación en las tres especies para conocer la viabilidad de las semillas (datos no mostrados). La germinación de las semillas se realizó en cajas de Petri conteniendo papel filtro y en condiciones de laboratorio, con variaciones naturales de luz y oscuridad.

##### Condiciones de crecimiento

La siembra se realizó en bandejas de plástico (50x30x9cm) que funcionaron como semilleros. Cada bandeja presentó 100 orificios y cada orificio con la capacidad de contener 15g de sustrato. Se colocaron 2 semillas por orificio, dando un total de 200 semillas a evaluar por tratamiento de cada una de las tres especies ornamentales (600 semillas en total por tratamiento). Los tratamientos fueron las mezclas de residuo minero y suelo agrícola en proporciones de 0,20, 40 y 60% de residuos (v:v). Debido a las altas concentraciones de diferentes metales presentes en el residuo minero (**Tabla I**), que superan las concentraciones normales del suelo, no se estableció un tratamiento con 100% de residuo.

**TABLA I**  
**CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DEL SUELO Y RESIDUO DE**  
**LA MINA "EL BOTE", ZACATECAS, MÉXICO Y LÍMITES**  
**PERMISIBLES EN SUELO**

	Suelo	Residuo minero
pH	6,5	6,2
Textura	Migajón	Arenosa
Arena (%)	38,2	92,0
Arcilla (%)	23,8	1,0
Limo (%)	38	7,0
Materia orgánica (%)	0,75	0,38
P (Olsen mg.Kg <sup>-1</sup> )	271,5	1221
Color Musel	10 YR3/4 Pardo amarillento oscuro	5 Y 6/6 Amarillo pálido

Concentración de metales pesados (mg.kg<sup>-1</sup>)

	<u>Suelo</u>		<u>Residuo minero</u>		<u>Límites permisibles</u>	
	<u>Totales</u>	<u>Disponibles</u>	<u>Totales</u>	<u>Disponibles</u>	<u>US-EPA*</u>	<u>México**</u>
Cu	58	1,0	12313,1	12,6	50-3100	nr
Ni	15	0,60	18,9	0,2	4-55	nr
Pb	21	6,1	2061,9	142,0	400-500	100-200

Nr: dato no reportado. Fuentes: \*US-EPA (2002), \*\*PROFEPA (2000).

El tratamiento con 0% de residuo se considero como el testigo.

La mineralogía predominante del residuo es: acantita, azurita, calcita, galena, cuarzo, pirangita, esfalerita, polibasita y cuprita.

Los principales minerales de interés para extracción son: Zn, Pb y Ag (Carrillo-González y González-Chávez, 2006). Además, en la zona hay alto contenido de óxidos de Fe, lo cual no es sorprendente por ser el Fe el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre (Lindsay, 1979).

Antes de colocar las semillas para iniciar el proceso de germinación, las mezclas se incubaron durante 47 días a temperatura ambiente, para permitir la estabilización de reacciones de sorción de los metales pesados en la superficie coloidal. Las concentraciones totales y disponibles de metales en las mezclas respectivas se indican en la **Tabla II**. La concentración de metales pesados en el suelo y en las mezclas de desecho de mina y suelo se determinó por espectroscopia de absorción atómica (Perkin Elmer 3110). Se consideró la concentración total (BS, 1995) y la concentración de la fracción disponible DTPA-TEA-Ca-Cl<sub>2</sub> (Lindsay y Norvel, 1978). Las plántulas crecieron en cámara de crecimiento (Sherer Environmental, modelo CEL 38-15) bajo iluminación continua con lámparas luminiscentes blancas en ciclos de 24h, se estableció un fotoperiodo de 16/8h día/noche donde la densidad de flujo de fotones varió de 36 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}/16\text{h}$  a 19 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}/8\text{h}$ , con temperatura de día/noche de 25/18°C.

**TABLA II**  
**CONCENTRACIÓN TOTAL Y DISPONIBLE DE METALES**  
**PESADOS EN LOS SUSTRATOS UTILIZADOS PARA**  
**EL ESTUDIO DE EMERGENCIA Y DESARROLLO**  
**DE TRES ESPECIES ORNAMENTALES**

Tratamiento (% de residuos)	<u>Zn</u>	<u>Ni</u> (mg.kg <sup>-1</sup> )	<u>Pb</u>
Totales (Agua regia; BS. 1995)			
20	294	24	145
40	526	34	255
60	712	38	359

Fuente: Lindsay y Norwell, 1978

### **Variables evaluadas**

**Mediciones de crecimiento.** Durante un periodo de 7 días se determinó la dinámica y porcentaje de emergencia. A los 17 días después de la siembra, las plantas fueron removidas e inmediatamente divididas en tejidos (cotiledones, hojas, tallo y raíz) para medir la longitud de hojas verdaderas, cotiledones, tallo y raíz. Los tejidos de las plántulas se secaron en estufa a 70°C para evaluar la materia seca.

**Determinación de clorofila.** El contenido de clorofila se determinó con 100mg de tejido de hojas frescas en extractos de acetona 80% de acuerdo al método espectrofotométrico adaptado por Bruinsma (1963).

**Índice de tolerancia de la raíz (ITLR).** Este índice se utiliza como un indicador de la toxicidad y se determinó con base en la longitud de la raíz. El ITLR es igual a la longitud de raíz del tratamiento conteniendo metales dividido entre la longitud de raíz del tratamiento testigo, y la cantidad resultante multiplicada por 100 (modificado de Wilkins, 1978).

**Determinación del contenido de metales.** La concentración de metales pesados se determinó en la planta entera, incluyendo la raíz, por espectroscopia de absorción atómica mediante el método de Jones y Case (1990) tras previa digestión con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% y con una mezcla binaria (1:4) con HClO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Westerman, 1990).

### **Diseño experimental y tratamientos**

Se usó un diseño completamente al azar, con 200 semillas como repeticiones para cada especie en cada uno de los cuatro tratamientos. Se realizaron análisis de varianza individuales para cada especie y variable mediante el procedimiento GLM del Statistical Analysis System (SAS, 2004). Se efectuaron análisis combinados y se consideró una estructura factorial completa. Además, se hicieron comparaciones múltiples de medias y se utilizó la prueba de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

## V. RESULTADOS

Los residuos de mina y los sustratos mezclados con éstos en sus proporciones de 20 a 60% presentaron altas concentraciones de metales (**Tablas I y II**). La concentración total de Zn en los residuos, al igual que Pb, es superior a la reportada como normal en el suelo, según los límites propuestos por US-EPA (2002) y PROFEPA (2000). Las concentraciones de metales disponibles se incrementaron en función de los tratamientos y son anormales (**Tabla I**). Además, la mezcla de elementos tóxicos aumenta los negativos por la interacción entre ellos (Guo *et al*, 2007).

En las especies cosmos y tagetes la emergencia disminuyó significativamente conforme se incrementó la proporción de residuos de minas; en contraste, las semillas de dalia presentaron mayor porcentaje de emergencia que las de tagetes y cosmos a las concentraciones de 20 y 40% de residuos (**Tabla III**).

Con respecto a la dinámica de crecimiento, en dalia no se presentaron diferencias estadísticas durante los siete días de evaluación, mientras que en tagetes y en cosmos solo se detectaron decrementos significativos en el séptimo día.

**TABLA III**  
**PORCENTAJE DE EMERGENCIA DE TRES ESPECIES**  
**ORNAMENTALES A DIFERENTES CONCENTRACIONES**  
**DE RESIDUOS DE MINAS**

Especie	Tratamiento (% de residuos)	% de emergencia
Dalia	0	100,00 a
	20	97,40 a
	40	92,71 a
	60	88,54 a
	DMS	7,26 ns
Cosmos	0	100,00 a
	20	89,44 b
	40	72,25 c
	60	83,33 cb
	DMS	8,98 *
Tagetes	0	100,00 a
	20	92,50 b
	40	80,63 b
	60	89,38 b
	DMS	6,78 *

Letras distintas en la misma columna y en la misma especie, muestran diferencias significativas entre tratamientos (Tukey;  $p \leq 0,05$ ). Análisis estadístico realizado por especie ns: no significativo.

\* : significativo ( $p \leq 0,05$ ). DMS: diferencia mínima significativa.

Fuente: Los Angeles Rodríguez. JAN 2010 Vol. 35 N° 1

El largo y ancho de los cotiledones fue significativamente menor en dalia, en los sustratos con 40 y 60% de residuos de minas, respecto al testigo

En cosmos, el largo de los cotiledones fue estadísticamente menor con 20 y 60% de residuos. Mientras que en tagetes, el largo y ancho fue estadísticamente menor en los tres casos (20, 40 y 60%; de residuos. En general, en los tratamientos sin residuos de minas (0%), las tres especies presentaron significativamente mayor tamaño de hojas verdaderas y de cotiledones, y al incrementar la concentración de residuos se observó reducción en el tamaño de ambas estructuras. En dalia y tagetes solo se detectó reducción en la longitud radical en las plantas en el tratamiento con mayor concentración (60%) de residuos de minas, mostrando diferencias significativas respecto al testigo. En cosmos se detectó reducción en la longitud radical con el tratamiento de 40% de residuos, pero la longitud aumentó en el tratamiento de 60% de residuos. En general, dalia presentó mayor longitud radical, seguida de cosmos y tagetes. La longitud del tallo solo fue evaluada en cosmos y tagetes, ya que dalia es una planta hipogea, en la cual el hipocótilo no se desarrolla y los cotiledones permanecen bajo el suelo o ligeramente sobre éste. La longitud de tallo de las plantas de cosmos y tagetes presentó diferentes respuestas a los metales pesados contenidos en los residuos, pues otras variables, como el pH, se mantuvieron sin cambio en los tratamientos, es decir la capacidad amortiguadora del suelo no fue afectada por la mezcla con los residuos. En cosmos no se detectaron diferencias estadísticas



entre los tratamientos, lo que sugiere que los metales pesados no afectaron esta variable. En contraste, la longitud del tallo de tagetes disminuyó significativamente al incrementar la concentración de residuos, detectándose las longitudes menores en el tratamiento con 60% de residuos. La acumulación de materia seca total disminuyó significativamente al incrementar la concentración de residuos de minas en las tres especies ornamentales sin embargo, cosmos y tagetes presentaron pesos de materia seca de hasta dos veces menores que dalia.

Los valores del índice de tolerancia de longitud de raíz (ITLR) son más altos en los casos que muestran menor toxicidad. El ITLR varió de 75,65 a 98,45 entre las tres especies, siendo dalia la que presentó los valores mayores, en los tratamientos con 20 y 40% de residuos, mostrando incremento en la concentración de metales pesados. En contraste, los índices más bajos los tuvo tagetes, aunque estadísticamente no fueron diferentes a cosmos. En dalia el ITLR disminuyó 2, 7 y 15% por la adición de 20, 40 y 60% de residuos, respectivamente, mientras que en cosmos la disminución fue, de 13,35; 20,74 y 7,74%. En tagetes la reducción del ITLR fue más marcada y tendió a incrementarse con los mayores porcentajes de residuos.

La concentración de clorofila a, b, clorofila total y la relación clorofila a/b disminuyó en cosmos y tagetes al incrementar la concentración de

residuos. En dalia, la disminución solo se observó en el contenido de clorofila a y clorofila total; sin embargo, los tratamientos con residuos no afectaron de forma significativa el contenido de clorofila b y la relación de clorofila a/b. Al comparar la concentración entre las tres especies, se aprecia que en tagetes hubo mayor cantidad de clorofila a, respecto a dalia y cosmos. Cabe mencionar que la presencia de metales pesados no alteró la proporción en la relación de clorofilas a/b en el desarrollo de dalia, mientras que en tagetes y cosmos la relación de clorofila a/b disminuyó por la presencia de metales pesados, mostrando valores  $<2$ .

La concentración de metales en la plántula dependió del tipo de metal y de la especie vegetal. El contenido de Cu en cosmos y tagetes aumentó con la concentración total en el sustrato. En dalia se observó incrementó a 20 y 40%, pero a 60% la cantidad absorbida disminuyó. La absorción de Zn en tagetes y dalia aumentó a 20%, pero a 40 y 60% la curva de absorción se hizo asintótica. Cosmos absorbió significativamente más Zn al aumentar la proporción de residuos. En las tres especies, la concentración de Cd se incrementó al aumentar la proporción de residuos en los sustratos, siendo en tagetes más marcado este efecto. En cosmos y tagetes se observó un aumento en la absorción de Ni directamente proporcional con el incremento en los residuos de minas. En dalia el aumento se observó en los tratamientos de 20 y 40%; sin embargo, con 60% de residuos, se redujo la concentración de Ni en el tejido vegetal. El incremento en la absorción de Pb fue similar en dalia y tagetes en los tres

AAA

niveles de adición de residuos ensayados. En contraste, en cosmos a 60%, la concentración en la plántula aumentó considerablemente.

Con base en las concentraciones de metales consideradas como normales en plantas, Reeves *et al.* (1995) reportaron valores ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) de 25 para Cu, 400 para Zn y Mn, y 3, 10 y 5 para Cd, Ni y Pb, respectivamente. Por tanto, estas plantas ornamentales acumularon altas concentraciones de Cu, Ni, Pb y Cd. De manera general, se manifiesta que en el tratamiento con mayor concentración de residuos (60%), las tres especies extrajeron entre 10 y 30 veces más Pb, Ni y Cd al comparar con las concentraciones detectadas en las plantas del tratamiento testigo. Al contrastar la absorción de Zn se observó que la concentración en la planta fue  $<2\%$  del contenido en el sustrato. El comportamiento de absorción de Mn fue más complejo en comparación con los otros elementos; en dalia se incrementó la concentración a 20% y después se redujo; en tagetes y cosmos la concentración fue inversamente proporcional a la cantidad de residuo aplicada. Aparentemente hubo interacción negativa entre el Mn y la concentración de los elementos Cu, Zn y Cd.

## VI. DISCUSIÓN

Bidwell (1990) menciona que cuando se rompen las cubiertas de la semilla y emerge la plántula se incrementa el metabolismo celular, siendo los tejidos muy susceptibles a condiciones externas (temperatura, luz, agua) que pueden ocasionar daños a las membranas. Los resultados del presente trabajo mostraron que las semillas de dalia tuvieron mayor emergencia que las otras dos especies. Ello sugiere que la presencia de metales pudo causar mayor daño en las membranas de cosmos y tagetés en comparación con las de dalia, o bien que la capacidad homeostática de dalia ante el estrés por metales fue mayor que en las otras especies. Catanese *et al.* (2006) señalan que en *Opuntia ficus-indica* la emergencia disminuyó al incrementar el contenido de metales en el medio de crecimiento.

En general, se observó que la concentración de metales en los residuos tuvo efecto negativo en el tamaño de los cotiledones y las hojas verdaderas de las tres especies ornamentales en estudio. Estudios en progreso, sin embargo, muestran que aunque estos efectos negativos se observaron en esta primera etapa de crecimiento, estas plantas ornamentales pueden continuar su crecimiento y desarrollo, y completar su ciclo biológico con producción de flores. Shen *et al.* (1998) reportaron que altas concentraciones de Cu y Zn causaron alteraciones en el metabolismo de *Phaseolus aureus* Roxb. (Frijol mungo) al reducir el tamaño de hojas y raíces. Al respecto Acevedo *et al.* (2005) observaron

que el Cd disminuyó el número y tamaño de hojas, lo que provocó clorosis severa con aparición de manchas necróticas en las láminas de las hojas en *Helianthus annuus L.*

Algunas especies pueden retardar y disminuir el crecimiento radical cuando se exponen a altas concentraciones de metales pesados. En un suelo contaminado, la raíz es el primer órgano de la planta afectado al exponerse directamente con los metales pesados. Carlson *et al.* (1991) encontraron reducciones en la longitud de la raíz en *Sesamum indicum L.* (ajonjolí), *Sinapsis alba L.* (mostaza blanca) y *Lactuca sativa L.* (lechuga) desde 37 hasta 72% con respecto a los testigos. Xiong (1998) reportó reducción de 99% en la longitud de raíz de *Brassica pekinensis Rupr.* (repollo chino) al utilizar una solución de  $1000\text{mg.l}^{-1}$  de Pb.

## VII. REFERENCIALES

- ALCANTARA TRUJILLO, Max, Degradación del Suelo. Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, 2012.
- BROOKS RR. Cabi, Londres, RU. 380pp. 1998
- CARRILLO GONZALEZ R. GONZALEZ CHAVEZ MC. Env. Pollut. 144 : 84 – 92, 2006
- CASELLES J. Walter Air Soil, Pollut. 136 : 1 – 9, 2004
- CHANEY, RL., MALIK, M, BROWN, SL. Metals Curr Opin. Biotechnol. 8 : 279 – 284, 1997
- LINDSAY WI, NORWEL WA Soil Sci. Am J. 42 : 421 – 428, 1978
- PERALTA JR. Bull. Env. Cont. Toxicol, 66 : 727, 734, 2001.
- PILON – SMITS. Phgrremediation. Annu. Rev. Plant. Biol 56 : 15-39, 2005.
- SPAIN, A. Reviews In Undergraduate, 2 : 1 – 6, 2003

- ULLARICH SM. RAMSEY MH. RUBICA EH. Total and Exchangeable Concentration of Heavy Metals in Soils Near Bytomian Area of Pb/Zn Mining and Smelting in Upper Silesia Poland, *Geochemistry* 14 : 187 – 196, 1999.
- Utilización de la Biorremediación en minería  
<http://www.loenvias.com/usuarios/ecopestsl/bsr.htm>
- Fitorremediación <http://www.cammx.com>. <http://www.sefv.org>  
<http://www.ucm.es>
- Breve presentación sobre biorremediación en castellano  
<http://universidaddesantiago.cl/ima/biorremedhtm>
- Biorremediación en Mendoza (Universidad de Luyo)  
<http://weco2sitecom/informes/biorremediación.asp>
- <http://www.biorremedia.com.mx/firremediacion.definicion.html>.

# APENDICE

= Autonni Program

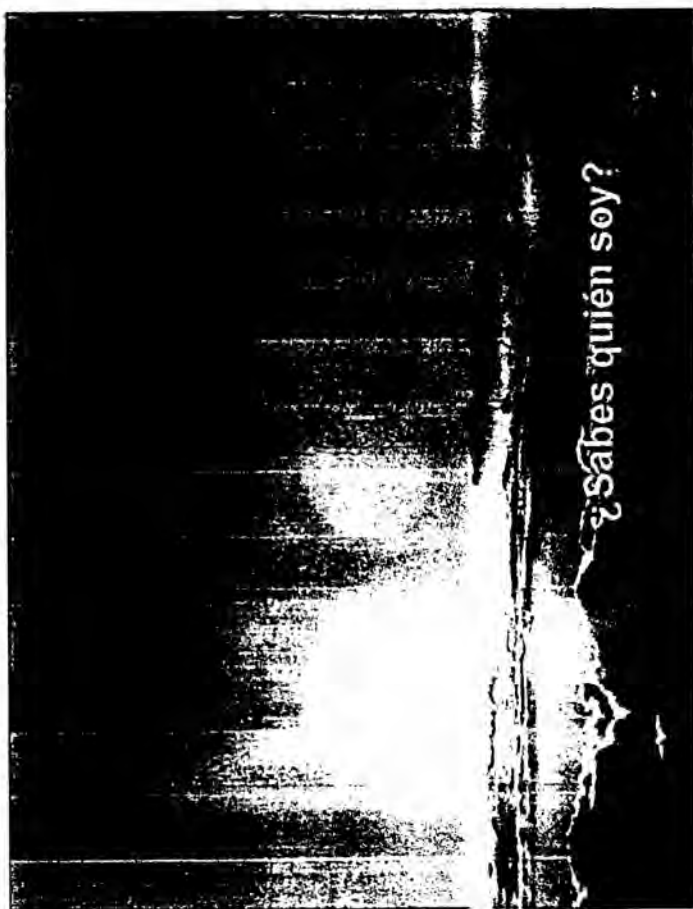




Soy alguien con quien  
convives a diario



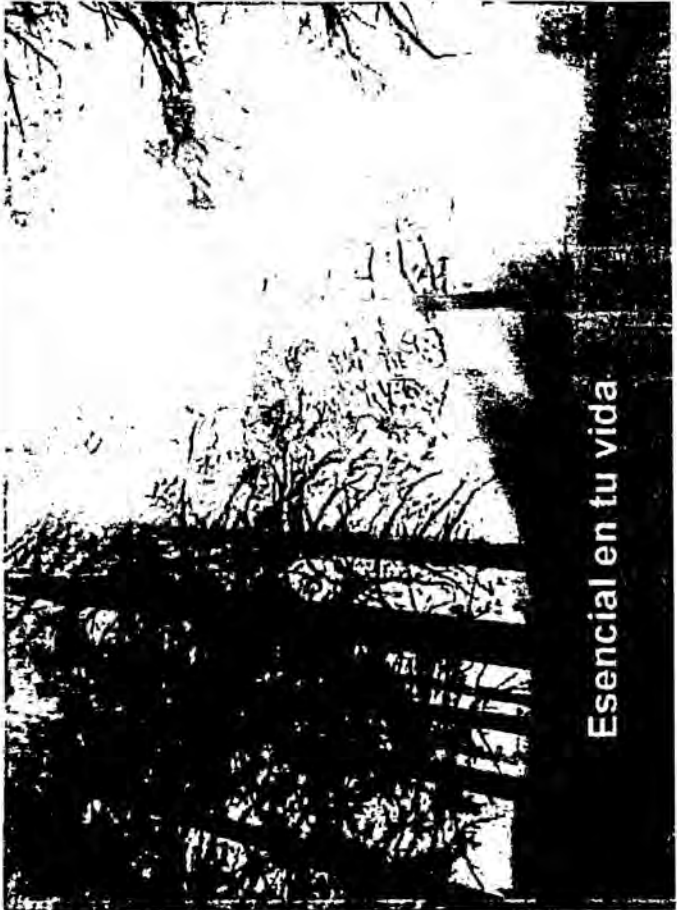
¿Sabes quién soy?



Alguien que deseas  
ser mejor para ti



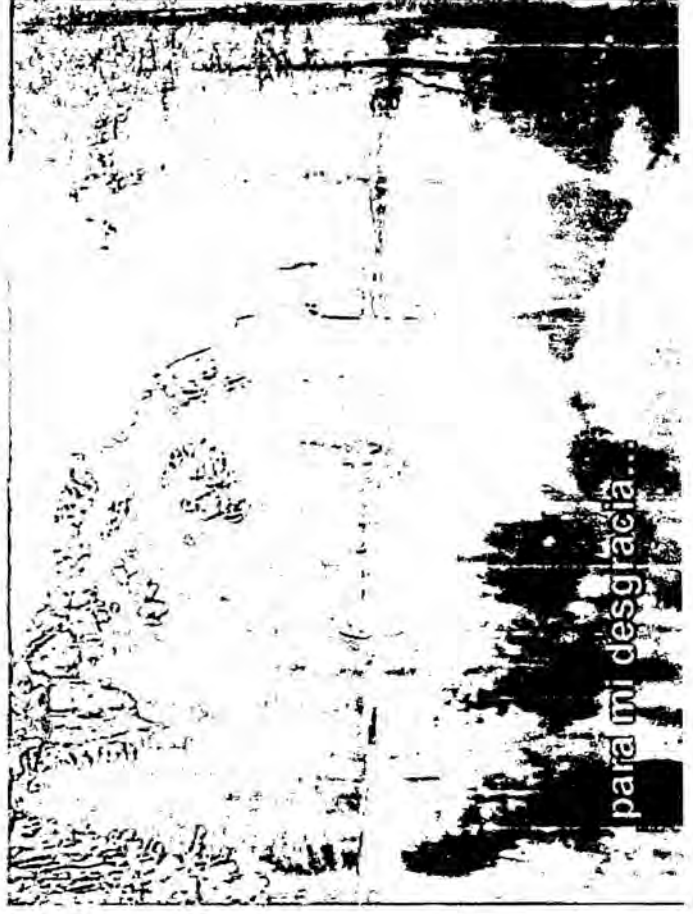
Esencial en tu vida



RAK



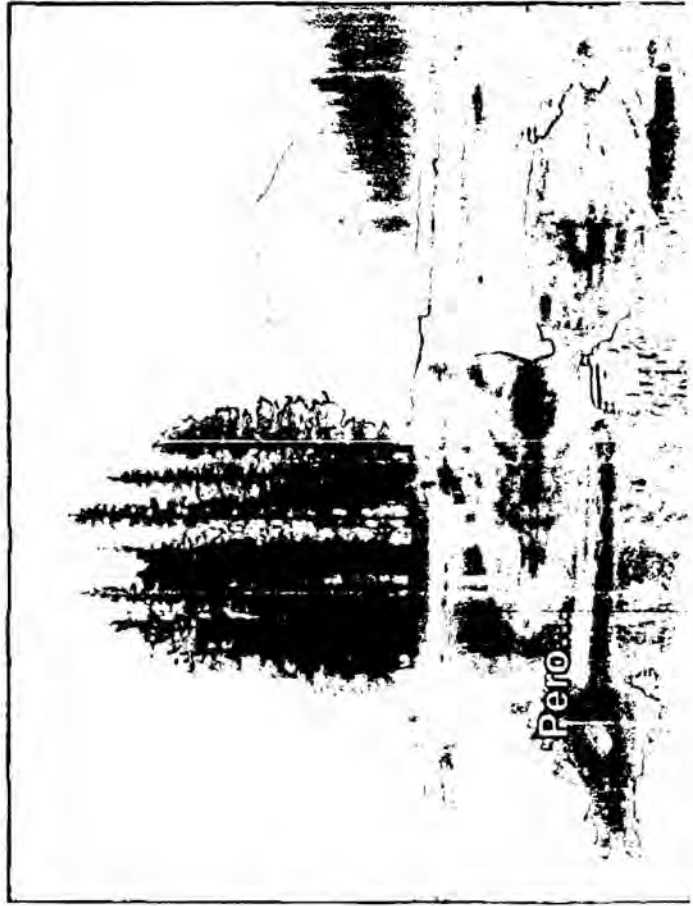
no podrías vivir



para mi desgracia...



porque sin mí...



Pero...

##



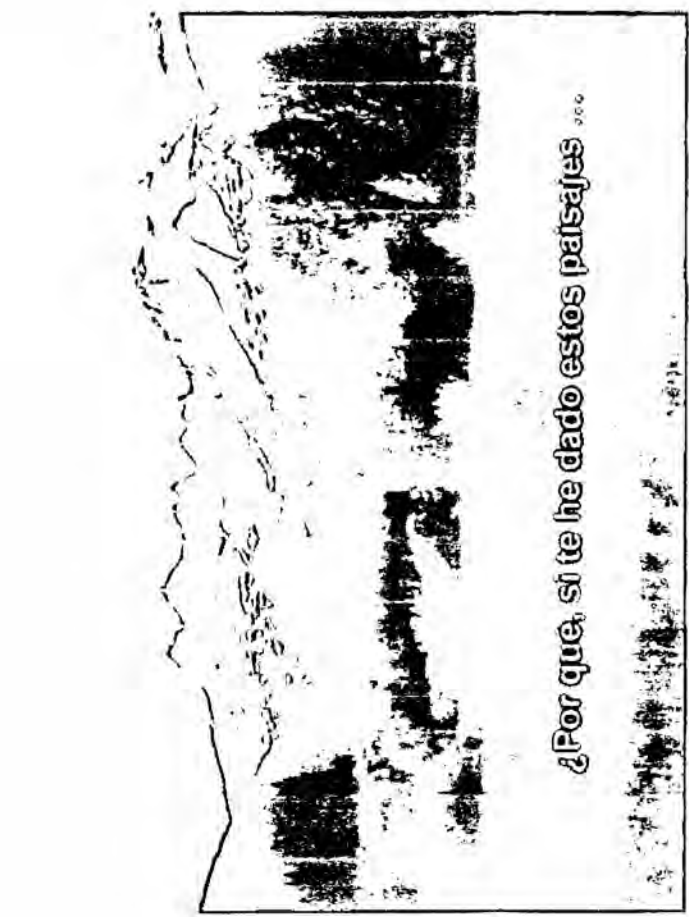
no me das la importancia que yo te doy...



AAA



www.tipografia.com

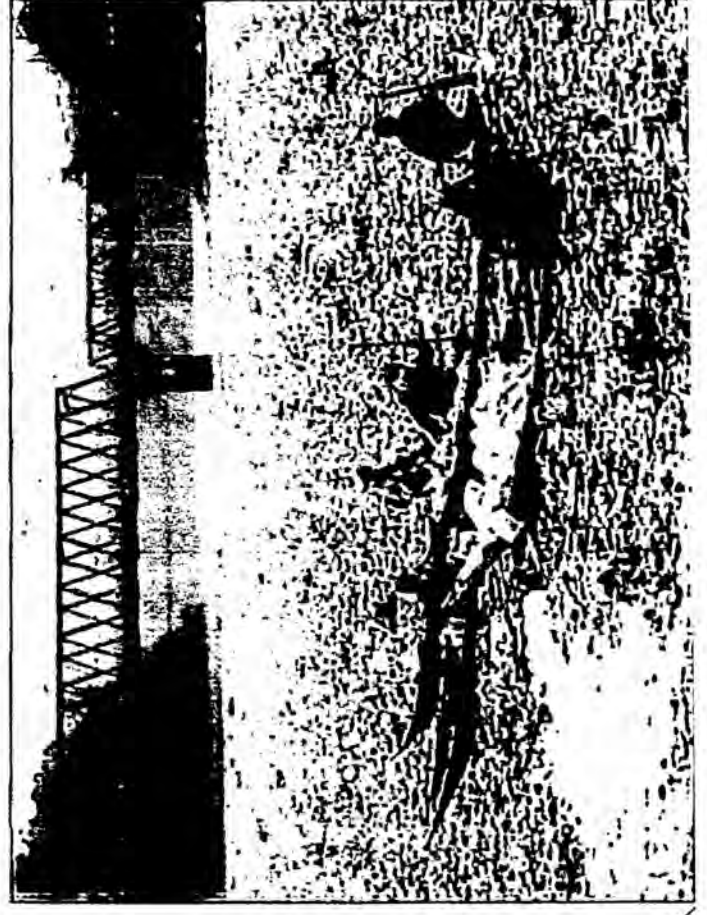


¿Por que, si te he dado estos paisajes ...



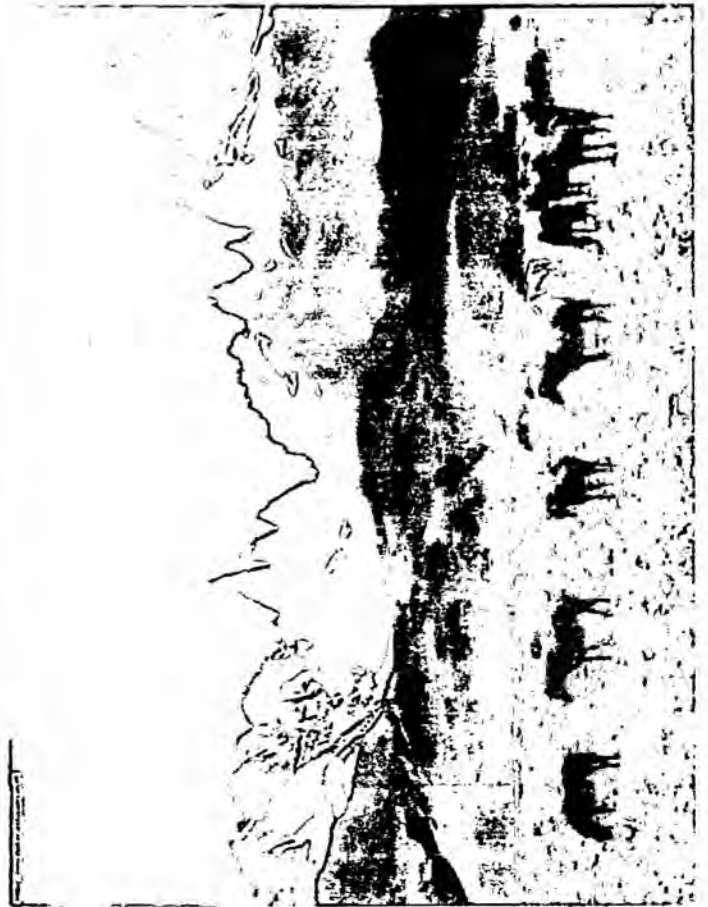
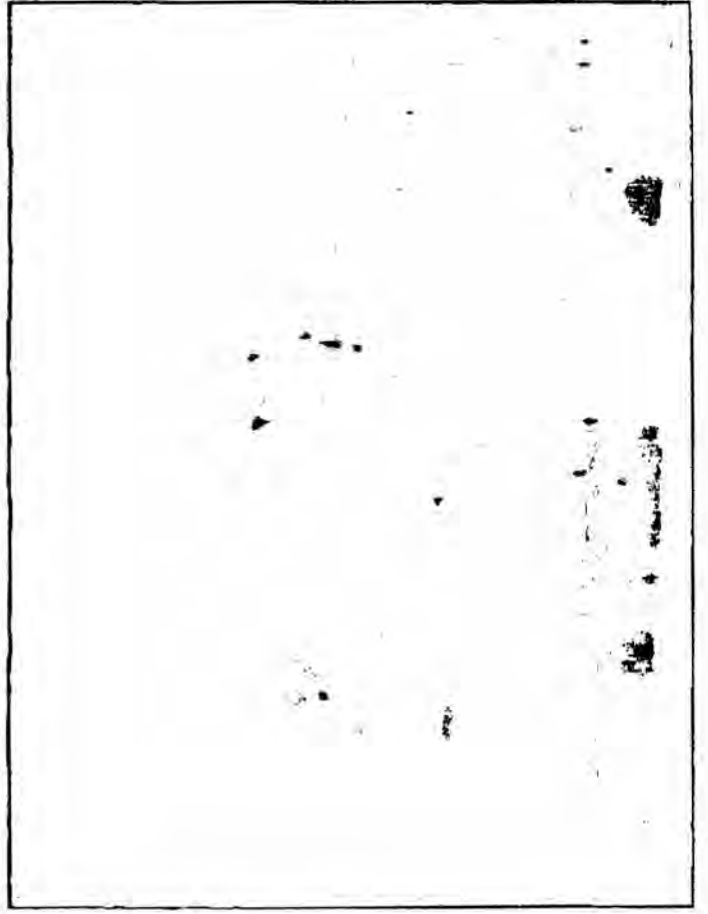
Llenos de color y abundancia

///





¿Por qué si te he dado compañía...



#



SM





4/22

© 1988





Tú no la quieres?

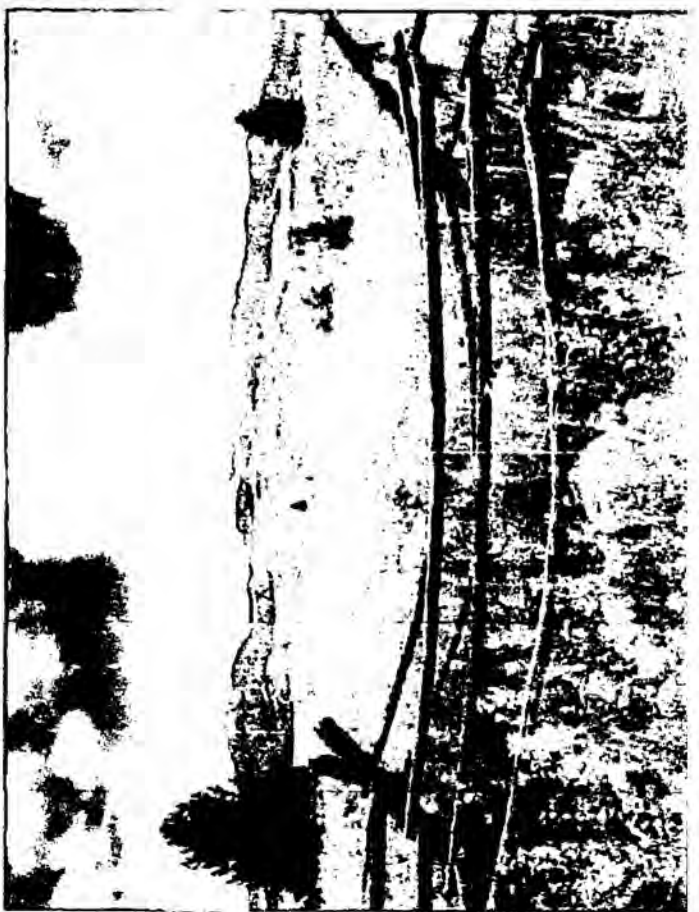


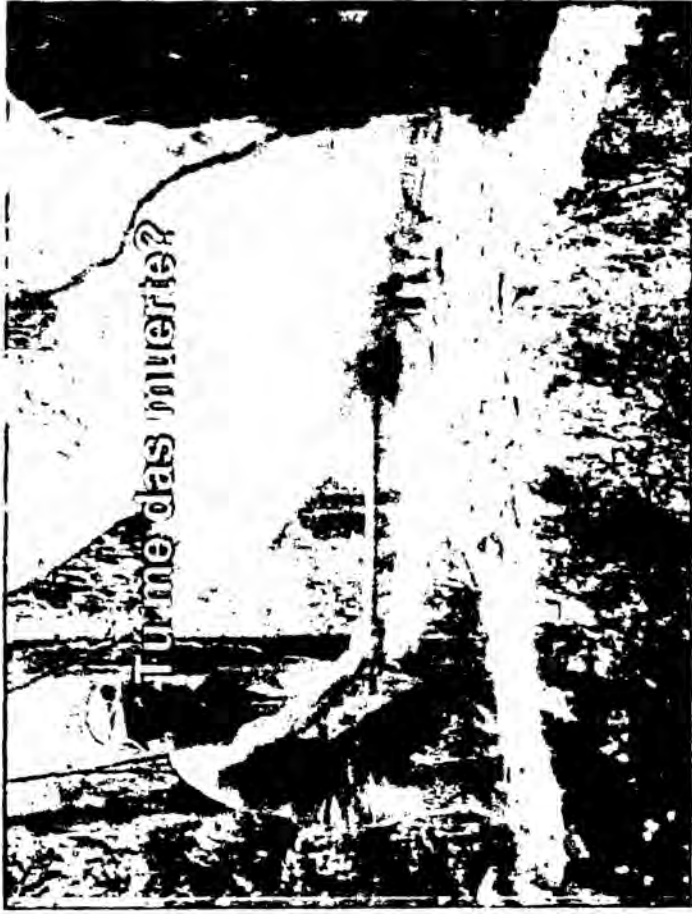


Porque si te doy vida



*[Handwritten signature]*





¿Turne das muerte?



¿Haz algo por mí, por ti y por todos...



Es éste el legado que quieres dejar a tus hijos?

Si no es ahora...  
cuándo?



¡ASI!!



Si no eres tú...  
quién?



GRACIAS!





XX