

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**EVALUACIÓN DE FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS
CON PLOMO MEDIANTE EL CULTIVO DE *Atriplex halimus* L.**

MILLARAY ELBA QUEUPUAN COLIL

SANTIAGO - CHILE

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EVALUACIÓN DE FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS
CON PLOMO MEDIANTE EL CULTIVO DE *Atriplex halimus* L.**

**EVALUATION OF PHYTOREMEDIATION OF POLLUTED SOILS WITH
LEAD BY CULTURING OF *Atriplex halimus* L.**

MILLARAY ELBA QUEUPUAN COLIL

SANTIAGO, CHILE

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**EVALUACIÓN DE FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS
CON PLOMO MEDIANTE EL CULTIVO DE *Atriplex halimus* L.**

Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniero Agrónomo.

MILLARAY ELBA QUEUPUAN COLIL

PROFESOR GUÍA	CALIFICACIONES
Srta. Yasna Tapia F. Ingeniera en Alimentos, Dra.	6,6
PROFESORES EVALUADORES	
Sr. Cristian Kremer F. Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,7
Sra. Erika Kania K. Ingeniero Agrónomo, Dra.	5,5

SANTIAGO, CHILE

2017

AGRADECIMIENTOS

En el transcurso de mi vida, varias personas han ido aportando y contribuyendo en mi formación tanto en el ámbito personal como educativo, es por esto que, dedico este logro a mi querido abuelito Alejandro Queupuan Tranacan (Q.D.E.P.), quien supo estar y dar sus palabras de aliento en los momentos más oportunos, aconsejándome y enseñándome.

Quiero agradecer a mi madre Elba Colil Quichapai, por ser uno de los pilares fundamentales, comprendiendo y apoyando cada uno de mis pasos a lo largo de todos estos años. Gracias por todo el amor y cariño que me das.

También, quiero dar las gracias a mi padre Juan José Queupuan Huaiquil, quién siempre apoyo mi interés por estudiar, por conseguir mis objetivos y perseguir mis metas. Gracias papá por enseñarme la gran herramienta del saber y por todo el cariño que me entregas.

A mis hermanos: César, Juan, Claudio, Rayen y Martín, por ser quienes les dan la alegría necesaria a nuestros días, por apoyarme y acompañarme muchas veces en las noches de estudio. Ustedes son lo mejor que puedo tener y estoy orgullosa de cada uno de ustedes.

Quiero agradecer también a mi profesora guía Yasna Tapia Fernández por su buena disposición, el conocimiento transmitido y la confianza entregada para desenvolverme en el laboratorio y llevar a cabo esta memoria de título.

Agradecer también al personal del Laboratorio de Química de Suelos y Aguas, señora Consuelo Aguilera y señora Mary Sol Aravena, quienes han tenido siempre una muy buena disposición y pronta respuesta a mis dudas dentro del laboratorio. A Edouard Acuña por ser un excelente compañero de tema de memoria, apoyando y aportando con su conocimiento al desarrollo de este trabajo.

A Omar Ignacio Labra, por aportar su granito de arena a esta memoria, por el apoyo y constante aliento para terminar esta etapa. Gracias por el cariño y cada palabra de ánimo entregada.

Para finalizar, no puedo dejar de mencionar a mis amigos a quienes conocí a lo largo de la vida universitaria, por la amistad compartida, las experiencias vividas, los malos (pocos) y buenos momentos. Esta parte es para ustedes: Alex, Amparo, Belén, Coty, Cristóbal, Danae, Karin, Michel, Alejandro (Ovalle), Rodrigo (Yoyi) y Vale, han sido lejos los mejores compañeros y amigos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Objetivo general	4
Objetivos específicos.....	4
MATERIALES Y MÉTODO.....	5
Lugar de estudio	5
MATERIALES	5
Suelo contaminado con plomo.....	5
Material vegetal	5
MÉTODOS.....	6
Tratamientos y diseño experimental	6
Caracterización química y física del suelo	7
Análisis de agua de riego.....	8
Propiedades químicas del agente quelante	9
Evaluación del material vegetal.....	9
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
Caracterización inicial del suelo	12
Concentración de plomo en plantas	14
Materia seca y altura de plantas	19
Índices de fitorremediación	22
Evaluación de propiedades químicas del suelo al final del ensayo	24
CONCLUSIONES	28
BIBIOGRAFÍA	29

RESUMEN

En la actualidad, la preocupación por el efecto de los elementos traza metálicos ha ido en aumento debido a su persistencia, a su acumulación progresiva en distintos medios naturales y fundamentalmente, por el efecto tóxico que manifiestan en pequeñas concentraciones, llegando a ocasionar problemas en ecosistemas y en la salud humana. Uno de ellos, el plomo, es uno de los elementos que constituye el grupo de los elementos traza metálicos, no esencial y contaminante ambiental.

Para disminuir el impacto de suelos contaminados, se emplea la técnica de fitorremediación que implica la utilización de plantas capaces de contener, extraer o reducir los contaminantes a través de la acción de las raíces y su microflora. Además, complementariamente, se utilizan agentes quelantes, que tienen como propósito aumentar la biodisponibilidad de metales en el suelo.

El presente trabajo tiene como objetivo aplicar la fitorremediación inducida como estrategia de mitigar la contaminación de suelos por plomo mediante el cultivo de *Atriplex halimus* L.

El ensayo se llevó a cabo en las dependencias de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile. Se determinaron las principales propiedades químicas y extracción secuencial en el suelo. Se establecieron 24 macetas con suelo contaminado con Pb (2.950 mg kg⁻¹) proveniente de La Comuna de Puchuncaví, Región de Valparaíso (Chile), y se incorporó ácido cítrico en dos dosis como agente quelante (4 g L⁻¹ y 8 g L⁻¹) a través del agua de riego. Se evaluó la concentración de Pb de la especie *Atriplex halimus* L. a los 90 y 180 días de ensayo.

Los resultados obtenidos, permiten señalar que la aplicación continua de ácido cítrico produjo un aumento significativo en la concentración de Pb en la planta. La dosis de 8 g L⁻¹, permitió obtener las mayores concentraciones del elemento en la planta, alcanzando 28,6 ± 3,9 mg kg⁻¹ en hojas y 200,2 ± 38,8 mg kg⁻¹ en raíces. Sin embargo, se observó que, a los 180 días de ensayo, la adición de ácido cítrico disminuyó significativamente la producción de materia seca en raíces. La especie *Atriplex halimus* L. presentó bajos valores para el índice de transporte aérea tanto a los 90 como a los 180 días de ensayo. Esto indica la capacidad que tiene *Atriplex halimus* L. para acumular el plomo en las raíces, siendo una especie recomendable para la fitoestabilización suelos contaminados con plomo.

Palabras clave: Ácido cítrico, contaminación, extracción secuencial, biodisponibilidad.

ABSTRACT

Nowadays, the preoccupation to the effect of the metal trace elements has been increasing due to its persistence, its progressive accumulation in different natural means and fundamentally, by the toxic effect that manifests in small concentrations, getting to cause problems in ecosystems and in human health. One of them, the lead, is one of the elements that constitutes the metallic trace elements, not essential and environmental pollutant.

To decrease the impact of contaminated soils, phytoremediation technique is used, this implies the use of plants capable of containing, extracting or reducing pollutants through the action of the roots and their microflora. Also, complementarily, chelating agents are used, whose purpose is to increase the bioavailability of metals in soil.

The present work has as objective apply the phytoremediation induced as a strategy to mitigate contamination of soils by lead through the cultivation of *Atriplex halimus* L.

The test was carried out in the dependencies of the Faculty of Agronomic Sciences of the University of Chile. The main chemical properties and sequential extraction in the soil were determined. Twenty-four pots with soil contaminated with Pb (2.950 mg kg^{-1}) of the Puchuncaví Commune, Valparaíso Region (Chile) were established, and citric acid was incorporated into two doses as chelating agent (4 g L^{-1} and 8 g L^{-1}) through the water of irrigation. Concentration of Pb in *Atriplex halimus* L. were evaluated at 90 and 180 days of assay.

The results obtained indicate that the continuous application of citric acid produced a significant increase in the concentration of Pb in plant. The dose of 8 g L^{-1} , it was possible to obtain the highest concentrations of the element in the plant, reaching $28,6 \pm 3,9 \text{ mg kg}^{-1}$ in leaves and $200,2 \pm 38,8 \text{ mg kg}^{-1}$ in roots. However, it was observed that at 180 days of the test, the addition of citric acid significantly reduced dry matter production in roots. The species *Atriplex halimus* L. presented low values to the air transport indicator in both 90 days and 180 days. This indicates the capacity that *Atriplex halimus* L. has to accumulate the lead in the roots, being a species recommend to polluted soils phytostabilization with lead.

Key words: Citric acid, pollution, sequential extraction, bioavailable.

INTRODUCCIÓN

El plomo (Pb) es considerado un elemento traza metálico (ETM) en suelos, siendo sus fuentes más comunes la galena (PbS), la cerusita (PbCO₃) y la anglesita (PbSO₄). Este metal es tóxico, contaminante de suelos y cuerpos de agua cuando se encuentra en altas concentraciones y no cumple ninguna función fisiológica en los organismos. El Pb se encuentra de manera natural en las rocas de la corteza terrestre, sin embargo, gran parte de su presencia y acumulación en el medio ambiente se debe al efecto de diversas actividades antropogénicas que liberan el Pb, como las cenizas de las fundiciones industriales y las deposiciones geoquímicas (Adriano, 2001). En la actualidad, las principales fuentes que causan una alta concentración de Pb en el medioambiente provienen de pinturas a base de compuestos de Pb, gasolinas y la fabricación y reciclado de baterías que contienen este elemento (Baird, 2001). El Pb tiene la capacidad de sustituir al Ba, K, Sr, e incluso al Ca y al Na, tanto en la estructura de minerales, como en los sitios de adsorción del suelo (Adriano, 2001).

El suelo es un medio donde los metales pueden persistir durante mucho tiempo y que, debido a su naturaleza inorgánica, no son degradados en el suelo (Becerril et al., 2007). Una alternativa sustentable para mitigar las altas concentraciones de metales en los suelos es la fitorremediación. Esta técnica es definida como el uso de plantas para disminuir la concentración de un contaminante a través de la absorción y fijación en los tejidos vegetales (Chaney et al., 1997), es fácil de implementar y de bajo costo (Pilon-Smits, 2005). Dos de las principales técnicas de fitorremediación son la fitoestabilización y la fitoextracción, cuyo empleo depende de las características del contaminante (Peralta et al., 2010). La fitoestabilización consiste en la acumulación del metal preferentemente en la raíz de la planta; donde el elemento metálico es retenido en el tejido radicular de formas orgánicas, evitando ser traslocado al tejido aéreo. La fitoestabilización reduce la movilidad de los metales, previniendo el movimiento vertical de éstos en el perfil de suelo (Ginocchio et al., 2004). La fitoextracción involucra la acumulación y concentración del metal preferentemente en el tejido aéreo de la planta (Peralta et al., 2010). El proceso de fitoextracción puede ser continuo mediante el empleo de plantas acumuladoras o hiperacumuladoras, o bien, ser inducido a través de la adición de agentes quelantes para aumentar la biodisponibilidad del elemento en el suelo (Wenzel y Dos Santos, 2006). Los agentes quelantes forman complejos con los metales y pueden movilizarlos para que sean absorbidos por las raíces de la planta. Un agente quelante natural es el ácido cítrico, que ha sido utilizado en la fitoextracción de otros metales y metaloides (As, Cr y Cu) aumentando su biodisponibilidad en el suelo (Egbuchunam et al., 2010; Tapia et al., 2013).

Atriplex halimus L. (Chenopodiaceae) es una especie arbustiva, perenne, con metabolismo C4 (Manousaki y Kalogerakis, 2009), halófita (resistente a la salinidad), xerófita (resistente a la sequía) y nativa de zonas áridas y semiáridas de la cuenca del Mediterráneo (Lutts et al., 2004). Esta especie tiene una alta capacidad de rehabilitar suelos contaminados, al tolerar altas concentraciones de metales tóxicos, además se caracteriza por su alta

producción de biomasa aérea, asociada a un sistema radicular profundo (Sayer y Gadd, 2001).

Pérez (2011), observó una elevada producción de biomasa en *Atriplex halimus* en suelos contaminados con Cu y Zn, presentando una importante concentración en el tejido aéreo, sugiriendo una favorable implementación de esta especie en técnicas de fitoextracción de metales. En otros estudios, Tapia (2007) señala que la especie arbustiva *Atriplex* manifiesta capacidad fitoextractora de Pb, además, afirma que la adición de ácido cítrico aumenta la concentración foliar de Mn en la especie *Atriplex halimus*.

Objetivo general

- Evaluar la estrategia de fitorremediación inducida para mitigar la contaminación de suelos por plomo mediante el cultivo de *Atriplex halimus* L.

Objetivos específicos

- Evaluar la concentración de plomo en hoja, tallo y raíz en *Atriplex halimus* L. con la aplicación de ácido cítrico en suelos contaminados con plomo.
- Comparar el factor de bioacumulación, índice de transporte a la parte aérea y porcentaje de fitoextracción de *Atriplex halimus* L. con y sin la aplicación de ácido cítrico.
- Evaluar la distribución del plomo en el suelo con la aplicación de ácido cítrico mediante extracción secuencial.

MATERIALES Y MÉTODO

Lugar de estudio

El ensayo se llevó a cabo en el invernadero de investigación de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicada en la Comuna de La Pintana, Provincia de Santiago (33°40' latitud Sur y 70°38' longitud Oeste), Región Metropolitana. Los análisis de suelos y tejido vegetal se realizaron en el Laboratorio de Química de Suelos y Aguas del Departamento de Ingeniería y Suelos de la misma facultad.

Materiales

Suelo contaminado con plomo

El suelo con elevadas concentraciones de plomo ($2952 \pm 297 \text{ mg kg}^{-1}$), fue obtenido de un patio trasero (20 m²) de la escuela Básica “La Laguna”, la cual se sitúa en la ladera de un cerro de la Comuna de Puchuncaví, Región de Valparaíso (273017 m E, 6386884 m S). Según antecedentes preliminares, este suelo pertenece a una mezcla con escombreras que se utilizó para rellenar y nivelar el terreno de la escuela. Posteriormente, al extraer las muestras de suelos, se procedió a incorporar una capa de compost.

Las muestras de suelo se extrajeron a 10 cm de profundidad y fueron homogenizadas en un harnero de 0,5 cm con la finalidad de descartar el suelo con diámetro mayor.

Material vegetal

Las plantas de *Atriplex halimus* se obtuvieron a partir de la germinación de semillas procedentes de “Semillas Montaraz”, España. Para la germinación de las semillas, se procedió a cortar las brácteas y perforar la testa sin dañar el embrión según la metodología utilizada por Lailhacar-Kind y Laude (1975). Posteriormente, las semillas se colocaron en placas Petri con algodón humedecido, permaneciendo durante 72 horas en una cámara de cultivo a 28°C. Una vez germinadas, las plántulas de 1 a 2 cm se trasplantaron en vasos plásticos con compost de restos vegetales, y se mantuvieron en condiciones de invernadero durante 8 meses, adicionando riegos de 1 a 2 veces por semana. Luego de este período, para facilitar su adaptación, fueron mantenidas al exterior durante 1 mes antes del trasplante definitivo a las macetas con el suelo contaminado con Pb. Se utilizaron 18 ejemplares de *Atriplex halimus* para conformar los tratamientos y 4 para la caracterización inicial del tejido vegetal. Para iniciar el ensayo se seleccionaron plantas de similar altura.

Métodos

Tratamientos y Diseño Experimental

El ensayo consistió, por una parte en el establecimiento de plantas de *Atriplex halimus* en macetas con suelos contaminados con Pb y la posterior aplicación de ácido cítrico (AC) como agente quelante en diferentes dosis (Cuadro 1). El tratamiento control se definió como T1, regado sólo con agua del invernadero. Para los tratamientos T1, T2 y T3 se utilizaron seis repeticiones, las que fueron evaluadas en ensayos destructivos en dos momentos, 90 y 180 días respectivamente para determinar materia seca y la concentración de Pb de los tejidos de las plantas. Para ello, se estableció un DCA con estructura factorial de 3x2, donde un factor correspondió a los tres tratamientos (T1, T2 y T3) y el otro factor correspondió a el tiempo de evaluación (90 y 180 días).

La unidad experimental correspondió a una planta de *Atriplex halimus* cultivada en suelo contaminado con Pb, considerando la aplicación de ácido cítrico en dos dosis, frente a suelo sin la aplicación del agente quelante.

Por otra parte, para evaluar algunas propiedades del suelo (CE, materia orgánica y pH), se estableció un DCA con 5 tratamientos (Cuadro 2): T1, T2, T3, T4 y T5, con 3 repeticiones por tratamiento. T1, T2 y T3 consideró el suelo con plomo utilizado en el ensayo con plantas de *Atriplex halimus*. Los tratamientos T4 y T5 fueron establecidos con la finalidad de comparar algunas propiedades químicas del suelo y la disponibilidad de Pb en el suelo, al adicionar dos diferentes dosis de ácido cítrico. El ensayo se inició en diciembre de 2014 y se mantuvo hasta junio de 2015.

Cuadro 1. Tratamientos de *Atriplex halimus* en el suelo contaminado con plomo.

Tratamiento	Repeticiones	Especie	Riego	Dosis (g L ⁻¹)
T1	6	<i>A. halimus</i> L.	Control (agua)	–
T2	6	<i>A. halimus</i> L.	ácido cítrico	4
T3	6	<i>A. halimus</i> L.	ácido cítrico	8

Cuadro 2. Tratamientos de suelo contaminado con plomo.

Tratamiento	Repeticiones	Suelo	Riego	Dosis (g L ⁻¹)
T1	3	Con planta	Control (agua)	–
T2	3	Con planta	ácido cítrico	4
T3	3	Con planta	ácido cítrico	8
T4	3	Sin planta	ácido cítrico	4
T5	3	Sin planta	ácido cítrico	8

El riego se realizó con agua obtenida del invernadero hasta el punto de saturación del suelo, evitando suministrar una dosis de lavado para no generar una lixiviación del Pb, pero sí proporcionando el agua suficiente para evitar el estrés hídrico de las plantas. Las diferentes dosis de AC (4 g L^{-1} y 8 g L^{-1}) fueron disueltas en el agua de riego y preparadas en laboratorio. Las dosis de 4 g L^{-1} se estableció según la concentración de ácido orgánico presente en una solución nutritiva estándar (Hoagland y Arnon, 1950) como agente quelante de micronutrientes. También Tapia et al. (2013) y Acuña (2016) utilizaron esta concentración de AC en ensayos de fitorremediación. Con respecto a la dosis de 8 g L^{-1} corresponde al doble de la dosis de la solución nutritiva estándar ya mencionada. Para la preparación de las dosis, se pesó el ácido cítrico, (Merck, peso molecular $210,14 \text{ g mol}^{-1}$), y posteriormente se adicionó el agua proveniente del invernadero (agua de pozo), mezclando hasta diluir completamente el producto en el agua. El riego se aplicó de manera manual y la frecuencia de riego definida fue de 3 veces por semana (300 ml) para los meses de diciembre a marzo, y 2 veces por semana (250 ml) para los meses de abril y mayo. Durante el ciclo de crecimiento del cultivo se efectuó un control de malezas de manera manual.

El promedio de las temperaturas máximas y mínimas para los meses de verano fueron de $29,4^{\circ}\text{C}$ y $11,8^{\circ}\text{C}$ respectivamente, mientras que para los meses de otoño el promedio varió entre $8,1^{\circ}\text{C}$ y $25,8^{\circ}\text{C}$. La precipitación total registradas para los seis meses de ensayo fue de 13,1 mm, siendo marzo el mes que registró el mayor aporte de agua (7,4 mm). Es importante señalar que las plantas fueron protegidas para los eventos de lluvia, y por lo tanto no recibieron este aporte adicional de agua.

Caracterización química y física del suelo

Se realizó una caracterización química y física inicial del suelo utilizado en el ensayo, por cuadruplicado. Los análisis químicos, se realizaron siguiendo la metodología que propone Sadzawka et al. (2006). La determinación de pH se efectuó en agua (1:2,5 p/v) mediante el método potenciométrico, con un pHmetro (HANNA Instruments, HI3221); la conductividad eléctrica (CE) se midió en extracto de saturación, mediante el uso de un conductivímetro (Oakton, CON 510). El N disponible se determinó mediante extracción con KCl y posterior destilación; el P disponible, se determinó mediante el método de Olsen, utilizando métodos por determinación colorimétrica con $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$; el K disponible se obtuvo a partir de una extracción con acetato de amonio 1M a pH 7,0 y medición mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA, Perkin Elmer 310). La capacidad de intercambio catiónico se obtuvo mediante el uso de acetato de sodio y acetato de amonio a pH 8,2 (Chapman, 1965), con posterior determinación de sodio mediante EAA. La materia orgánica (MO) se estimó por calcinación a 360° durante 16 horas. Para determinar los niveles totales de Pb y otros ETM (Cr, Cu, Mn y Zn), se pesó 0,5 g de muestra y se adicionó HNO_3 y H_2O_2 (Moreno-Jimenez et al., 2010), posteriormente la digestión se realizó en autoclave (HIRAYAMA, HL30 E) a 125°C y $1,5 \text{ kg cm}^2$ durante 35 min. Los metales fueron determinados mediante EAA.

La extracción secuencial de Pb se realizó según la metodología adaptada de Tessier et al.

(1979). Los procedimientos para cada fracción (F) son descritos a continuación:

- FI (Intercambiable- Soluble): adición de $MgCl_2$ a pH neutro y a temperatura ambiente.
- FII (Ligado a carbonatos): adición de acetato sódico a pH 5 con ácido acético.
- FIII (Ligado a óxidos e hidróxidos de Fe y Mn): adición de clorhidrato de hidroxilamina en ácido acético.
- FIV (Ligado a materia orgánica): se subdivide en tres etapas, dado por la oxidación de la materia orgánica:
 - 1.- Adición de HNO_3 y H_2O_2 .
 - 2.- Adición de H_2O_2 .
 - 3.- Adición de NH_4Oac en HNO_3 .
- FV (Residual): digestión ácida con HNO_3 y H_2O_2 .

Al finalizar el ensayo (180 días), se realizó una caracterización de los suelos de cada tratamiento, para determinar pH, CE, MO y extracción secuencial.

Con respecto a los análisis físicos del suelo, la textura se determinó mediante el método del hidrómetro de Bouyoucous y la densidad aparente del suelo, mediante cilindros (Sandoval et al., 2012).

Análisis de agua de riego

Se realizó un análisis del agua de invernadero (Cuadro 3), según las metodologías propuestas por Sadzawka (2006). Se observa un alto valor de conductividad eléctrica, lo que indica la posibilidad de tener efectos perjudiciales en cultivos sensibles (NCh1333, 1987). Respecto a la concentración de Ca^{+2} y Mg^{+2} , la dureza del agua es clasificada como dura (Cadahía et al., 2005), y el pH es óptimo para el agua de riego.

Cuadro 3. Características químicas del agua de riego utilizada en el ensayo.

Parámetro	Unidad	Agua de Riego
pH	-	7,5
CE	(dS m^{-1})	1,39
Ca^{+2}	(mg L^{-1})	161,52
K^{+}	(mg L^{-1})	21,51
Mg^{+2}	(mg L^{-1})	1,64
Na^{+}	(mg L^{-1})	89,47
Cl^{-}	(mg L^{-1})	116,31
HCO_3^{-}	(mg L^{-1})	40,27
SO_4^{-}	(mg L^{-1})	235,83
Dureza	(grados hidrométricos franceses)	41,01

Fuente: Acuña (2016).

Propiedades químicas del agente quelante

Se evaluó el pH, CE y concentración de Pb en las soluciones de riego con ácido cítrico (Cuadro 4), que fueron preparadas con el agua de riego descrita en el Cuadro 3. No se detectó Pb en el agua de riego.

Cuadro 4. Propiedades químicas del ácido cítrico.

Muestra	pH	CE	Pb
AC (4g L ⁻¹)	2,5 ± 0,05	2,9 ± 0,03	nd
AC (8g L ⁻¹)	2,2 ± 0,01	3,3 ± 0,05	nd

AC, ácido cítrico. Valores corresponden a promedios ± desviación estándar (n=3). CE, conductividad eléctrica (dS m⁻¹). nd: no detectado (concentración de Pb inferior al límite de detección del equipo, EAA: 0,1 mg L⁻¹).

Evaluación del material vegetal

La materia seca (MS) inicial de las plantas fueron en promedio 0,09 ± 0,02 g en hojas; 0,04 ± 0,01 g en tallos y 0,02 ± 0,00 g en raíz (n=4). La altura de plantas se midió cada 30 días, durante los 180 días de ensayo. Al cabo de 90 y 180 días de iniciado el ensayo con los tratamientos, las plantas fueron cosechadas. Cada planta fue extraída y analizada en forma individual en triplicado. Primero, se lavaron las plantas completas para quitar restos de suelo y polvo con agua potable. Inmediatamente, se volvieron a lavar con agua destilada, procurando sacar la máxima cantidad de suelo adherido a las raíces. Se dividieron cuidadosamente los individuos en hojas, tallos y raíz para finalmente, secar el material vegetal en bolsas de papel en estufa a 60 ± 5°C hasta alcanzar masa constante. Posteriormente, se realizó la determinación de MS.

El material vegetal (0,5 g) fue molido y digerido con 10 mL de agua destilada, 3 mL de HNO₃ y 2 mL de H₂O₂ en una autoclave a 125°C y 1,5 kg cm² por 35 min (Moreno-Jiménez et al., 2012).

Con los valores de concentración de Pb en parte aérea se procedió a calcular los siguientes índices de fitorremediación para el Pb:

Índice de transporte del metal a la parte aérea (*Ti*) (Egbuchunam et al., 2010):

$$Ti = \frac{\text{Concentración de metal en hojas (mg kg}^{-1}\text{)}}{\text{Concentración de metal en raíz (mg kg}^{-1}\text{)}}$$

Factor de bioacumulación (*FBC*) (Ghosh y Singh, 2005):

$$FBC = \frac{\text{Concentración de metal en parte aérea de la planta (mg kg}^{-1}\text{)}}{\text{Concentración inicial de metal en el suelo (mg kg}^{-1}\text{)}}$$

Porcentaje de fitoextracción (*PF*) (Tapia et al., 2011):

$$PF (\%) = \frac{\text{Contenido de metal en parte aérea (mg)}}{\text{Contenido inicial de metal en el suelo de la maceta (mg)}} \times 100$$

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de las variables Concentración de Pb (Hoja, Tallo y Raíz), MS, *Ti*, *FBC* y *PF* se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con un nivel de significancia del 5%, previa verificación de los supuestos del modelo del software estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2017). En caso de encontrar interacción entre los niveles de los factores “Tratamiento” y “Tiempo”, el análisis se realizó comparando los niveles de un factor dentro de cada nivel del otro factor. Por el contrario, de no encontrar interacción, se procedió a evaluar cada factor de manera independiente. Cuando se hallaron diferencias estadísticamente significativas, se procedió a realizar la prueba de comparaciones múltiples de LSD de Fisher.

Las variables CE, MO y pH evaluadas en el suelo a los 180 días de ensayo fueron analizados mediante un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5%, previa verificación de los supuestos del modelo. Cuando se hallaron diferencias estadísticamente significativas, se procedió a realizar la prueba de comparaciones múltiples de LSD de Fisher. El mismo análisis fue utilizado para evaluar la altura de plantas a los 180 días de ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización inicial del suelo

Las principales características químicas, físicas y concentraciones de metales del suelo en estudio, se presentan en el Cuadro 5. El suelo corresponde a un suelo salino, con pH débilmente ácido y un alto contenido de materia orgánica según las referencias citadas por Jones, (2003). Con respecto a los niveles de N y K disponibles corresponden a valores altos (Riquelme et al., 2004), mientras que el P disponible se encontró en un rango medio (Bernier y Bortolameo, 2000). Respecto a la textura, la clase textural corresponde a franco arenosa, con una densidad aparente alta de 1,46 Mg m⁻³. El análisis de elementos traza totales mostró altos niveles de Pb en el suelo, superando ampliamente los rangos considerados normales (2-300 mg kg⁻¹) y tóxicos (100-400 mg kg⁻¹) en suelos (Kabata-Pendias, 2001). Con respecto al Cr, según Aguilar et al. (1999), los niveles considerados normales en suelos agrícolas son menores a 100 mg kg⁻¹, por lo que el Cr presentó altos niveles, aunque el valor es menor al límite máximo para parques naturales (500 mg kg⁻¹). En el caso del Cu, el nivel observado se encuentra dentro de los límites citados (50-140 mg kg⁻¹) cuando el pH del suelo es de 6,0-7,0, (Prasad, 2008). Por otro lado, el Mn sobrepasó los límites considerados normales (0-500 mg kg⁻¹), según los niveles establecidos por las directivas de Kelly, (Kelly, 1980). Sin embargo, en suelos agrícolas se han encontrado niveles de Mn de alrededor de 1000 mg kg⁻¹ (Acevedo et al., 2005). Con respecto al elemento Zn, se encuentra dentro de los niveles considerados no contaminados, no superando el rango límite (150-300 mg kg⁻¹) para suelos de pH entre 6,0 y 7,0.

Cuadro 5. Propiedades físicas y químicas iniciales del suelo contaminado con plomo.

Parámetro	Unidades	Valor
CE	(dS m ⁻¹)	4,58 ± 0,53
pH _{agua (1:2,5)}	—	6,3 ± 0,13
MO	(%)	5,28 ± 0,05
N _{disponible}	(mg kg ⁻¹)	55,23 ± 2,63
P _{Olsen}	(mg kg ⁻¹)	15,44 ± 0,42
K _{intercambiable}	(cmol ₊ kg ⁻¹)	0,59 ± 0,02
Cu _{total}	(mg kg ⁻¹)	111,88 ± 5,10
Cr _{total}	(mg kg ⁻¹)	297 ± 52,0
Mn _{total}	(mg kg ⁻¹)	727 ± 26,3
Pb _{total}	(mg kg ⁻¹)	2952 ± 297
Zn _{total}	(mg kg ⁻¹)	77,5 ± 5,00
Arcilla	(%)	19,07 ± 2,05
Limo	(%)	21,78 ± 4,00
Arena	(%)	59,15 ± 5,21
Densidad aparente	(Mg m ⁻³)	1,46 ± 0,05

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=4).

Con respecto a la extracción secuencial de Pb en el suelo (Cuadro 6), se observó que el metal se encontró principalmente ligado a carbonatos (FII) y a óxidos de Fe y Mn (FIII), alcanzando un total de 82%. Se observa, además, una baja disponibilidad del Pb en la fracción FI (1,02 %), de acuerdo a la concentración total del suelo. Kopittke et al. (2008), mencionan que sólo pequeñas cantidades de Pb en el suelo se encuentran de manera soluble y por lo tanto de manera disponible para las plantas. Por otro lado, Miller et al. (2008), atribuye la baja disponibilidad del Pb en el suelo, a la formación de complejos con coloides orgánicos e inorgánicos, además, de su precipitación en forma de carbonatos e hidróxidos. Ponizovsky y Mironenko (2001), mencionan que, en el caso de suelos con pH débilmente ácidos, el Pb en la fracción FI se encuentra presente en el rango de 0-1%.

Es importante señalar que, la distribución de Pb presente en el suelo indica un origen antropogénico, ya que en gran parte el Pb se encuentra asociado a los óxidos de Fe y Mn, atribuyéndose este comportamiento a suelos de origen antrópico según Teusch et al. 2001, quienes compararon la distribución de Pb natural y Pb antropogénico en suelos mediterráneos.

En el Cuadro 6, se observa un 87,6 % de recuperación de Pb de acuerdo con los resultados de fraccionamiento realizado en el suelo, en relación con la concentración obtenida mediante una digestión ácida total del suelo en estudio ($2,952 \pm 297 \text{ mg kg}^{-1}$). Este porcentaje de recuperación obtenido fue mayor al descrito por Tapia et al. (2013), quienes indicaron un porcentaje de recuperación de Pb de un 79,5 %.

Cuadro 6. Distribución de plomo (mg kg^{-1}) en las distintas fracciones del suelo según extracción secuencial realizada al inicio del ensayo.

Distribución de Pb en el suelo					
FI	FII	FIII	FIV	FV	Total
(mg kg^{-1})					
$26,4 \pm 2,2$	$1086,5 \pm 153,8$	$1042,0 \pm 86,8$	$344,3 \pm 4,2$	$87,1 \pm 10,8$	2586,2
(%)					
1,02	42,01	40,29	13,31	3,37	*87,6

Valores corresponden a promedio \pm desviación estándar (n=4). *Recuperación respecto a la concentración total extraída ($2,950 \text{ mg kg}^{-1}$) mediante digestión ácida.

Concentración de plomo en plantas

Al comparar las concentraciones de Pb en hojas de *Atriplex halimus* a los 90 y 180 días de tratamientos, se observó un aumento significativo de las concentraciones en los tratamientos T1 y T3 (Figura 1).

Se observa, además, que el nivel de Pb obtenido en el tejido radical fue notoriamente mayor que el obtenido en la parte aérea, siendo los tratamientos T2 y T3 los que obtuvieron los mayores valores. Resultados con concentraciones de $\approx 20000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Pb en raíces de *Atriplex halimus* fueron informados por Amer et al. (2013), quienes denominaron en su investigación a *Atriplex halimus* como la especie más eficiente en acumular Pb en las raíces, en comparación con *Medicago lupulina* y *Portulaca oleracea*.

Respecto al tejido radical, en la Figura 1 se observan concentraciones de Pb del orden de 61,7- 108,5 mg kg^{-1} a los 90 días y de 63,5- 200,2 mg kg^{-1} a los 180 días. Se observa también, que los niveles de concentración de Pb en raíces del tratamiento T3 a los 180 días fue hasta cuatro veces superior a los determinados en el tejido aéreo.

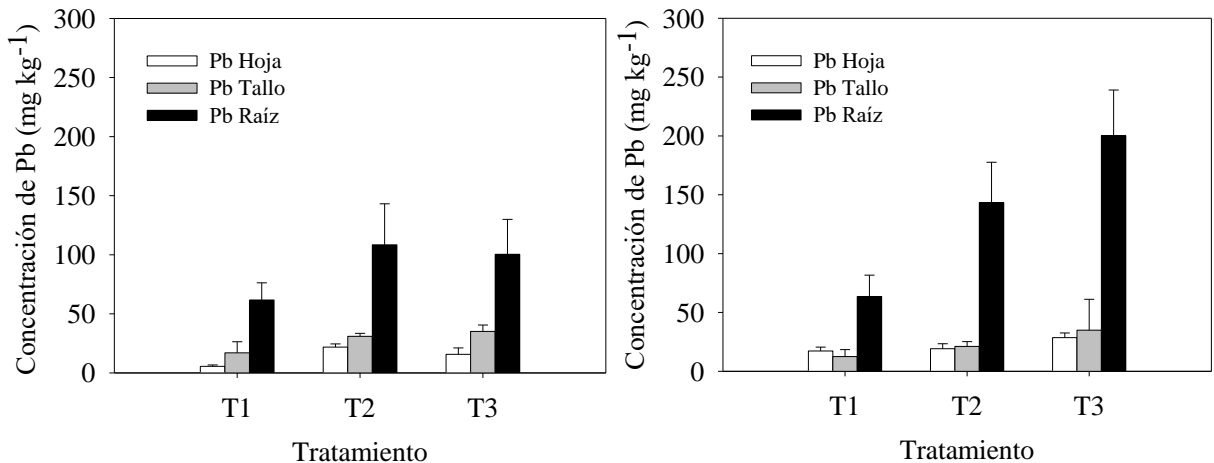


Figura 1. Concentración de Pb (mg kg^{-1}) en tejidos de *Atriplex halimus* a los 90 días (izquierda) y 180 días (derecha) del ensayo. T1: Control; T2: riego con ácido cítrico 4 g L^{-1} y T3: Riego con ácido cítrico 8 g L^{-1} . Barras sobre columnas indican desviación estándar ($n=3$).

Las concentraciones de Pb (Cuadro 7) observadas a los 90 días de ensayo en hojas de *Atriplex halimus* variaron en el rango de $5,5\text{-}21,7 \text{ mg kg}^{-1}$, mientras que para la segunda fecha de evaluación (180 días) las concentraciones aumentaron de $17,2$ a un $28,6 \text{ mg kg}^{-1}$. Los máximos rangos determinados en hojas para este estudio se encuentran cercanos al rango de toxicidad por Pb para hojas maduras ($30\text{-}300 \text{ mg kg}^{-1}$) definido por Kabata-Pendias (2011).

Al analizar estadísticamente el efecto de los factores “Tratamiento” y “Tiempo”, se mostró interacción entre estos dos factores en hojas (cuadros 7 y 8) y raíces (cuadros 9 y 10), es decir, los factores actúan en conjunto y no por sí solos.

Cuadro 7. Efecto del factor “Tratamiento” en cada nivel del factor “Tiempo” en la concentración de plomo (mg kg^{-1}) de hojas de *Atriplex halimus*.

Tratamiento	Tiempo (días)	
	90	180
T1	$5,5 \pm 1,2$ c	$17,2 \pm 3,3$ b
T2	$21,7 \pm 2,8$ b	$19,2 \pm 4,2$ b
T3	$15,7 \pm 5,4$ b	$28,6 \pm 3,9$ a

Valores corresponden a promedio \pm desviación estándar ($n=3$). Promedios unidos por letras distintas en sentido vertical indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos dentro de cada tiempo ($p<0,05$, LSD de Fisher).

Cuadro 8. Efecto del factor “Tiempo” en cada nivel del factor “Tratamiento” en la concentración de plomo (mg kg^{-1}) de hojas de *Atriplex halimus*.

Tiempo (días)	Tratamiento		
	T1	T2	T3
90	$5,5 \pm 1,2$ c	$21,7 \pm 2,8$ b	$15,7 \pm 5,4$ b
180	$17,2 \pm 3,3$ b	$19,2 \pm 4,2$ b	$28,6 \pm 3,9$ a

Valores corresponden a promedio \pm desviación estándar ($n=3$). Promedios unidos por letras distintas en sentido vertical indican diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos dentro de cada tratamiento ($p<0,05$, LSD de Fisher).

Con respecto al tiempo de evaluación en la concentración de Pb en hojas, a los 90 días de ensayo, los tratamientos T2 y T3 fueron los que presentaron las mayores concentraciones de Pb, sin embargo, a los 180 días de ensayo sólo el tratamiento T3 se diferenció estadísticamente de los demás tratamientos, obteniendo la mayor concentración de Pb (Cuadro 7). Los tratamientos T1 y T3 presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a las dos fechas evaluadas, siendo el tratamiento T1 el que presentó las concentraciones de Pb más bajas Pb ($5,5 \text{ mg kg}^{-1}$) a los 90 días de tratamiento y el tratamiento T3 el que presentó la concentración de Pb más alta a los 180 días ensayo ($28,6 \text{ mg kg}^{-1}$).

De acuerdo con la concentración de Pb dentro de un mismo tratamiento a lo largo del tiempo (Cuadro 8), se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos T1 y T3, obteniéndose en ambos casos la mayor concentración de Pb en el segundo momento de evaluación.

Cuadro 9. Efecto del factor “Tratamiento” en cada nivel del factor “Tiempo” en la concentración de plomo (mg kg^{-1}) de raíces de *Atriplex halimus*.

Tratamiento	Tiempo (días)	
	90	180
T1	61,7 ± 14,6 c	63,5 ± 18,2 c
T2	108,5 ± 34,7 bc	143,3 ± 34,2 b
T3	100,4 ± 29,6 bc	200,2 ± 38,8 a

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=3). Promedios unidos por letras distintas en sentido vertical indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos dentro de cada tiempo ($p < 0,05$, LSD de Fisher).

Cuadro 10. Efecto del factor “Tiempo” en cada nivel del factor “Tratamiento” en la concentración de plomo (mg kg^{-1}) de raíces de *Atriplex halimus*.

Tiempo (días)	Tratamiento		
	T1	T2	T3
90	61,7 ± 14,6 c	108,5 ± 34,7 bc	100,4 ± 29,6 bc
180	63,5 ± 18,2 c	143,3 ± 34,2 b	200,2 ± 38,8 a

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=3). Promedios unidos por letras distintas en sentido vertical indican diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos dentro de cada tratamiento ($p < 0,05$, LSD de Fisher).

Con respecto a las raíces (cuadro 9 y 10) se observó una tendencia similar a lo ocurrido en hojas, en donde el tratamiento T3 a los 180 días de ensayo (Cuadro 9) presentó las mayores concentraciones de Pb ($200,2 \text{ mg kg}^{-1}$) seguido del tratamiento T2 ($143,3 \text{ mg kg}^{-1}$). A los 90 días de evaluación, el tratamiento T1 fue el que presentó la menor concentración de Pb en raíces ($61,7 \text{ mg kg}^{-1}$).

En el Cuadro 10, las concentraciones de Pb en raíces a través del tiempo no mostraron diferencias significativas en el tratamiento T1, no obstante, los tratamientos T2 y T3 sí presentaron diferencias estadísticamente significativas, destacando este último sobre el tratamiento T2, ya que presentó un aumento significativo desde los 90 a los 180 días de ensayo, obteniendo la concentración de $\approx 200 \text{ mg kg}^{-1}$.

Las mayores concentraciones de Pb observadas en hojas y raíces de los tratamientos T2 y T3 en *Atriplex halimus*, son atribuidos a la adición de AC, cuyo efecto tiende a ser mayor cuando la dosis aplicada es mayor (8 g L^{-1}). La capacidad del AC para actuar como ligando orgánico en el suelo, formando complejos solubles con el Pb podrían explicar este resultado, tal como ha sido obtenido por otros autores (Clemente y Bernal, 2006; Shahid et al., 2012).

Los resultados con respecto al aumento de concentración de metal con la aplicación de ácido cítrico han sido obtenidos también por Freitas et al. (2014), quienes encontraron que

la especie *Sorghum bicolor* obtuvo una mayor absorción de Pb cuando se aplicó AC en una dosis de 40 mmol kg⁻¹. Acuña (2016), en un ensayo similar con *Atriplex halimus*, observó que la aplicación continua de AC (4g L⁻¹) en el agua de riego, promovió mayores concentraciones de Pb en el tejido de las plantas, además señaló, que el efecto se potencia al utilizar una enmienda orgánica en conjunto al ácido cítrico.

También Gao et al. (2012), observaron una mayor absorción por Pb por parte de *Solanum nigrum* cuando se adicionó AC en dosis de 20 mmol kg⁻¹. Por lo tanto, los resultados de este estudio son consecuentes a los obtenidos por otros ensayos, donde el ácido cítrico es usado como agente quelante con el objetivo de aumentar la capacidad de fitoextracción de elementos traza en suelos contaminados (Freitas et al., 2014).

Respecto a la concentración de Pb en tallos, no se observó interacción entre los factores “Tratamiento” y “Tiempo”, por lo que ambos factores fueron analizados de forma separada (cuadros 11 y 12). Según el factor “Tratamiento”, T2 y T3 presentaron las mayores concentraciones de Pb durante todo el período de la evaluación (Cuadro 11), observándose que, en el tejido de los tallos, la aplicación de AC mostró una mayor concentración estadísticamente significativa en los tratamientos T2 y T3 en comparación al T1 (sin aplicación de ácido cítrico).

Cuadro 11. Concentración de plomo (mg kg⁻¹) en tallos de *Atriplex halimus* según tratamiento, independiente del tiempo evaluado.

Tratamiento	Concentración de plomo	
	(mg kg ⁻¹)	
T1	14,72 ± 7,5	b
T2	26,01 ± 6,2	a
T3	35,01 ± 17,0	a

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n = 6). Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05, LSD de Fisher).

En relación al factor “Tiempo”, se observó que independiente de tratamiento aplicado no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los 90 y 180 días de ensayo, solo se pudo observar una leve tendencia a la disminución de la concentración de Pb en tallos a los 180 días de crecimiento, respecto a la evaluación realizada a los 90 días de ensayo (Cuadro 12). Esta tendencia observada, puede ser explicado por el efecto dilución, que ha sido referido en numerosos estudios. Según Jarrell and Beverly, (1981), describen una disminución en la concentración de un elemento en el tejido vegetal, debido a un cambio en las condiciones ambientales, incluyendo en estas últimas, cambios en el ambiente del suelo, y que hacen que su disponibilidad sea variable. Por otro lado, Deram et al. (2006) explica el efecto dilución como una disminución de la concentración de un elemento en el tejido de la planta a causa de un aumento de la biomasa. Entonces, la leve inclinación a la disminución de la concentración del Pb en tallos a través del tiempo podría estar dado por el efecto dilución debido al aumento de MS en tallos desde los 90 a los 180

días de ensayo. No obstante, los tallos son tejidos de tránsito, que podrían estar movilizando el Pb en gran parte a los 90 días el Pb hasta las hojas de la planta, pudiendo ser esta la razón de observar una mayor concentración de Pb a los 90 días de evaluación, en comparación a los 180 días de tratamiento.

Cuadro 12. Concentración de plomo (mg kg^{-1}) en tallos de *Atriplex halimus* según tiempo, independiente del tratamiento aplicado.

Tiempo	Concentración de plomo	
	(mg kg^{-1})	
90	27,66 ± 9,9	a
180	22,84 ± 16,8	a

Valores corresponden a promedio \pm desviación estándar ($n = 9$). Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, LSD de Fisher).

Con respecto al tratamiento T3, a los 180 días de ensayo, cabe señalar que se observaron síntomas de toxicidad en las plantas tales como caída de hojas, lo que puede estar atribuido a la alta concentración de Pb observada en raíces ($\approx 200 \text{ mg kg}^{-1}$), así como la mayor concentración de todos los tratamientos observada en hojas ($\approx 28 \text{ mg kg}^{-1}$). Trakal et al. (2015), han reportado que la toxicidad por Pb comienza en el rango de 100 a 200 mg kg^{-1} para la parte aérea. Sin embargo, existen estudios sobre la tolerancia de *Atriplex halimus* a ETM, los cuales señalan que, en relación a los parámetros de crecimiento, la especie es tolerante a altas concentraciones de Cd, Cu, Mn Ni, Pb y Zn (Walker et al., 2014).

Materia seca y altura de plantas

El reparto de materia seca (MS) en los tejidos de *Atriplex halimus* aumentó desde la primera a la segunda fecha evaluada. A los 90 días, el aporte promedio de MS de hojas, tallos y raíces al aporte total de MS fue de 47%, 35% y 17%, respectivamente, y a los 180 días de ensayo fue de 39%, 40% y 21% respectivamente. En la Figura 2, se observa un aumento de los niveles de MS total a través del tiempo, mostrándose en la primera evaluación una variación de los niveles totales entre 5,6 y 6,3 g, mientras que en la segunda entre 7,4 y 9,6 g.

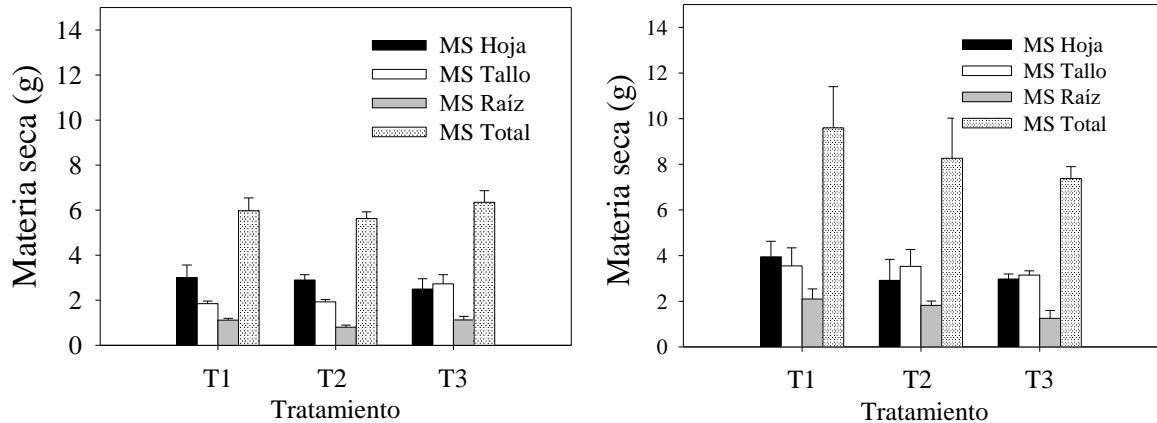


Figura 2. Materia seca (MS) de hojas, tallos y raíces (g) de *Atriplex halimus* a los 90 días (parte superior) y 180 días (parte inferior) de ensayo. Barras sobre columnas indican desviación estándar (n=3).

Según las determinaciones del efecto de los factores “Tratamiento” y “Tiempo”, el análisis estadístico mostró interacción sólo en la parte radical de *Atriplex halimus* (cuadros 13 y 14). En el Cuadro 13, los tratamientos que mayores valores de MS presentaron fueron T1 y T2 a los 180 días de evaluación, los cuales difirieron estadísticamente del tratamiento T3 que presentó los niveles más bajos de MS en raíces. A los 90 días de ensayo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Cuadro 13. Efecto del factor “Tratamiento” en cada nivel del factor “Tiempo” en muestras de materia seca (g) de raíces en *Atriplex halimus*.

Tratamiento	Tiempo (días)	
	90	180
T1	1,1 ± 0,1 b	2,1 ± 0,4 a
T2	0,8 ± 0,1 b	1,8 ± 0,2 a
T3	1,1 ± 0,2 b	1,3 ± 0,3 b

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=3). Promedios unidos por letras distintas en sentido vertical indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos dentro de cada tiempo (p<0,05, LSD de Fisher).

En el Cuadro 14, respecto al tiempo de evaluación, se observan diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos T1 y T2, mostrando los valores de MS en raíces más altos en ambos casos a los 180 días de tratamiento. Por el contrario, el tratamiento T3 no presentó diferencias significativas entre las dos fechas evaluadas.

De estos resultados, y de acuerdo al tratamiento T3 se puede inferir que, la adición de AC disminuyó significativamente la producción de MS en raíces de *Atriplex halimus* a través del tiempo. Esto puede ser atribuible a una mayor concentración de Pb en las raíces observado en el tratamiento T3 (cuadros 9 y 10). Resultados similares fueron observados por Gao et al. (2012) en la especie *Solanum nigrum* L., quienes indicaron que la adición de AC aumentó la acumulación de Cd y Pb en los tejidos de la planta, sin embargo, influyó ligeramente en el crecimiento de la planta.

Cuadro 14. Efecto del factor “Tiempo” en cada nivel del factor “Tratamiento” en muestras de materia seca (g) de raíces en *Atriplex halimus*.

Tiempo (días)	Tratamiento		
	T1	T2	T3
90	1,1 ± 0,1 b	0,8 ± 0,1 b	1,1 ± 0,2 b
180	2,1 ± 0,4 a	1,8 ± 0,2 a	1,3 ± 0,3 b

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=3). Promedios unidos por letras distintas en sentido vertical indican diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos dentro de cada tratamiento (p<0,05, LSD de Fisher).

Para la evaluación de MS en hojas, MS en tallos y MS total no se observó interacción entre los factores “Tratamiento” y “Tiempo”, por lo que se procedió a determinar el efecto de los factores de manera separada (cuadros 15 y 16).

Según el factor “Tratamiento” en MS en hojas, MS en tallos y MS total no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos durante todo el período evaluado (Cuadro 15). Los resultados indican que la aplicación de AC no generó diferencias significativas entre los tratamientos en la producción de MS.

Cuadro 15. Materia seca (g) en hojas y tallos de *Atriplex halimus* según tratamiento, independiente del tiempo evaluado.

Tratamiento	Hoja		Tallo		Total
	(g)				
T1	3,5 ± 0,8 a	2,7 ± 1,1 a	7,8 ± 2,3 a		
T2	2,9 ± 0,6 a	2,7 ± 1,0 a	6,9 ± 1,8 a		
T3	2,7 ± 0,4 a	2,9 ± 0,4 a	6,9 ± 0,7 a		

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n = 6). Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05, LSD de Fisher).

En relación al factor “Tiempo”, para la MS en hojas, MS en tallos y MS total, según se observa en el Cuadro 16, a los 180 días de tratamiento, se denota un incremento significativo de MS en tallos y en el total de la planta respecto de los 90 días de evaluación, mientras que en la MS en hojas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las dos fechas evaluadas.

Cuadro 16. Materia seca (g) en hojas y tallos de *Atriplex halimus* según tiempo, independiente del tratamiento aplicado.

Tiempo (días)	Hoja —	Tallo (g)	Total
90	2,8 ± 0,4 a	2,17 ± 0,5 b	6,0 ± 0,5 b
180	3,3 ± 0,8 a	3,41 ± 0,6 a	8,4 ± 1,6 a

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n = 9). Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05, LSD de Fisher).

Respecto al seguimiento de la altura, T3 se diferenció de los otros tratamientos (T1 y T2), con una menor altura de crecimiento desde los 30 días de ensayo (Figura 3), respondiendo a la menor producción de MS en raíces (cuadros 13 y 14), lo que pudo haber afectado el desarrollo normal de la parte aérea de la planta. En general la tendencia observada a los 180 días de crecimiento es de T2 ≈ T1 > T3. Sin embargo, el tratamiento T3 no obtuvo diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos, en cuanto a la producción de MS aérea. Este resultado puede asociarse a una mayor brotación desde yemas laterales, disminuyendo de esta manera, la dominancia apical del eje central de la planta.

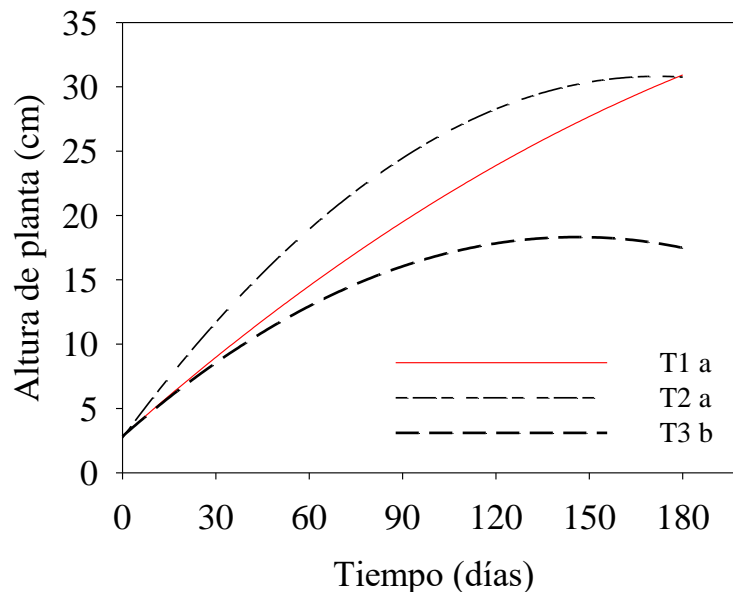


Figura 3. Curvas de crecimiento en altura ajustadas (n=3) de *Atriplex halimus* durante 180 días, en función de los tratamientos. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas.

Índices de fitorremediación

Los índices calculados a los 90 y 180 días de ensayo se muestran a continuación. Según se observa en el Cuadro 17, los valores de Ti (índice de transporte a la hoja) son bajos durante todo el período de ensayo evaluado, experimentando un aumento desde un rango de 0,09 – 0,21 a los 90 días, hasta un rango de 0,14 – 0,28 a los 180 días. Estos rangos de Ti son similares a los indicados por Kachout et al. (2012), quienes observaron un valor Ti promedio de 0,11 para tres especies *Atriplex* evaluadas en un suelo con altas concentraciones de Pb (1334 mg kg⁻¹), indicando que la especie es adecuada para la fitoestabilización de suelos con altas concentraciones de Pb. Clemente et al. (2012) en experimentos de campo indicaron la capacidad fitoestabilizadora de *Atriplex halimus* en suelos contaminados con metales pesados (As, Cd, Cu, Mn, Pb y Zn), al igual que los ensayos de Manousaki y Kalogerakis (2009), quienes observaron que la especie *Atriplex halimus* en todos sus tratamientos acumuló entre un 75-95% del Pb en el tejido radical.

Cuadro 17. Índice de fitorremediación Ti en *Atriplex halimus*. Efecto del factor “Tratamiento” en cada nivel del factor “Tiempo”.

Tratamiento	Tiempo (días)	
	90	180
T1	0,09 ± 0,04 c	0,28 ± 0,04 a
T2	0,21 ± 0,05 ab	0,14 ± 0,05 bc
T3	0,15 ± 0,01 bc	0,15 ± 0,03 bc

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=3). Ti , índice de translocación. Promedios unidos por letras distintas en sentido vertical indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos dentro de cada tiempo (p<0,05, LSD de Fisher).

Cuadro 18. Índice de fitorremediación Ti en *Atriplex halimus*. Efecto del factor “Tiempo” en cada nivel del factor “Tratamiento”.

Tiempo (días)	Tratamiento		
	T1	T2	T3
90	0,09 ± 0,04 c	0,21 ± 0,05 ab	0,15 ± 0,01 bc
180	0,28 ± 0,04 a	0,14 ± 0,05 bc	0,15 ± 0,03 bc

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=3). Ti , índice de translocación. Promedios unidos por letras distintas en sentido vertical indican diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos dentro de cada tratamiento (p<0,05, LSD de Fisher).

Atriplex halimus, en general presentó un bajo índice de translocación a la parte aérea, y en consecuencia una baja eficiencia de fitoextracción de Pb. Esto podría ser explicado por las propias características de la planta, y por la alta biodegradabilidad que presenta el AC (Römkens et al. 2002; Evangelou et al. 2006), sumado a la alta inmovilidad que presenta el Pb en los suelos. Estudios de Waterlot et al. (2013), han propuesto el siguiente orden de

movilidad de algunos metales en los suelos: $Zn \geq Cd \gg Cu \gg Pb$.

Los factores *FBC* (factor de bioconcentración) y *PF* (porcentaje de fitoextracción) han sido publicados por Acuña (2016) recientemente para *Atriplex halimus* en suelos contaminados por Pb, reportando valores bajos para ambos índices, informando para el factor *FBC* y *PF* valores entre 0,0034-0,0123 y 0,0004-0,0032 respectivamente. Para este estudio, los valores observados para ambos índices igualmente son bajos, lo que es explicado por el alto contraste que existe entre las concentraciones de Pb en la parte aérea (cuadros 7 y 8) y las concentraciones de Pb en el suelo en estudio (2.952 mg kg^{-1}).

Con respecto al análisis estadístico en los índices de fitorremediación, se observó interacción entre los factores “Tratamiento” y “Tiempo” para el índice *Ti* (Cuadros 17 y 18). En los tratamientos, para ambos tiempos de evaluación se observaron diferencias estadísticamente significativas. A los 90 días, se observó que el tratamiento T2 presentó el valor más alto para *Ti* y el tratamiento T1 el que presentó el valor más bajo, sin embargo, a los 180 días de ensayo T1 fue el mejor tratamiento, obteniendo el *Ti* más alto. Entre los tratamientos T2 y T3 no se observaron diferencias significativas para la segunda fecha evaluada. Esto coincide con la mayor concentración de Pb encontrado en el tejido de las raíces a los 180 días de ensayo para los tratamientos T2 y T3 (cuadros 9 y 10).

El índice *Ti* presentó variaciones estadísticamente significativas dentro de un mismo tratamiento a través del tiempo (Cuadro 18) en los tratamientos T1 y T2. Para el tratamiento T1 se observa un aumento del índice desde del 90 a 180 días de ensayo. Cabe destacar que, para ambos tratamientos, los índices de *Ti* son bajos.

No se observó interacción entre los factores “Tratamiento” y “Tiempo” en los índices de fitorremediación *FBC* y *PF*, por lo tanto, se procedió a analizar cada factor por separado. El Cuadro 19 indica el efecto del factor “Tratamiento” para *FBC* y *PF*, en donde se observa que los tratamientos presentan un efecto significativo. El *FBC* presentó los mayores niveles para los tratamientos T2 y T3, lo que puede ser asociado al agua de riego con AC. Respecto al *PF*, nuevamente existen diferencias significativas, siendo T2 y T3 los tratamientos con mayores valores obtenidos.

Respecto al factor “Tiempo” sólo *PF* presentó diferencias estadísticamente significativas, manifestando un aumento desde los 90 a los 180 días de tratamiento (Cuadro 20). Esto podría atribuirse al aumento de MS aérea a través del tiempo, sumado a las concentraciones de Pb observadas en hojas (cuadros 7 y 8) favoreciendo un mayor transporte del metal a la parte aérea de la planta. Estos resultados indican que la planta continua su crecimiento y su absorción de Pb a través del tiempo.

Cuadro 19. Índices de fitorremediación en *Atriplex halimus* según tratamiento, independiente del tiempo evaluado.

Tratamiento	<i>FBC</i>		<i>PF</i>	
	—		(%)	
T1	0,004 ± 0,002	b	0,0007 ± 0,0003	b
T2	0,008 ± 0,001	a	0,0011 ± 0,0002	a b
T3	0,010 ± 0,003	a	0,0014 ± 0,0006	a

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n = 6). Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05, LSD de Fisher). *FBC*, Factor de bioconcentración; *PF*, Porcentaje de fitoextracción.

Cuadro 20. Índices de fitorremediación en *Atriplex halimus* según tiempo, independiente del tratamiento aplicado.

Tiempo (días)	<i>FBC</i>		<i>PF</i>	
	—		(%)	
90	0,0069 ± 0,003	a	0,0009 ± 0,0004	b
180	0,0076 ± 0,004	a	0,0013 ± 0,0005	a

Valores corresponden a promedios ± desviación estándar (n = 9). Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05, LSD de Fisher). *FBC*, Factor de bioconcentración; *PF*, Porcentaje de fitoextracción.

Evaluación de propiedades químicas del suelo al final del ensayo

La conductividad eléctrica del suelo al final del ensayo, luego de haber aplicado los tratamientos experimentó un aumento respecto a la CE inicial (4,58 dS m⁻¹), llegando a 12,61 dS m⁻¹ en el tratamiento T5 (Cuadro 21). Esto puede ser explicado principalmente por la capacidad que tiene el AC de disolver parcialmente los carbonatos presentes en el suelo (Ferreira et al., 1998). Además, del riego constante con agua de CE de 1,39 dS m⁻¹ (Cuadro 2). En otros estudios, Ayers y Westcott (1994) constataron que, el riego constante y sin lixiviación con aguas de CE entre 0,7 y 3,0 dS m⁻¹ implican un riesgo de salinización del suelo como lo observado en este estudio.

Respecto a los niveles de salinidad, es importante señalar la capacidad que tienen las plantas halófitas como *Atriplex halimus* para tolerar la salinidad a través de mecanismos (anatómicos, bioquímicos, fisiológicos y morfológicos) que le permiten adaptarse a condiciones ambientales adversas como la salinidad, siendo útiles para la fitorremediación de suelos salinos (Walker et al., 2014; Lokhande y Suprassana, 2012).

Para los tratamientos T1, T2 y T3, también se puede atribuir a la salinización del suelo, la presencia de *Atriplex halimus*, especie capaz de acumular y excretar sales desde las glándulas salinas de la superficie foliar (Simon, 1994).

El tratamiento T2 presentó una menor CE, no obstante, la CE no mostró diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, por lo tanto, este valor podría estar dado por una mayor movilización de cationes como efecto de la adición del AC desde la matriz del suelo. Respecto al pH, si bien el suelo inicialmente presentó un valor de 6,3 (Cuadro 5), se observó un aumento en un rango de 7,2- 7,4. Esto puede ser atribuido al agua de riego (pH 7,5) y queda en evidencia en los tratamientos T4 y T5, los cuales correspondían a suelos regados con las dos dosis de AC respectivamente. A pesar de los bajos valores de pH de las soluciones de riego con AC (Cuadro 4), no se observó una acidificación del suelo en los tratamientos, lo que puede explicarse por la capacidad que tiene el suelo de amortiguar el efecto acidificante del agente quelante, predominando finalmente el valor del agua de riego. El ácido cítrico es un ácido débil (Ferreira et al., 1998) y altamente biodegradable (Gao et al., 2012; Freitas et al., 2014).

La materia orgánica del suelo no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, el tratamiento T1 fue el que presentó un mayor valor al final de la evaluación, lo que puede ser atribuido a la caída de hojas de *Atriplex halimus* en la maceta. Es importante señalar, que la desviación estándar observada (4,25) es elevada en comparación a las demás obtenidas, por lo que este valor estaría indicando la alta variabilidad de los datos obtenidos para el tratamiento T1.

Cuadro 21. Determinación de conductividad eléctrica (dS m⁻¹), materia orgánica (%) y pH en suelos al final del ensayo, según tratamientos de *Atriplex halimus*.

Tratamientos	CE dSm ⁻¹	MO %	pH
T1	11,43 ± 1,03	a 7,78 ± 4,25	a 7,2 ± 0,07 c
T2	8,98 ± 1,13	a 4,81 ± 2,49	a 7,3 ± 0,04 b c
T3	10,38 ± 0,92	a 4,55 ± 1,58	a 7,4 ± 0,07 a b
T4	10,68 ± 3,25	a 3,52 ± 0,38	a 7,4 ± 0,10 a
T5	12,61 ± 1,45	a 4,02 ± 1,57	a 7,4 ± 0,07 a b

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n = 3). CE: conductividad eléctrica del suelo en extracto saturado; MO: materia orgánica del suelo. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (p<0,05, LSD de Fisher).

El Cuadro 22, muestra la extracción secuencial de Pb realizada al final del ensayo, se observó que, en todos los tratamientos, las fracciones II y III mantienen la mayor proporción de Pb, promediando para la fracción FII un 29% y para la fracción FIII un 52%. Es destacable mencionar, que la fracción FI mantuvo el rango inferior a 1% para el testigo (T1) y los tratamientos T2, T3, T4 y T5. Cabe mencionar, que, en todos los tratamientos, se observó una disminución de FII (≈30%), lo que puede estar asociado a la adición del AC, que tiene la capacidad de disolver los carbonatos del suelo, como fue observado por Lesage et al. (2005). En la FIII, el Pb asociado aumentó (≈ 50%), en comparación a los rangos observados al inicio del ensayo (FIII: 40,29%). Es probable, que el cambio percibido en la distribución del Pb en las fracciones del suelo, este asociado al incremento del pH del

suelo, permitiendo la precipitación de los hidróxidos de Fe y Mn, junto con el Pb asociado a la fracción FIII.

En general, la continua aplicación de AC no modificó la distribución de Pb, respecto a la distribución inicial, manteniéndose las fracciones II y III con las mayores proporciones de concentraciones del metal. Esto podría ser atribuido, a la inmovilidad del Pb en el suelo, ligándose fuertemente a sustancias húmicas en suelos orgánicos o a los óxidos de Fe en suelos minerales (Adriano, 2001; Kabata-Pendias, 2011).

Cuadro 22. Extracción secuencial de plomo (mg kg^{-1}) en suelos al final del ensayo en tratamientos de *Atriplex halimus*.

	Unidades	Fracción	Tratamientos				
			T1	T2	T3	T4	T5
Plomo en el suelo	(mg kg^{-1})	FI	$6,84 \pm 3,25$	$4,66 \pm 4,13$	$6,12 \pm 1,51$	$3,62 \pm 2,59$	$3,84 \pm 0,93$
		FII	$521,05 \pm 84,31$	$401,29 \pm 34,15$	$501,87 \pm 166,10$	$529,12 \pm 103,55$	$543,48 \pm 81,44$
		FIII	$863,54 \pm 127,44$	$887,77 \pm 246,60$	$857,35 \pm 69,07$	$946,98 \pm 87,94$	$895,59 \pm 94,78$
		FIV	$240,62 \pm 37,05$	$177,67 \pm 48,05$	$180,29 \pm 21,22$	$193,55 \pm 37,48$	$189,61 \pm 20,05$
		FV	$137,43 \pm 14,52$	$131,67 \pm 29,04$	$126,98 \pm 6,90$	$118,87 \pm 13,48$	$129,75 \pm 7,38$
Suma de Fracciones	(mg kg^{-1})		1769	1603	1672	1792	1762
Digestión ácida	(mg kg^{-1})		1818	1628	1753	1852	1855
Recuperación	(%)		97,30	98,46	95,38	96,76	94,99

Valores corresponden a promedio \pm desviación estándar (n=3).

CONCLUSIONES

El suelo presentó una alta concentración de plomo a nivel de contaminación. Con respecto a su distribución en el suelo, se encontró asociado principalmente a carbonatos y a óxidos de Fe y Mn equivalente a un 82% del total del plomo presente en el suelo. La fracción soluble del suelo fue baja, correspondiendo a un 1,02%.

La adición de ácido cítrico (4 g L^{-1} y 8 g L^{-1}) en el suelo contaminado con plomo aumentó significativamente las concentraciones de plomo en hojas y raíces de *Atriplex halimus* L., obteniéndose las mayores concentraciones con la dosis de 8 g L^{-1} , correspondientes a valores de $28,6 \pm 3,9 \text{ mg kg}^{-1}$ y $200,2 \pm 38,8 \text{ mg kg}^{-1}$ para hojas y raíces respectivamente.

La adición de ácido cítrico en una dosis de 8 g L^{-1} disminuyó ligeramente la producción de materia seca de las raíces, además, se observaron caídas de hojas a los 180 días de ensayo, por lo cual, los niveles de plomo alcanzados por *Atriplex halimus* L. podrían indicar sintomatología de toxicidad.

La especie *Atriplex halimus* L. presentó bajos valores para el índice de transporte a la parte aérea tanto a los 90 como a los 180 días de ensayo. Esto indica la capacidad que tiene *Atriplex halimus* L. para acumular el plomo en las raíces, siendo una especie recomendada para la fitoestabilización de suelos contaminados con plomo.

BIBLIOGRAFÍA

Acevedo, E.; M. Carrasco; O. León; P. Silva; G. Castillo; I. Ahumada et al. 2005. Informe de criterios de calidad de suelo agrícola. Universidad de Chile-Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Santiago, Chile. 205p.

Acuña, E. 2016. Evaluación de *Atriplex halimus* y *Chrysopogon zizanioides* en la fitorremediación inducida de un suelo contaminado con plomo. Tesis Magister Ingeniero Agrónomo, Mención Manejo de Suelos y Aguas. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 97p.

Adriano, D. 2001. Trace elements in terrestrial environments. 2a ed. Springer. 867p.

Aguilar, J.; C. Dorronsoro; E. Galán; J. Gómez Ariza. 1999. Los criterios y estándares para declarar un suelo como contaminado en Andalucía y la metodología y técnica de toma de muestras y análisis para su investigación [en línea] . Recuperado en: <<http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb/menuitem.7e1cf46ddf59bb227a9ebe205510e1ca?vgnextoid=47dbbb45c8bab010VgnVCM1000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=2896a7aaaf4f4310VgnVCM2000000624e50aRCRD>> Consultado el: 1 abril 2017.

Amer, N.; Z. Al Chami; L. Al Bitar; D. Mondelli and S. Dumontet. 2013. Evaluation of *Atriplex halimus*, *Medicago lupulina* and *Portulaca oleracea* for phytoremediation of Ni, Pb and Zn. *International Journal of Phytoremediation*, 15 (5): 498-512.

Ayers, R. and D. Westcot. 1994. Water quality for agriculture. FAO Irrigation and Drainage Paper N°29. 97p.

Baird, C. 2001. Química ambiental. Reverté. Barcelona. 414p.

Becerril, J.; O. Barrutia; J. García; A. Hernández; J. Olano y C. Garbisu. 2007. Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. *Ecosistemas*, 16 (2): 50-55.

Bernier, R. y G. Bortolameo. 2000. Técnicas de diagnóstico de fertilidad del suelo, fertilización de praderas, cultivos y mejoramiento de praderas. Serie Actas INIA N°4. 71p.

Cadahía, C. 2005. Fertirrigación. Cultivos hortícolas, frutales y ornamentales. 3ra ed. Madrid, España: Mundi-Prensa. 681p.

Chaney, R. L.; M. Malik; Y. M. Li; S. Brown; E. Brewer; S. Angle and A. Baker. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 8 (3): 279-284.

Chapman, H. 1965. Methods of soil analysis - chemical and microbiological properties. Committee. Salinity Laboratory Riverside, California, Estados Unidos. 901p.

Clemente, R. and M. Bernal. 2006. Fractionation of heavy metals and distribution of organic carbon in two contaminated soils amended with humic acids. *Chemosphere*, 64 (8): 1264- 1273.

Clemente, R.; D. J. Walker; T. Pardo; D. Martínez-Fernández and M. P. Bernal. 2012. The use of a halophytic plant species and organic amendments for the remediation of a trace elements-contaminated soil under semi-arid conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 223: 63-71.

Deram, A.; F. Denayer; D. Petit and C. Van Haluwyn. 2006. Seasonal variations of cadmium and zinc in *Arrhenatherum elatius*, a perennial grass species from highly contaminated soils. *Environmental Pollution*, 140 (1): 62-70.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Egbuchunam, T.; F. Okieimen and G. Tsetimi. 2010. Comparison of citric acid and EDTA as amendments for enhanced phytoextraction of As, Cr and Cu from CCA contaminated soil. *Chem Class Journal*, 7: 1-10.

Evangelou, M.; M. Ebel and A. Schaeffer. 2006. Evaluation of the effect of small organic acids on phytoextraction of Cu and Pb from soil with tobacco *Nicotiana tabacum*. *Chemosphere*, 66: 996–1004.

Ferreira, R.; J. Peralta; A. Sadzawka; J. Valenzuela y C. Muñoz. 1998. Efecto de la aplicación de ácido sobre algunas características químicas de un suelo calcáreo. *Agricultura Técnica*, 58 (2): 163-170.

Freitas, E.; C. Nascimento and W. Silva. 2014. Citric acid-assisted phytoextraction of lead in the field: The use of soil amendments. *Water, Air, and Soil Pollution*, 225 (1): 1-9.

Gao, Y.; C. Miao; J. Xia; C. Luo; L. Mao; P. Zhou and W. Shi. 2012. Effect of citric acid in phytoextraction and antioxidative defense in *Solanum nigrum* L. as a hyperaccumulator under Cd and Pb combined pollution. *Environmental Earth Sciences*, 65 (7): 1923-1932.

Ghosh, M. and S. Singh. 2005. A comparative study of cadmium phytoextraction by accumulator and weed species. *Environmental Pollution*, 133: 365-371.

Ginocchio, R.; A. Baker and J. Cucuzza. 2004. Mine reclamation– planning and action. *Mining Environmental Management*, 7-10.

Hoagland, D. and D. Arnon. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 347: 1-32.

Instituto Nacional de Normalización, Chile. NCh1333. Of78. Requisitos de calidad del agua para diferentes usos = Water quality requirements for different uses. Santiago, Chile: INN, 1987. III, 9p.

Jarrell, W. M. and R. B. Beverly. 1981. The dilution effect in plant nutrition studies. *Advances in Agronomy*, 34: 197-224.

Jones, J. 2003. Agronomic handbook - management of crops, soils, and their fertility. CRC Press. 441p.

Kabata-Pendias, A. and H. Pendias. 2001. Trace metals in soils and plants. 2a ed. CRC Press. Boca Raton Florida, USA. 365p.

Kabata-Pendias, A. 2011. Trace elements in soil and plants. 4a ed. Nueva York, USA: CRC Press. 520p.

Kachout, S.; A. Mansoura; R. Mechergui; J. Leclerc; M. Rejeb and Z. Ouergui. 2012. Accumulation of Cu, Pb, Ni and Zn in the halophyte plant *Atriplex* grown on polluted soil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92 (2): 336-342.

Kelly Indices. 1980. Guidelines for contaminated soils specifically developed for gasworks sites in London [en línea]. Recuperado en: <<http://www.contaminatedland.co.uk/std-guid/kellyl.htm#KEYWORD-ONE>> Consultado el: 1 julio de 2016.

Kopittke, P. M.; C. J. Asher and N. W. Menzies. 2008. Prediction of Pb speciation in concentrated and dilute nutrient solutions. *Environ Pollut*, 153 (3): 548–554.

Lailhacar-Kind, S. and H.M. Laude. 1975. Improvement of seed germination in *Atriplex repanda* Phil. *Journal of Range Management*, 491-494.

Lesage, E.; E. Meers; P. Vervaeke; S. Lamsal; M. Hopgood; F. Tack and M. Verloo. 2005. Enhanced phytoextraction: II. Effect of EDTA and citric acid on heavy metal uptake by *Helianthus annuus* from a calcareous soil. *International Journal of Phytoremediation*, 7 (2): 143-152.

Lokhande, V., P. Suprasanna, P. 2012. Prospects of halophytes in understanding and managing abiotic stress tolerance. pp: 29-56. En: Sandalio, L., M. Rodríguez-Serrano, D. Gupta, A. Archilla, M. Romero-Puertas, L. Del Río (Eds.) Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change. Springer. 509p.

Lutts, S.; I. Lefére; C. Delpéree; S. Kivits; C. Dechamps; A. Robledo and E. Correal. 2004. Heavy metal accumulation by halophyte species Mediterranean saltbush. *Journal of Environmental Quality*, 33: 1271-1279.

Manousaki, E. and N. Kalogerakis. 2009. Phytoextraction of Pb and Cd by the Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus* L.): metal uptake in relation to salinity. *Environmental Science and Pollution Research*, 16 (7): 844-854.

Miller, G.; G. Begonia; M. Begonia; J. Ntoni and O. Hundley. 2008. Assessment of the efficacy of chelate-assisted phytoextraction of lead by coffeeweed (*Sesbania exaltata* Raf.). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 5 (5): 428-435.

Moreno-Jiménez, E.; R. Manzano; E. Esteban and J. Peñalosa. 2010. The fate of arsenic in soils adjacent to an old mine site (Bustarviejo, Spain): mobility and transfer to native flora. *Journal of Soils and Sediments*, 10 (2): 301-312.

Peralta, M.; L. Muñoz; G. Névarez y M. Ballinas. 2010. Fitorremediación como una alternativa para el tratamiento de suelos contaminados. *Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Biomédica*, 1: 3.

Pérez, J. 2011. Tesis Doctorales: Resumen de la Tesis “Biodisponibilidad de metales pesados en suelos mineros contaminados enmendados con materiales orgánicos”. *Revista 100cias@uned*, 4:31-34.

Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual review of plant biology*, 56: 15-39.

Ponizovsky, A. y E. Mironenko. 2001. Speciation and sorption of lead (II) in soils. pp: 261-279. En: Iskandar, I. and M. Kirkham (Eds.) Trace elements in soil –bioavailability, flux, and transfer. CRC Press. 305p.

Prasad, M. 2008. Trace elements as contaminants and nutrients: consequences in ecosystems and human health. John Wiley and Sons. 790p.

Riquelme, J.; S. Pérez y S. Yoshikawa. 2004. Manejo y prácticas conservacionistas del suelo para un desarrollo sustentable del secano. (Bol. N°124), Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Chillán, Chile: INIA. 200p.

Römken, P.; L. Bouwman; J. Japenga and C. Draaisma. 2002. Potentials and drawbacks of chelate-enhanced phytoremediation of soils. *Environmental Pollution*, 116 (1): 109-121.

Sadzawka, A. 2006. Métodos de análisis de agua para riego. Serie de Actas INIA (Instituto de Investigación Agropecuarias) N°37. Santiago, Chile. 332p.

Sadzawka, A.; A. Carrasco; R. Grez; M. Mora; H. Flores y A. Neaman. 2006. Métodos de análisis recomendados para los suelos de Chile. Serie Actas INIA (Instituto de

Investigaciones Agropecuarias) N°34. 164p.

Sandoval, M.; J. Dörner; O. Seguel; J. Cuevas y D. Rivera. 2012. Métodos de Análisis Físicos de Suelos. Universidad de Concepción. Publicaciones Departamento de Suelos y Recursos Naturales N°5. 80p.

Sayer, J. and M. Gadd. 2001. Binding of cobalt and zinc by organic acids and culture filtrates of *Aspergillus niger* grown in the absence or presence of insoluble cobalt or zinc phosphate. *Revista Iberoamericana de Micología*, 105: 1261-1267.

Shahid, M.; E. Pinelli and C. Dumat. 2012. Review of Pb availability and toxicity to plants in relation with metal speciation; role of synthetic and natural organic ligands. *Journal of Hazardous Materials*, 219: 1-12.

Simon, R. D.; A. Abeliovich and S. Belkin. 1994. A novel terrestrial halophilic environment: the phylloplane of *Atriplex halimus*, a salt-excreting plant. *FEMS Microbiology Ecology*, 14 (2): 99-109.

Tapia, Y. 2007. Movilidad de metales pesados en sustratos de restos de poda y biosólidos. Ensayos de fitoextracción con *Rosmarinus officinalis* y *Atriplex halimus*. Tesis Doctoral. España: Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 189p.

Tapia, Y.; E. Eymar; A. Garate and A. Masaguer. 2013. Effect of citric acid on metals mobility in pruning wastes and biosolids compost and metals uptake in *Atriplex halimus* and *Rosmarinus officinalis*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185: 4221-4229.

Tapia, Y.; V. Cala; E. Eymar; I. Frutos; A. Gárate and A. Masaguer. 2011. Phytoextraction of cadmium by four Mediterranean shrub species. *International Journal of Phytoremediation*, 13 (6): 567-579.

Tessier, A.; P. Campbell and M. Bisson. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate traces metals. *Analytical Chemistry*, 51 (7): 844-851.

Teutsch, N.; Y. Erel; L. Halicz and A. Banin. 2001. Distribution of natural and anthropogenic lead in Mediterranean soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65 (17): 2853-2864.

Trakal, L.; D. Martínez-Fernández; M. Vítková and M. Komárek. 2015. Phytoextraction of metals: modeling root metal uptake and associated processes. pp. 69-83. En: Ansari A., S. Singh, R. Gill, G. Lanza, L. Newman (Eds.) *Phytoremediation – management of environmental contaminants - Volume 1*. Springer International Publishing. 348p.

Walker, D. J.; S. Lutts; M. Sánchez-García and E. Correal. 2014. *Atriplex halimus* L.: its biology and uses. *Journal of Arid Environments*, 100: 111-121.

Waterlot, C.; G. Bidar; A. Pelfrêne; H. Roussel; H. Fourrier and F. Douay. 2013. Contamination, fractionation and availability of metals in urban soils in the vicinity of former lead and zinc smelters, France. *Pedosphere*, 23 (2): 143-159.

Wenzel, W. and M. Dos Santos. 2006. Phytoextraction of metal polluted soils in Latin America. pp. 1-7. In: Environmental applications of poplar and willow working party, Northern Ireland, May. 18-20. 82, A-1190 Vienna.