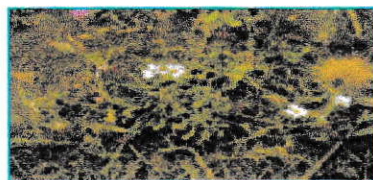


UCH-F
Q AMB.
N238
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA AMBIENTAL

**ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DE COBRE, ADICIONADO AL
ESTADO DE CuSO_4 Y DE CuO , SOBRE *Noticastrum sericeum*
CULTIVADAS EN DOS TIPOS DE SUBSTRATOS**



Seminario de Título entregado a la
Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de

QUIMICO AMBIENTAL

Jéssica Fabiola Narváez Fernández.

Directores Seminario de Título: -Sr. Patricio Rodríguez N.
-Dra. Rosanna Ginocchio C.

Profesor Patrocinante: Prof. María Inés Toral P.

6 AGS 2000



Julio, 2000.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a la Universidad de Chile, por brindarme una gran formación académica y personal, ampliando mis horizontes en todo ámbito.

En especial, agradezco a Rosanna Ginocchio, quién con gran esmero y paciencia, me guió en las distintas fases de este estudio. Además, le doy gracias por su amistad y confianza.

A la profesora María Inés Toral, por su disposición, dedicación y aliento durante todo mi periodo de académico.

A mi familia, por su esfuerzo, ayuda moral y por su cariño.

A Carlos, por su apoyo y comprensión en tantos momentos difíciles.

De igual modo, agradezco a Andreas Birkefeld, por su colaboración, amistad y entrega desinteresada.

Al Centro de Investigación Minera y Metalúrgica (CIMM), en especial, a Patricio Rodríguez, por darme la posibilidad de ampliar mis conocimientos químicos.

Finalmente, quiero agradecer a todas aquellas personas, que de una u otra forma, colaboraron con la realización del presente Seminario de Título: a Paola Cofré y a Sandra Muñoz, por su comprensión y amistad; a todos los funcionarios del CIMM, por hacer más agradable mi trabajo; a todos los funcionarios de la PUC, por su cooperación, y a todos los integrantes del Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por su amistad y tolerancia.





Vuestro amor, me cobijó en los momentos más difíciles.
Y su confianza y aliento, me alumbraron el camino.
Porque estuvieron en cada etapa de mi vida.
Les agradezco infinitamente.

A mi madre y abuela.
Las dos mujeres más importantes en mi vida.



TABLA DE CONTENIDOS

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
TABLA DE CONTENIDOS	iii
LISTA DE TABLAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
GLOSARIO	xvi
RESUMEN	xviii

TEXTO

I.- INTRODUCCION	1
II.- HIPOTESIS	9
III.- FUNDAMENTO TEORICO	10
IV.- ENSAYO DE FITOTOXICIDAD CON COBRE EN <i>Noticastrum sericeum</i>.	
4.1.- <i>Antecedentes generales</i>	22
4.2.- <i>Procedimientos de ensayo</i>	
4.2.1.- Lavado de potes plásticos	31
4.2.2.- Pretratamiento del substrato sólido	31
4.2.3.- Procedimiento de preparación de soluciones-substrato	32
4.2.4.- Metodología aplicada al ensayo de fitotoxicidad	33
4.2.5.- Lavado de muestras vegetales (Metodología EPA)	42
4.2.6.- Metodología de análisis estadístico	42



4.3.- *Presentación y discusión de resultados*

4.3.1.- Observaciones visuales (determinación cualitativa)	43
4.3.1.1.- Efectos visibles en plántulas crecidas en substrato sólido	43
4.3.1.2.- Efectos visibles en plántulas mantenidas en substrato líquido	52
4.3.2.- Sobrevivencia de las plántulas (determinación cuantitativa)	62
4.3.3.- Medición de variables respuesta (determinación cuantitativa)	64
4.3.3.1.- Longitud de raíz (crecimiento raíz principal)	68
4.3.3.2.- Producción de raíces secundarias (número de ramificaciones)	70
4.3.3.3.- Hojas nuevas producidas (Nº de hojas nuevas)	73
4.3.3.4.- Tamaño de cotiledones (longitud)	74
4.3.3.5.- Productividad de la raíz (peso seco raíz)	78
4.3.3.6.- Productividad del vástago (peso seco vástago)	80

V.- ANALISIS FISICOQUIMICO DE MUESTRAS DE SUBSTRATO SOLIDO Y ANALISIS QUIMICO DE *Noticastrum sericeum*.

5.1.- *Análisis fisicoquímico del substrato sólido (tierra de hoja):*

5.1.1.- Preparación de laboratorio de muestras de suelo o equivalente para análisis fisicoquímico	
5.1.1.1.- Antecedentes generales	83
5.1.1.2.- Procedimiento	83



5.1.2.- Determinación de pH del substrato sólido en agua y en solución de cloruro de calcio	
5.1.2.1.- Antecedentes generales	85
5.1.2.2.- Procedimiento	85
5.1.3.- Determinación del contenido de carbono orgánico en el substrato sólido por el método de combustión húmeda de Walkley-Black	
5.1.3.1.- Antecedentes generales	86
5.1.3.2.- Procedimiento	87
5.1.4.- Determinación de la capacidad de intercambio cationico del substrato sólido	
5.1.4.1.- Antecedentes generales	88
5.1.4.2.- Procedimiento	88
5.1.5.- Determinación del contenido de cobre total en muestras de suelo o su equivalente	
5.1.5.1.- Antecedentes generales	89
5.1.5.2.- Procedimiento	90
5.1.6.- Obtención del extracto de saturación	
5.1.6.1.- Antecedentes generales	91
5.1.6.2.- Procedimiento	91
5.1.7.- Propiedades del extracto de saturación. pH, conductividad eléctrica y cobre soluble	
5.1.7.1.- Antecedentes generales	92
5.1.7.2.- Procedimiento	93
5.1.8.- Determinación de cobre iónico mediante electrodo específico de cobre	
5.1.8.1.- Antecedentes generales	94
5.1.8.2.- Procedimiento	94



5.2.- *Análisis de muestras vegetales (raíces y vástagos):*

5.2.1.- Preparación de muestras vegetales	
5.2.1.1.- Antecedentes generales	95
5.2.1.2.- Procedimiento	96
5.2.2.- Determinación de cobre total en muestras vegetales mediante digestión en microondas	
5.2.2.1.- Antecedentes generales	96
5.2.2.2.- Procedimiento	97
□ Observaciones	98

5.3.- *Presentación y discusión de resultados*

5.3.1.- Contenido de humedad de las muestras de tierra de hoja	99
□ Características fisicoquímicas generales del sustrato sólido	101
5.3.2.- Valores de pH del sustrato sólido en agua y en CaCl ₂	101
5.3.3.- Contenido de carbono orgánico del sustrato sólido	103
5.3.4.- Determinación de la capacidad de intercambio catiónico (CIC)	104
□ Análisis estadístico de los parámetros fisicoquímicos	105
5.3.5.- <i>Contenido de cobre total en el sustrato sólido</i>	106
□ Análisis de las muestras de referencia utilizadas	109
5.3.6.- Resultados de los parámetros determinados por la pasta de saturación	110
5.3.6.1.- pH de la pasta de saturación	111
5.3.6.2.- Porcentaje de saturación	111
5.3.7.- Resultados de las propiedades del extracto de saturación	112
5.3.7.1.- pH del extracto de saturación	112

5.3.7.2.- Conductividad eléctrica del extracto de saturación	113
5.3.7.3.- <i>Contenido de cobre soluble de las muestras de substrato sólido</i>	114
5.3.7.4.- <i>Contenido de cobre ionico de las muestras de substrato sólido</i>	114
5.3.8.- Contenido de cobre en raíces y vástagos de las plántulas sometidas a ensayo	117
5.3.8.1.- <i>Contenido de cobre en raíces</i>	119
5.3.8.1.1.- Contenido de cobre en raíces de plántulas cultivadas en substrato líquido	120
5.3.8.1.2.- Contenido de cobre en raíces de plántulas cultivadas en substrato sólido	123
5.3.8.2.- <i>Contenido de cobre en vástagos</i>	126
5.3.8.2.1.- Contenido de cobre en vástagos de plántulas en substrato líquido	127
5.3.8.2.2.- Contenido de cobre en vástagos de plántulas en substrato sólido	129

VI.- RELACION ENTRE LOS CONTENIDOS DE COBRE DETERMINADOS EN SUBSTRATO SOLIDO Y EN TEJIDOS DE *Noticastrum sericeum*.

6.1.- <i>Antecedentes generales</i>	135
6.2.- <i>Análisis estadístico de resultados</i>	
6.2.1.- Relación entre las distintas especies de cobre (especiación) determinadas en el substrato sólido	135
6.2.2.- Relación entre los niveles de Cu total, Cu soluble y Cu iónico (especiación) del substrato sólido y el contenido de cobre total en <i>Noticastrum sericeum</i>	144

VII.- CONCLUSION	156
VIII.- COMENTARIO FINAL	159
IX.- REFERENCIAS	160

APENDICES

• APENDICE 1: Lugar del ensayo de fitotoxicidad con cobre y sus características	I
• APENDICE 2: Instrumentos, materiales y reactivos utilizados en el ensayo de fitotoxicidad con cobre	IV
• APENDICE 3: Lugar de los análisis químico y fisicoquímico realizados a las muestras vegetales y de tierra de hoja y sus características.	VII
• APENDICE 4: Descripción de espectroscopia de absorción atómica-llama (FAAS) y de espectroscopia de absorción atómica-horno de grafito (GFAAS).	IX
• APENDICE 5: Metodologías de análisis químico y fisicoquímico de muestras vegetales y de substrato sólido.	XI
♦ Apéndice 5 a): Protocolo de lavado: material fungible, plásticos y recipientes de teflón.	XII
♦ Apéndice 5 b): Preparación de laboratorio de muestras de suelo o su equivalente para análisis fisicoquímico	XIV
♦ Apéndice 5 c): Determinación de pH de suelos o equivalentes en agua y en solución de CaCl ₂	XVII
♦ Apéndice 5 d): Determinación del contenido de carbono orgánico en suelos o equivalentes mediante el método de combustión húmeda de Walkley-Black	XX
♦ Apéndice 5 e): Determinación de la capacidad de intercambio catiónico del suelo o equivalentes	XXVII
♦ Apéndice 5 f): Determinación del contenido de cobre total en muestras de suelo o su equivalente	XXX

◆ Apéndice 5 g): Obtención del extracto de saturación de suelos o equivalentes	XXXIII
◆ Apéndice 5 h): Propiedades del extracto de saturación. pH, conductividad eléctrica y Cu soluble	XXXVI
◆ Apéndice 5 i): Determinación de cobre iónico del extracto de saturación mediante electrodo específico de cobre	XXXIX
◆ Apéndice 5 j): Preparación de muestras vegetales	XLII
◆ Apéndice 5 k): Determinación de cobre total en muestras vegetales mediante digestión en microondas	XLIII
● APENDICE 6: Tablas de datos de análisis fisicoquímico de muestras de substrato sólido: pH, %CO-%MO, CIC.	XLVI
◆ Apéndice 6 a)	XLVII
◆ Apéndice 6 b)	XLVIII
◆ Apéndice 6 c)	XLIX
● APENDICE 7: Tablas de datos de cobre total, cobre soluble y cobre iónico en substrato sólido	L
◆ Apéndice 7 a)	LI
◆ Apéndice 7 b)	LII
◆ Apéndice 7 c)	LIII

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1: Contenidos naturales de elementos en suelos y en "Planta de referencia". Fuente: Bowen, 1979 y Adriano, 1992.....**Pag.10**
- Tabla 2: Valores de los parámetros fisicoquímicos determinados en el sustrato sólido (tierra de hoja comercial) utilizado en el ensayo, previo a la aplicación de cobre.....**Pag.23**
- Tabla 3: Contenido de metales pesados en el sustrato sólido (tierra de hoja comercial) utilizado en el ensayo, previo a la aplicación de cobre.....**Pag.23**
- Tabla 4: Valores de los parámetros fisicoquímicos del sustrato sólido (tierra de hoja comercial) utilizado en el ensayo, indicados por el productor.....**Pag.24**
- Tabla 5: Valores de algunos parámetros determinados en el agua desionizada utilizada en preparación de soluciones y riego durante el ensayo.....**Pag.25**
- Tabla 6: Valores de límites de detección (L.D) y límites de cuantificación (L.C) para los metales determinados en el agua desionizada utilizada en el ensayo, mediante la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica con HG.....**Pag.25**
- Tabla 7: Comportamiento diario de las plántulas crecidas en sustrato sólido, en función del estado del vástago durante el periodo de ensayo.....**Pag.44**
- Tabla 8: Comportamiento diario de las plántulas mantenidas en sustrato líquido, en función del estado de la raíz y del vástago durante el ensayo.....**Pag.54**
- Tabla 9: Supervivencia (días) de las plántulas de *N. sericeum* tratadas con CuSO_4 y con CuO , utilizando como sustrato de soporte solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L y tierra de hoja comercial.....**Pag.62**
- Tabla 10: Variables respuesta o parámetros cuantitativos determinados en plántulas de *N. sericeum*, según tratamiento aplicado en el ensayo.....**Pag.65**
- Tabla 11: Identificación de las muestras de laboratorio y su correspondiente contenido de humedad expresado en % (relacionado con el peso de la muestra seca al aire) y como factor (relacionado con el peso de la muestra seca a 105°C).....**Pag.99**
- Tabla 12: Características fisicoquímicas generales del sustrato sólido utilizado en los distintos tratamientos.....**Pag.101**

- Tabla 13: Concentración de cobre total en las muestras de sustrato sólido según tratamiento aplicado en el ensayo.....**Pag.106**
- Tabla 14: Concentración de cobre total experimental de cada una de las muestras de sustrato sólido sometidas a tratamientos con cobre y su respectiva corrección por la concentración de cobre total del control.....**Pag.108**
- Tabla 15: Valores de pH y % de saturación del sustrato sólido por pasta saturada.....**Pag.110**
- Tabla 16: Valores de pH y conductividad eléctrica por extracto de saturación.....**Pag.112**
- Tabla 17: Especiación del cobre (Cu total, Cu soluble y Cu iónico) en el sustrato sólido sometido a los distintos tratamientos.....**Pag.116**
- Tabla 18: Contenido de cobre en las raíces y vástagos de plántulas de *N. sericeum* según tratamiento aplicado en el ensayo.....**Pag.118**
- Tabla 19: Correlación de Pearson aplicada a los datos de Cu total, Cu soluble y Cu iónico de las muestras de sustrato sólido sometidas a carga metálica con CuSO_4**Pag.136**
- Tabla 20: Correlación de Pearson aplicada a los datos de Cu total, Cu soluble y Cu iónico de las muestras de sustrato sólido sometidas a carga metálica con CuO**Pag.140**
- Tabla 21: Relación entre el contenido de Cu total, Cu soluble y Cu iónico de las muestras de sustrato sólido sometidas a cargas metálicas con CuSO_4 y los contenidos de Cu total en las plantas, mediante regresión lineal simple.....**Pag.145**
- Tabla 22: Relación entre el contenido de Cu total, Cu soluble y Cu iónico de las muestras de sustrato sólido sometidas a cargas metálicas con CuO y los contenidos de Cu total en las plantas, mediante regresión lineal simple.....**Pag.150**
- Tabla 23: Concentración de Cu total, Cu soluble y Cu iónico del sustrato sólido sometido a los distintos tratamientos y los niveles de cobre encontrados en las raíces y vástagos de las plántulas crecidas en este mismo sustrato.....**Pag.154**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Generación de plántulas de *Noticastrum sericeum* en cámara de crecimiento.....**Pag.34**
- Figura 2: Enriquecimiento del sustrato sólido con CuSO_4 y CuO**Pag.34**
- Figura 3: Montaje del experimento en tierra de hoja comercial y en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L**Pag.37**
- Figura 4: Mantenimiento del ensayo en invernadero bajo condiciones ambientales controladas.....**Pag.39**
- Figura 5: (A) Cosecha de plántulas, (B) lavado, y cuantificación de las variables respuesta (C)**Pag.41**
- Figura 6: Tratamientos en sustrato sólido sometidos a adiciones de 0 mg/kg (A), 10 mg/kg (B) y 100 mg/kg (C) de CuSO_4 al cabo de 1 día de experimentación.....**Pag.47**
- Figura 7: Tratamientos en sustrato sólido sometidos a adiciones de 0 mg/kg (A), 10 mg/kg (B) y 100 mg/kg (C) de CuSO_4 al cabo de 10 días de experimentación.....**Pag.47**
- Figura 8: Tratamientos en sustrato sólido sometidos a adiciones de 0 mg/kg (A), 10 mg/kg (B) y 100 mg/kg (C) de CuSO_4 al cabo de 23 días de experimentación.....**Pag.48**
- Figura 9: Tratamientos en sustrato sólido sometidos a adiciones de 0 mg/kg (A), 10 mg/kg (B) y 100 mg/kg (C) de CuO al cabo de 1 día de experimentación.....**Pag.50**
- Figura 10: Tratamientos en sustrato sólido sometidos a adiciones de 0 mg/kg (A), 10 mg/kg (B) y 100 mg/kg (C) de CuO al cabo de 10 días de experimentación.....**Pag.50**
- Figura 11: Tratamientos en sustrato sólido sometidos a adiciones de 0 mg/kg (A), 10 mg/kg (B) y 100 mg/kg (C) de CuO al cabo de 23 días de experimentación.....**Pag.51**
- Figura 12: Tratamientos en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L sometida a adiciones de 0 mg/L (A), 10 mg/L (B) y 100 mg/L (C) de CuSO_4 al cabo de 1 día de experimentación.....**Pag.57**

- Figura 13: Tratamientos en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L sometida a adiciones de 0 mg/L (A), 10 mg/L (B) y 100 mg/L (C) de CuSO_4 al cabo de 10 días de experimentación.....**Pag.57**
- Figura 14: Tratamientos en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L sometida a adiciones de 0 mg/L (A), 10 mg/L (B) y 100 mg/L (C) de CuSO_4 al cabo de 22 días de experimentación.....**Pag.58**
- Figura 15: Tratamientos en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L sometida a adiciones de 0 mg/L (A), 10 mg/L (B) y 100 mg/L (C) de CuO al cabo de 1 día de experimentación.....**Pag.60**
- Figura 16: Tratamientos en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L sometida a adiciones de 0 mg/L (A), 10 mg/L (B) y 100 mg/L (C) de CuO al cabo de 10 días de experimentación.....**Pag.60**
- Figura 17: Tratamientos en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L sometida a adiciones de 0 mg/L (A), 10 mg/L (B) y 100 mg/L (C) de CuO al cabo de 22 días de experimentación.....**Pag.61**
- Figura 18: Variación en la longitud de la raíz principal de las plántulas sometidas a ensayo en función del tratamiento aplicado. Determinación realizada mediante un HSD de Tukey..... **Pag.72**
- Figura 19: Variación en la producción de raíces secundarias de las plántulas sometidas a ensayo en función del tratamiento aplicado. Determinación realizada mediante HSD de Tukey.....**Pag.72**
- Figura 20: Variación en la producción de hojas nuevas de las plántulas sometidas a ensayo en función del tratamiento aplicado. Determinación realizada mediante HSD de Tukey.....**Pag.77**
- Figura 21: Variación en el tamaño de los cotiledones de las plántulas sometidas a ensayo en función del tratamiento aplicado. Determinación realizada mediante HSD de Tukey.....**Pag.77**
- Figura 22: Variación en la productividad de raíz de las plántulas sometidas a ensayo en función del tratamiento aplicado. Determinación realizada mediante HSD de Tukey.....**Pag.82**
- Figura 23: Variación en la productividad del vástago de las plántulas sometidas a ensayo en función del tratamiento aplicado. Determinación realizada mediante HSD de Tukey.....**Pag.82**

- Figura 24: Relaciones entre la concentración de cobre en las raíces de las plántulas cultivadas en soluciones enriquecidas con cobre y la concentración de cobre en las raíces de las plántulas mantenidas en control-líquido.....**Pag.122**
- Figura 25: Relaciones entre la concentración de cobre en las raíces de las plántulas cultivadas en sustrato sólido enriquecido con cobre y la concentración de cobre en las raíces de las plántulas mantenidas en control-sólido.....**Pag.125**
- Figura 26: Relaciones entre la concentración de cobre en los vástagos de las plántulas cultivadas en soluciones enriquecidas con cobre y la concentración de cobre en los vástagos de las plántulas mantenidas en control-líquido.....**Pag.128**
- Figura 27: Relaciones entre la concentración de cobre en los vástagos de las plántulas cultivadas en sustrato sólido enriquecido con cobre y la concentración de cobre en los vástagos de las plántulas mantenidas en control-sólido.....**Pag.130**
- Figura 28: Relaciones entre la concentración de cobre en las raíces y la concentración de cobre en los vástagos de las plántulas cultivadas en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L sometidas a distintos tratamientos de ensayo.....**Pag.132**
- Figura 29: Relaciones entre la concentración de cobre en las raíces y la concentración de cobre en los vástagos de las plántulas cultivadas en sustrato sólido sometido a los distintos tratamientos de ensayo.....**Pag.133**
- Figura 30: Relación entre el contenido de Cu Total y el contenido de Cu soluble del grupo de muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuSO_4 . Determinación realizada mediante correlación de Pearson.....**Pag.138**
- Figura 31: Relación entre el contenido de Cu Total y el contenido de Cu iónico del grupo de muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuSO_4 . Determinación realizada mediante correlación de Pearson.....**Pag.138**
- Figura 32: Relación entre el contenido de Cu soluble y el contenido de Cu iónico del grupo de muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuSO_4 . Determinación realizada mediante correlación de Pearson.....**Pag.139**
- Figura 33: Relación entre el contenido de Cu total y el contenido de Cu soluble del grupo de muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuO . Determinación realizada mediante correlación de Pearson.....**Pag.142**
- Figura 34: Relación entre el contenido de Cu total y el contenido de Cu iónico del grupo de muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuO . Determinación realizada mediante correlación de Pearson.....**Pag.142**

- Figura 35: Relación entre el contenido de Cu soluble y el contenido de Cu iónico del grupo de muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuO. Determinación realizada mediante correlación de Pearson.....**Pag.143**
- Figura 36: Relación entre el contenido de Cu total en el sustrato sólido sometido a adiciones de CuSO₄ y el contenido de cobre total en plantas. Determinación realizada mediante regresión lineal simple.....**Pag.148**
- Figura 37: Relación entre el contenido de Cu soluble del sustrato sólido sometido a adiciones de CuSO₄ y el contenido de Cu total en plantas. Determinación realizada mediante regresión lineal simple.....**Pag.148**
- Figura 38: Relación entre el contenido de Cu iónico del sustrato sólido sometido a adiciones de CuSO₄ y el contenido de Cu total en plantas. Determinación realizada mediante regresión lineal simple.....**Pag.149**
- Figura 39: Relación entre el contenido de Cu total del sustrato sólido sometido a adiciones de CuO y el contenido de Cu total en plantas. Determinación realizada mediante regresión lineal simple.....**Pag.152**
- Figura 40: Relación entre el contenido de Cu soluble del sustrato sólido sometido a adiciones de CuO y el contenido de cobre total en plantas. Determinación realizada mediante regresión lineal simple.....**Pag.152**
- Figura 41: Relación entre el contenido de Cu iónico del sustrato sólido sometido a adiciones de CuO y el contenido de cobre total en plantas. Determinación realizada mediante regresión lineal simple.....**Pag.153**

GLOSARIO

- 1. Antagonismo:** Término utilizado para definir la toxicidad de una mezcla de sustancias cuando es menor a la esperada, de acuerdo con el conocimiento de las toxicidades individuales de cada sustancia.
- 2. Bioacumulación:** Acumulación de una sustancia en un organismo vivo. En ecotoxicología suele utilizarse para referirse a las posibilidades de acumulación de una sustancia en los diferentes niveles de la cadena trófica.
- 3. Biodisponibilidad:** Es la capacidad de una sustancia para alcanzar un organismo vivo o cadena trófica. La fracción biodisponible para la absorción por las raíces de las plantas, es la parte de un compuesto o elemento químico que es capaz de ser absorbida por los seres vivos, y, por lo tanto, la que es capaz de producir efectos tóxicos. La fracción disponible es prácticamente insignificante ante el contenido total del un elemento.
- 4. Bioensayos:** Los bioensayos se tratan de un conjunto de pruebas experimentales, que pueden ser aplicados bajo condiciones controladas de laboratorio y no controladas de campo. Se puede definir también como la utilización de material vivo para medir la concentración de una sustancia, determinando su capacidad para producir un efecto específico.
- 5. Clorosis:** Coloración amarilla homogénea en la lámina foliar, producida por una pérdida de la pigmentación.
- 6. Cotiledón:** Son las primeras hojas formadas en una semilla; las monocotiledonias tienen un cotiledón y las dicotiledonias tienen dos cotiledones.
- 7. Edáfico:** Propiedades del suelo, tales como textura, estructura, capacidad de aireación, capacidad de retención de agua, etc.
- 8. Endpoints:** Efectos morfofisiológicos o variables respuesta medidas de las plantas frente a un estrés metálico, tales como longitud de raíz, peso seco de vástago, número de ramificaciones, número de hojas nuevas, etc.
- 9. Especiación:** Son las especies químicas o formas que determinan la movilidad y biodisponibilidad de los metales en el suelo o en otros compartimentos ambientales (tales como agua, plantas y biota) cuando las condiciones fisicoquímicas son favorables. Para un elemento dado, el término especiación se refiere a la distribución entre sus formas químicas o especies.

10. **Estrés metálico:** Carga o concentración metálica a la que se ve expuesto un organismo, produciendo efectos morfológicos, fisiológicos y fisicoquímicos.
11. **Ligando:** Es un átomo, grupo funcional, o molécula que es atacada en el átomo central de un compuesto de coordinación.
12. **Límite de detección:** Es un valor estadísticamente calculable precisamente para una sustancia en particular.
13. **Necrosis:** Muerte del tejido orgánico. Referido en este caso a la muerte del tejido vegetal.
14. ***Noticastrum sericeum*:** Especie de planta herbácea perenne, nativa de la zona central de Chile, especialmente de la costa chilena. Perteneció a la familia de las compuestas y se caracteriza por ser rastrera; sus hojas son de color verde grisáceo, sus flores son blancas y su fruto se asemeja a un pompón de algodón.
15. **Plántula:** Primeras etapas del ciclo de vida de una planta. También puede definirse como aquella planta juvenil generada por la germinación de una semilla y que aún conserva sus cotiledones.
16. **Relaves:** Masa de sedimentos líticos, remanente a los procesos de extracción de metales.
17. **Rizósfera:** Es el cilindro del suelo que rodea las raíces de las plantas a una distancia de 2-5 mm. Este es un ambiente local donde las plantas captan sus nutrientes, excretan especies orgánicas e inorgánicas y donde se descompone parte de la superficie de las raíces.
18. **Sinergismo:** Cualquier acción conjunta de varios tóxicos. No obstante, se utiliza frecuentemente para referirse a mezclas cuyos efectos son mayores que los esperados, de acuerdo con el conocimiento de las toxicidades individuales de cada sustancia.
19. **Toxicología:** Estudio del efecto de contaminantes en la estructura y funcionamiento de seres vivos o sistemas ecológicos.
20. **Vástago:** Parte aérea de una planta, incluyendo tallos y hojas.

RESUMEN

La realización de estudios que permitan determinar los efectos fitotóxicos producidos por el cobre son de gran relevancia hoy en día, debido a que el aumento de elementos químicos tóxicos en los suelos de los ambientes terrestres producto de las actividades humanas, está produciendo grandes trastornos en los ecosistemas mundiales. Particularmente, se debe considerar que en Chile, la industria minera del cobre ha liberado al ambiente grandes volúmenes de desechos sólidos y líquidos ricos en metales pesados, principalmente entre las regiones III y VII, generando problemas muy importantes de contaminación del suelo, los cuales podrían ser altamente desfavorables para la vida vegetal.

Para obtener información sobre el grado de toxicidad producido por los metales pesados sobre los vegetales, se pueden realizar bioensayos, los que tienen por objeto, evaluar el efecto de un elemento químico adicionado al sustrato de crecimiento sobre diversos endpoints o respuestas morfofisiológicas de las plantas. Adicionalmente, se pueden realizar análisis químicos y/o fisicoquímicos posteriores a estos ensayos, los que permiten determinar la concentración existente de estos metales, tanto en el suelo como en vegetales.

De acuerdo a lo anterior, el presente estudio fue orientado a determinar tanto cualitativa como cuantitativamente, los efectos tóxicos producidos por dos formas químicas de cobre (CuSO_4 y CuO), adicionadas en concentraciones de 0, 10 y 100 mg/kg o mg/L, sobre plántulas de *Noticastrum sericeum* (planta herbácea perenne, nativa de la zona central de Chile), las cuales fueron cultivadas en dos tipos de sustratos de crecimiento: tierra de hoja comercial y solución acuosa de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L.

La observación del estado de cada una de las plántulas sometidas a ensayo, indicó que aquellas plántulas cultivadas en soluciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L enriquecidas con cobre, fueron mayormente afectadas por las adiciones de ambas formas de cobre que aquellas plántulas crecidas en sustrato sólido enriquecido con las mismas formas químicas de este metal. Este efecto fue claramente evidenciado

en aquellas plántulas mantenidas en soluciones enriquecidas con 10 y 100 mg/L de CuSO_4 , donde la totalidad de las plántulas mostró necrosidad total, tanto en raíces como en vástagos, a partir de los primeros días de iniciado el ensayo.

Los efectos tóxicos evidenciados en las plántulas sometidas a ensayo, fueron congruentes con los análisis fisicoquímicos realizados a las muestras de tierra de hoja, la cual presentó en promedio un 54,5% de materia orgánica, un pH de 7,2 en CaCl_2 y de 7,8 en agua y una CIC de 53,0 meq/100g.

La determinación de los contenidos de cobre total de cada una de las muestras de substrato sólido sometidas a ensayo, indicó que las concentraciones de cobre total experimental, las cuales variaron entre los 37,25 y 139,8 mg/kg, estuvieron muy cerca de las concentraciones teóricamente adicionadas, y fueron muy superiores a las concentraciones de cobre soluble (cuyo rango de variación fue de 0,013-0,194 mg/kg) y de cobre iónico (las cuales fluctuaron en un rango de $7,93 \times 10^{-11}$ a $2,06 \times 10^{-8}$ mg/kg). Tales resultados se atribuyen a la posible complejación del cobre con la materia orgánica del substrato sólido.

Por su parte, los niveles de cobre presentes en los vegetales sometidos a ensayo, concordaron con las respuestas morfofisiológicas evidenciadas por las plántulas, ya que se observó que aquellas plántulas mantenidas en soluciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L enriquecidas con cobre, presentaron concentraciones de cobre muy superiores a las plántulas crecidas en substrato sólido enriquecido con este mismo metal, tanto en raíces como en vástagos. Las concentraciones de cobre en las raíces de las plántulas cultivadas en solución variaron entre los 3,8 y 8.110 mg/kg, y en el caso de las raíces de las plántulas mantenidas en substrato sólido, las concentraciones de cobre variaron entre los 20,4 y 130,4 mg/kg, considerando que estas concentraciones corresponden al conjunto de las 10 réplicas de cada tratamiento. Estos resultados se debieron principalmente a que los niveles de cobre biodisponibles para las plántulas mantenidas en substrato líquido fueron bastante superiores a los niveles fitodisponibles en substrato sólido.

Por último, la realización de análisis estadísticos permitió establecer la existencia de alguna relación entre los contenidos metálicos de las muestras de sustrato sólido y de tejidos vegetales.

Por lo tanto, mediante la realización del presente estudio se logró demostrar la gran importancia que presenta el tipo de sustrato de crecimiento y la forma química de cobre adicionada a estos sustratos, en relación a los efectos tóxicos evidenciados en las plántulas sometidas a ensayo.

I.- INTRODUCCION

El suelo es una delgada capa ubicada en la superficie terrestre (interfase entre la Litosfera y la Atmósfera) y es uno de los componentes básicos de los ecosistemas, responsable de la existencia de la vida en el planeta y de la nutrición humana (Allen et al., 1995).

El suelo es un efectivo integrador y disipador de los flujos de masa y de energía, y es un sistema de varias fases, compuesto por residuos de erosión de rocas y de descomposición animal y vegetal (Lindsay, 1979). Además de ser estructuralmente complejo, el suelo es un sistema dinámico. Sus propiedades fisicoquímicas varían en escala temporal y espacial, a una tasa que depende de muchos factores abióticos (ambiente físico) y bióticos (seres vivos) (Daubenmire, 1974).

Los principales roles naturales del suelo son proveer soporte físico, agua, nutrientes esenciales y oxígeno para el crecimiento de las plantas y para la actividad biológica, regular el flujo de agua y su acumulación en el ambiente, cerrar el ciclo de los nutrientes descomponiendo los restos orgánicos y detoxificando ciertos compuestos peligrosos, y servir como un sistema tampón en la absorción, complejación y destrucción de compuestos ambientalmente peligrosos. Por lo tanto, uno de los conflictos medioambientales más importantes se genera en torno al recurso suelo, por presentar la dicotomía de constituir uno de los pilares básicos en que se sustenta el equilibrio biótico natural y ser, al mismo tiempo, uno de los factores de producción más importantes de las actividades humanas, los cuales poseen un alto potencial modificador de los recursos y sistemas ambientales (González, 1994b).

El suelo es un compartimento específico de la biosfera, debido a que no solo es un sumidero geoquímico de contaminantes, sino también actúa como un amortiguador natural, controlando el transporte de elementos químicos y sustancias a la atmósfera, hidrosfera y biota (Baker, 1987). Desafortunadamente, el hombre ha transformado al suelo en un depósito de desechos sólidos y líquidos, trayendo como consecuencia que la contaminación por metales pesados sea uno de los problemas más trascendentales a nivel mundial.

La presencia de metales pesados en el suelo ha afectado el ecosistema ampliamente, debido a que la persistencia de los metales en el sistema suelo es mucho mayor que en otros compartimentos de la biosfera (Kabata-Pendias, 1995). Los metales pesados son aquellos elementos de la tabla periódica que presentan un número atómico mayor a 20 y que presentan una densidad mayor a 6000 g/L; entre estos se encuentran el Co, Zn, Cu, Fe, Mo, Pb, Cd, y Hg. La mayor parte de los metales pesados esenciales para las plantas son requeridos en cantidades traza (Marschner, 1986; Taiz & Zeiger, 1991).

Los paradigmas científicos actuales, establecen que el riesgo de los metales pesados en los distintos compartimentos ambientales (incluyendo en ellos a los vegetales) debe ser evaluado tomando en cuenta, entre otros factores, la movilidad de estos metales dentro de esos compartimentos, ya que las consecuencias ecológicas de la contaminación por metales pesados están relacionadas ampliamente con la movilidad y solubilidad de estos metales (Antonovics et al., 1971).

Además, los metales pesados raramente se presentan solos. La asociación de estos elementos, frecuentemente con otros metales pesados, y posiblemente también con nutrientes mayores, puede afectar la efectividad biológica de los metales en cuestión, por efectos aditivos, sinérgicos y antagónicos (González, 1994a).

Los altos niveles de los metales pesados en el suelo se originan por procesos geológicos y como resultado de la actividad humana industrial y agrícola. Los yacimientos metalíferos, fundiciones y otras emisiones industriales, la deposición de desechos, las emisiones vehiculares, los lodos industriales y domiciliarios, los líquidos percolados, etc., son importantes fuentes de dispersión de metales y de enriquecimiento del ambiente. Por lo tanto, la contaminación ambiental por metales pesados no es un fenómeno reciente, aún cuando su intensidad y frecuencia han aumentado en las últimas décadas (González, 1994a).

A concentraciones moderadas de metales pesados sobre el rango de deficiencia, la mayoría de los suelos naturales actúan como un sumidero de estos metales, con los consecuentes efectos sobre el funcionamiento biológico. Sin

embargo, lo importante es la respuesta fisiológica de las plantas a las toxinas involucradas (Jenssen & Salisbury, 1988).

Todas las plantas responden a incrementos en la concentración de metales pesados en su medio ambiente inmediato. La naturaleza, dirección y magnitud de estas respuestas dependerán de la sensibilidad del individuo, de la intensidad (concentración y duración) de la exposición, del metal involucrado, de la forma química en la cual está presente y del ambiente químico del suelo (Baker & Walker, 1989).

La captación de metales por las plantas refleja los incrementos en los niveles de metales pesados en el suelo, especialmente de aquellos metales que son más móviles. Sin embargo, concentraciones excesivas de algunos metales en el suelo pueden producir efectos tóxicos en las plantas, como reacciones fisiológicas o bien, pueden producir la inhibición del desarrollo o muerte de la planta (Bonner & Galston, 1967). Se debe considerar que un elemento es catalogado como tóxico, cuando su suministro excesivo inhibe el crecimiento general del vegetal y en particular el crecimiento radical (Ernst et al., 1992).

Las diferentes clases y tipos de suelo, las especies de plantas y las condiciones de crecimiento, contribuyen a la divergente influencia de la contaminación del suelo sobre las plantas, así como sobre las variables ecológicas (Kabata-Pendias, 1995). El impacto de la contaminación por metales pesados sobre las plantas, también depende de la naturaleza de la asociación de los metales pesados con estas últimas, ya que estos metales no son necesariamente absorbidos por el sistema radical y traslocados dentro de la planta (Kabata-Pendias, 1995).

Por otra parte, el conocimiento de la concentración de los metales pesados, tanto en el suelo como en vegetales, puede constituir un importante camino para la detección de fuentes contaminantes, del grado de contaminación, y de los mecanismos de distribución de estos metales.

En este ámbito, una de las actividades con mayor riesgo ambiental es la minería, representada en Chile por el cobre, debido a su poder modificador del paisaje y a sus descargas de residuos tóxicos. Tomando en consideración que el

cobre está catalogado de acuerdo a su abundancia como el elemento número 28 en la corteza terrestre, con una concentración promedio de 50-70 mg/kg, y que nuestro país cuenta con las mayores reservas a nivel mundial; es necesario fijar la atención en éste metal, debido a que su extracción y procesamiento conforman actualmente uno de los mayores focos de contaminación.

El cobre en su forma pura es un metal café-rojizo, el cual es relativamente blando, presenta alta ductilidad y maleabilidad, y es muy resistente. Este metal presenta un número atómico de 29 y un peso atómico de 63,54 g/mol y se encuentra en el sistema periódico en el grupo (1B) (Lander & Linderström, 1999). Los números de oxidación del cobre encontrados en la naturaleza son de 0, +1,+2 y +3. El Cu(0) es muy estable, pudiendo ser sometido a un ataque ácido en presencia de un agente oxidante, como ácido nítrico o ácido sulfúrico caliente. El ion cuproso (Cu^{+1}) es inestable en ambientes oxidantes, y en ambiente acuoso es rápidamente transformado a ion cúprico (Cu^{+2}) y a ion elemental Cu (0). El ion Cu(II) es muy estable y tiene una fuerte tendencia a formar complejos relativamente estables en agua y en suelos con varios ligandos (Berqvist & Sundbom, 1980). En ambientes acuosos la concentración de iones cúpricos libres (Cu^{+2}) es controlada principalmente por 3 procesos, que condicionan la movilidad y biodisponibilidad del cobre: formación de complejos inorgánicos y orgánicos; precipitación y sorción (Belsberg et al., 1981).

El cobre en el suelo se encuentra de muchas formas diferentes, como por ejemplo, en la solución del suelo (como ion y complejos); sobre los sitios de intercambio normales; sobre los sitios de sorción específicos; ocluido en los materiales oxidados del suelo; en los residuos biológicos y organismos vivos y, en las estructuras laminares de los minerales primarios y secundarios (Shorrocks & Alloway, 1985).

El contenido de cobre en el suelo presenta esencialmente dos orígenes:

1. Un origen natural, encontrándose altos niveles de cobre en suelos metalíferos cuyo contenido de cobre es superior o levemente superior al nivel basal, y

2. Un origen antrópico, el cual se percibe principalmente en aquellas áreas de extracción de minerales y/o fundiciones o en áreas agrícolas en donde se utilizan pesticidas cúpricos o sustancias químicas que contienen cobre.

La movilidad de los metales pesados en el suelo, entre ellos el cobre, depende, en mayor o menor proporción, de la complejidad de las interacciones entre los componentes del suelo. Se ha estimado que el cobre es un elemento de escasa movilidad en el suelo; por lo tanto, tiende a acumularse en forma generalmente irreversible (Flemming & Trevors, 1989). El cobre puede fijarse a los coloides del suelo de forma no intercambiable, por medio de enlaces covalentes de alta energía y por formación de complejos (Leeper, 1952).

Así, una consideración necesaria en los procesos de contaminación por metales pesados que afectan al suelo es que habitualmente la fracción disuelta de los contaminantes es la que se considera más biodisponible, siendo, por tanto, la más dañina para la biota, por su factibilidad de transportarse a través de los compartimentos y seres vivos (Bourg, 1995). No obstante, por lo general, la concentración de cobre biodisponible en la solución suelo es tan solo de 0,01 mg/kg de suelo aproximadamente, estimándose que el cobre soluble no llega a 1 mg/kg, lo que representa aproximadamente el 1% del cobre total (Larcher, 1980), por lo tanto, la fracción de cobre fitodisponible es generalmente baja.

Todas las plantas vasculares extraen cobre en grados variables desde el suelo. Dependiendo de la especie de planta, la acumulación de cobre puede fluctuar desde concentraciones normales, a un grado donde el metal acumulado constituye un porcentaje significativo de la planta (Graham, 1979). Sin embargo, estas aproximaciones no consideran las interacciones entre los metales y el suelo.

Una serie de antecedentes experimentales sobre fitotoxicidad de cobre generados en los últimos 10 años en el país, reafirman la variación que sufre el nivel crítico de cobre para una misma especie vegetal en función del tipo de suelo. Los estudios apuntan a definir el pH del suelo, el contenido de materia orgánica, la condición redox, la capacidad de intercambio catiónico y la composición de la fracción

arcilla, como las variables que más condicionan la disponibilidad de este metal en el suelo (González, 1991).

Debido a los problemas de contaminación por metales pesados del sistema suelo, cada vez es más importante realizar estudios que conduzcan a determinar los niveles de estos metales en los componentes vegetales sometidos a una situación de estrés por exceso. La magnitud del estrés por exceso de metales pesados depende de la capacidad genética de los vegetales para tolerar altos niveles de sustancias en el ambiente y/o, además, de la presencia de ciertas características morfofisiológicas que les permiten evitar los efectos producidos por el estrés metálico (Fernández & Henríquez, 1991).

De este modo, para evaluar el riesgo ambiental que involucra la presencia de metales pesados en el suelo y debido a la necesidad de determinar los niveles tóxicos de los metales involucrados en los episodios de fitotoxicidad, se hace necesario recurrir a estudios de toxicidad. Los estudios experimentales para determinar la estabilidad, sobrevivencia y reproducción de las plantas sometidas a cargas metálicas excesivas, acarrear generalmente ensayos a largo plazo. En este contexto, una medida más fácil y rápida es la realización de bioensayos, con los cuales se obtienen resultados en el corto plazo. Tomando en cuenta que un amplio rango de respuestas de las plantas puede ser utilizado para este propósito.

Los estudios de toxicidad por cobre permiten determinar, tanto cualitativa como cuantitativamente, el grado de toxicidad que produce el cobre en los vegetales y potencialmente en los animales y en el ser humano. Considerando que el grado de toxicidad depende de la especie de vegetal y de las características fisicoquímicas del suelo (Baker, 1981).

Existe una gran gama de estudios sobre los efectos que provoca el cobre en la vegetación, sin embargo, muy pocos han demostrado con ensayos sencillos, los efectos substanciales que produce este metal sobre plantaciones hidropónicas, comparado con los cultivos o plantaciones en suelos o substratos orgánicos, en los cuales los efectos tóxicos se ven disminuidos debido a gran capacidad amortiguadora del suelo. El presente estudio está inserto dentro de este contexto, con el fin de

aportar mayor información sobre esta temática, que es de real interés en el ámbito de la contaminación.

El estudio realizado utilizó bioensayos para determinar los efectos fitotóxicos producidos por el cobre. Para tal efecto, se seleccionó como sistema bioindicador de la toxicidad del cobre a un tipo de planta herbácea nativa de la zona central de Chile, como es *Noticastrum sericeum*. La utilización de *N. sericeum* en el presente estudio, se debió esencialmente a que estas semillas presentan una alta probabilidad de germinación y en un corto periodo de tiempo (alrededor de 1 día).

Estas plantas fueron cultivadas en dos tipos de sustratos de crecimiento: tierra de hoja comercial y solución acuosa de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L. Se utilizó solución de nitrato de calcio 0,5 g/L como sustrato líquido de crecimiento, con el fin de simular la composición química más básica posible de la solución suelo, teniendo en cuenta que la solución del suelo presenta niveles apreciables de calcio (Baker & Walker, 1989). Además, se procuró contar con una matriz que permitiera la clara observación de los efectos fitotóxicos producidos por el cobre, evitando una competencia entre los iones pertenecientes a la solución y los iones cobre adicionados en el ensayo.

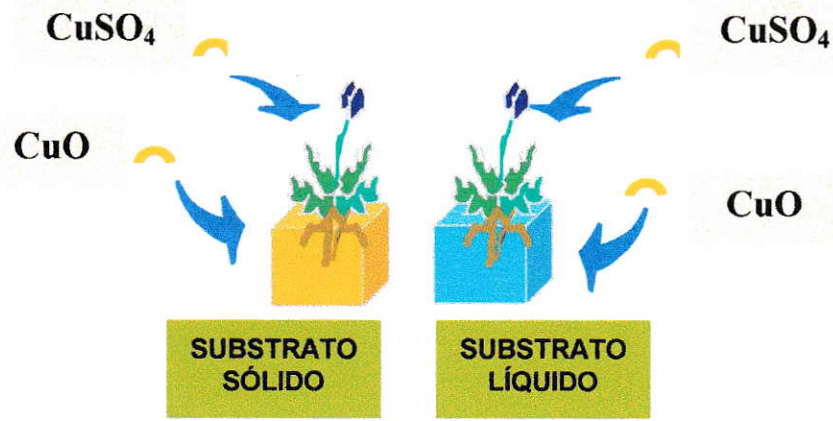
Los objetivos generales de este estudio fueron los siguientes:

- * Determinar cualitativa y cuantitativamente el efecto fitotóxico del cobre en plántulas de *Noticastrum sericeum* crecidas en soluciones líquidas de nitrato de calcio 0,5g/L y en tierra de hoja comercial, enriquecidas con concentraciones crecientes de cobre.
- * Determinar ciertas características fisicoquímicas generales de las muestras de sustrato sólido sometidas a distintos tratamientos de ensayo, incluyendo, su contenido de cobre total, cobre soluble y cobre iónico.
- * Determinar la concentración y la acumulación de cobre en las distintas estructuras morfológicas de las plantas mantenidas en dos tipos de sustratos, con distintas concentraciones de cobre y en condiciones controladas de invernadero.

Los objetivos específicos que abordó este estudio fueron:

- * Evaluar los efectos de toxicidad producidos por el cobre sobre los vegetales de estudio, a través de la adición de concentraciones crecientes de CuSO_4 y CuO a la solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L.
- * Evaluar los efectos de toxicidad producidos por el cobre sobre los vegetales de estudio, a través de la adición de concentraciones crecientes de CuSO_4 y CuO a la tierra de hoja comercial.
- * Establecer una relación entre la cantidad de cobre adicionada al sustrato y los efectos tóxicos producidos en las plantas.

II.- HIPOTESIS



En el presente estudio plantean las siguientes hipótesis:

1. El cobre adicionado en distintas formas químicas y en diferentes concentraciones, puede producir efectos fitotóxicos en las plántulas cultivadas en diversos sustratos.
2. La adición de CuSO_4 y de CuO a la solución acuosa de nitrato de calcio 0,5 g/L puede producir mayores efectos fitotóxicos, que la adición de estos mismos compuesto de cobre al sustrato sólido, debido a la mayor capacidad amortiguadora de la carga metálica que posee la tierra de hoja.
3. El CuSO_4 puede producir mayor fitotoxicidad en ambos sustratos que el CuO , ya que el sulfato de cobre posee una solubilidad en agua muy superior a la presentada por el CuO , por lo tanto, podría existir una mayor cantidad de cobre fitodisponible en el medio.

III.- FUNDAMENTO TEORICO

La contaminación suele definirse como la introducción de sustancias y energía en el medio ambiente, la cual puede ser estimada mediante análisis fisicoquímico de muestras ambientales, permitiendo determinar la concentración de las sustancias introducidas por el hombre y en forma natural (González, 1994a). El diagnóstico de contaminación del suelo basado exclusivamente en análisis fisicoquímico, supone conocidos de antemano los potenciales contaminantes que se van a considerar a lo largo de una investigación, por lo tanto, es necesario definir el sistema de estudio y sus características.

El contenido de elementos contaminantes en el suelo y la disponibilidad de estos para las plantas (tabla 1), está influenciado por ciertos parámetros del suelo, como son: 1) el contenido de partículas inorgánicas, 2) el contenido de materia orgánica, 3) el contenido de carbono orgánico-carbono inorgánico, 4) la capacidad de intercambio catiónico y 5) el pH (Ernst, 1972).

Tabla 1: Contenidos naturales de elementos en suelos y en "Planta de referencia".
Fuente: Bowen, 1979 y Adriano, 1992.

Elemento	Rango en suelos (mg/kg)	Contenido del elemento en "Planta de referencia" (mg/kg o %)*
Carbono	$7 \cdot 10^3 - 5 \cdot 10^5$	44,5%
Hidrógeno		6,5%
Nitrógeno	$200 - 5 \cdot 10^3$	2,5%
Oxígeno	$4,9 \cdot 10^5$	42,5%
Fósforo	35-5300	0,2%
Azufre	30-1600	0,3%
Sodio	$150 - 2,5 \cdot 10^4$	150
Potasio	$80 - 3,7 \cdot 10^4$	1,9%
Calcio	$700 - 5 \cdot 10^5$	1%

Magnesio	400-9000	0,2%
Cadmio	0,01-2	0,05
Zinc	1-900	50
Cobre	2,0-250	10
Flúor	20-700	2
Fierro	$2 \cdot 10^3 - 6 \cdot 10^5$	150
Mercurio	<0,01-0,5	0,1
Manganeso	20-10000	200
Molibdeno	0,1-40	0,5
Níquel	2,0-750	1,5
Plomo	2,0-300	1

*Determinación realizada en mg/kg o % de tejido vegetal seco.

- 1) Las partículas inorgánicas, constituyen sobre el 90% de los sólidos del suelo, las cuales consisten en fragmentos pequeños de minerales derivados del desgaste mecánico y/o químico del material parental. Casi todos los suelos son una mezcla de grava, arena y arcilla, sin embargo las proporciones en las que se encuentran varían considerablemente (Daubenmire, 1974), determinando las características o propiedades del suelo, tales como su textura, estructura, la velocidad de infiltración y de movimiento del agua, la capacidad de retención de agua y el grado de aireación.
- 2) La materia orgánica del suelo (MO) ha sido definida como la fracción orgánica del suelo proveniente de la descomposición de residuos de plantas y animales. Los principales elementos constituyentes de la MO son C (52-58%), O (34-39%), H (3,3-4,8%), y N (3,7-4,1%). La MO del suelo consiste en sustancias húmicas y no-húmicas (Stevenson, 1982). Las sustancias no-húmicas están compuestas por carbohidratos, proteínas, péptidos, aminoácidos, ceras, grasas y ácidos de bajo peso molecular; entre las sustancias no-húmicas destacan la lignina, hemicelulosa, celulosa y éter (Stivenson & Ardakani, 1972). Las sustancias húmicas se forman por la degradación de la materia orgánica, constituyendo la

fracción de MO estabilizada. Las sustancias húmicas se subdividen en ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y humina (Sparks, 1995). Eventualmente, a través del proceso de mineralización, los compuestos orgánicos pueden ser convertidos en dióxido de carbono, agua y elementos minerales (Schlesinger, 1991).

Los contenidos de MO de un suelo mineral varían desde un 0,5 a un 5% sobre base seca en el horizonte superficial, en cambio, en los suelos orgánicos pueden llegar a un 100%. Este contenido depende de 5 factores de formación del suelo, como son: el clima, tiempo, vegetación, material parental, y topografía. Naturalmente, estos factores varían para los diferentes suelos, por lo tanto, las acumulaciones de materia orgánica se presentan en distintas proporciones (Sparks, 1995).

El contenido de materia orgánica tiene influencia sobre muchas propiedades del suelo, tales como la capacidad de retención de agua, extracción de bases, estabilidad de agregados del suelo, aireación del suelo, capacidad y suministro de nitrógeno, fósforo y micronutrientes (Lexmond, 1980). Además, tiene una función esencial en la acumulación y transporte de los metales, así como en detener su circulación en el suelo (Lindsay, 1979). Por lo tanto, la toxicidad de ciertos metales en el suelo puede incrementarse o decrecer por la presencia de sustancias orgánicas bajo ciertas condiciones ambientales específicas (Allen et al., 1995). De este modo, es posible considerar a la MO como el principal contribuyente de la capacidad amortiguadora del suelo, esencialmente por su aporte de complejantes metálicos (Flanagan & Van Cleve, 1983).

Los tipos de interacciones entre los iones metálicos y los complejantes, tales como ligandos inorgánicos (aniones) y ligandos orgánicos (por ejemplo, grupos carboxílicos y fenólicos de la MO), pueden ser predichas basándose en principio en las características ácido base de los cationes y en el carácter electrón-donor de los sitios de complejación (Buffle & Stumm, 1994). Las constantes de estabilidad de los complejos metálicos en la mayor parte de los suelos, presentan el siguiente orden: $Fe^{+3} > Al^{+3} > Cu^{+2} > Ni^{+2} > Pb^{+2} > Ca^{+2} > Zn^{+2} > Mn^{+2}$ (Irving & Williams, 1953; Schnitzer & Skinner, 1996).

- 3) El carbono total del suelo, es la suma del carbono orgánico (CO) e inorgánico (CI). La mayoría del CO se asocia con la fracción de materia orgánica, mientras que el CI se asocia usualmente con los minerales carbonatados. El CO es el mayor componente de la materia orgánica, el cual está compuesto por el carbono que forma parte de los hidratos de carbono, proteínas, lípidos, "humus" estabilizado y por compuestos casi inertes y altamente carbonizados, como por ejemplo: carbón, grafito y hulla. Por su parte, el carbono inorgánico del suelo está compuesto por HCO_3^- , CO_3^{2-} , H_2CO_3 y por CO_2 , de tal modo, el contenido de carbonatos de un suelo depende directamente del contenido de carbono mineral presente (Stivenson & Ardakani, 1972).
- 4) La capacidad de intercambio catiónica (CIC) es definida como la suma total de cationes intercambiables que un suelo puede absorber. La CIC de la MO del suelo varía entre 200 a 400 meq/100g de suelo, estimándose que sobre un 80% de la CIC del suelo es debida a la presencia de la MO (Stevenson, 1982). Se ha visto que la CIC de la fracción orgánica del suelo se incrementa ampliamente al aumentar el pH, debido a la mayor disociación de los grupos funcionales de la MO, generando iones H^+ .
- 5) Por último, el pH del suelo tiene efectos importantes sobre la estructura del suelo, en el proceso de desgaste del material parental y de humificación, en la movilización de los elementos minerales y en el intercambio iónico (Leeper, 1952). Además, el pH afecta directamente la disponibilidad de metales para las plantas, ya que influye sobre la solubilidad de los compuestos poco solubles y en la formación de complejos en el suelo (Allen et al., 1995). De tal modo, el pH es uno de los factores determinantes en la transferencia de metales contaminantes a las plantas.

Generalmente la disminución de una unidad de pH, podría aumentar la solubilidad del metal por un factor de 10 (Allen et al., 1995). Sin embargo, no es una tendencia general que se produzcan incrementos en la solubilidad de los complejos por disminución en la acidez.

El pH del suelo varía ampliamente de un hábitat a otro. Aún dentro de un mismo hábitat difiere a distintas profundidades o perfiles del suelo y a lo largo del año (Daubenmire, 1974). Los suelos superficiales casi siempre son más ácidos que el subsuelo, debido a que los primeros contienen mayor cantidad de materia orgánica que forma ácidos (Daubenmire, 1974).

La importancia de los parámetros del suelo en la disponibilidad de elementos contaminantes para las plantas, radica en el grado de toxicidad producido por estas sustancias en los sistemas vegetales, lo cual depende ampliamente del tipo de contaminante involucrado en la captación. En este punto, se debe considerar que las plantas solo requieren de ciertos elementos minerales esenciales para crecer, mantenerse y reproducirse (Marschner, 1986), los cuales son captados desde el suelo (Daubenmire, 1974). Estos elementos se clasifican en macronutrientes (N, P, S, K, Ca, y Mg), los cuales se requieren en grandes cantidades, y en micronutrientes, tales como el Cu, Zn, Mn, Mo, B, Fe y Cl, los que son requeridos en cantidades traza por las plantas (Marschner, 1986; Farago, 1994).

Cada planta requiere una cantidad óptima de elementos minerales esenciales para desarrollarse normalmente, pero si existe exceso de alguno, la planta podría absorber y acumular cantidades tóxicas, produciéndose un desarrollo anormal de ésta, ya que los ciclos metabólicos son alterados (Treshow, 1970). Concentraciones levemente elevadas de elementos minerales, producen alteraciones bioquímicas en las plantas, no observables fácilmente, mientras que altas concentraciones de estos elementos producen alteraciones mayores, observables microscópicamente, tales como clorosis y necrosis en las hojas, aceleración de la senescencia de diversos tejidos e inhibición de la reproducción, llevando incluso a la muerte de la planta (Hewitt & Smith, 1975).

La concentración de varios metales esenciales en las plantas muestra una débil correlación con la concentración total de estos metales en el suelo. Esta relación difiere según el metal y la estructura vegetal (Lindsay, 1974). Sin embargo, se ha observado una correlación entre los contenidos de metales esenciales en las

plantas y la concentración iónica de estos metales en el suelo. Esto indica que las fracciones intercambiables más solubles, caracterizan la movilidad y fitodisponibilidad de las especies de metales en el suelo, más bien que el contenido total del metal en el suelo. O sea, la concentración iónica de metales esenciales en la solución del suelo, sería un buen indicador de la movilidad del metal en este substrato (Kabata-Pendias, 1995).

En las plantas terrestres, los metales son principalmente tomados por medio de las raíces, las cuales poseen una gran habilidad para modificar las características químicas de su ambiente circundante, para cambiar el pH de la solución del suelo y, por lo tanto, tienen una gran influencia sobre la solubilidad y biodisponibilidad de la mayoría de los metales en el suelo (Folkesson, 1982). Se ha postulado que la captación de minerales por las raíces se compone de 4 pasos en la cadena de captación: (1) movimiento de iones o complejos en el suelo hacia las raíces, (2) captación hacia las raíces, (3) transporte a través de las raíces al sistema vascular y (4) movimiento al vástago (Alloway, 1994a).

Una raíz toma metales desde el suelo por distintos mecanismos (Larcher, 1980), como por ejemplo:

- a) Por absorción de los metales en forma de iones desde la solución del suelo. Este es el caso de los iones que se encuentran disponibles en la solución del suelo.
- b) Por absorción mediada por intercambio iónico con los metales absorbidos en los coloides del suelo. Los iones H^+ , liberados en la disociación del dióxido de carbono, desplazan a los cationes metálicos absorbidos en la superficie de arcillas y humus, dejándolos disueltos y accesibles para la absorción radical.
- c) Por liberación de los iones absorbidos vía excreción de protones y ácidos orgánicos. La solubilidad de los metales en el suelo también puede ser modificada por la liberación de ligandos (ácidos orgánicos) desde las raíces. Estos ligandos o agentes complejantes, podrían formar complejos con los metales esenciales, llevando al metal hacia la solución, haciéndolo disponible para su captación bajo ciertas condiciones (Folkesson, 1982). Así, los complejos actúan como un transportador de metales hacia la superficie de las raíces.

La captación de metales a través de la membrana externa de las raíces es regulada por procesos pasivos (no requieren energía) y activos (requieren energía), lo cual es controlado por muchos factores de la planta y del suelo. Se piensa que la absorción de los metales esenciales, es activa en el rango de deficiencia y normalidad y parece ser pasiva en el rango de toxicidad (Folkesson, 1982). Además, la absorción de estos metales es promovida por un pH bajo y es restringida por la adición de materia orgánica (Davies, 1981; Lander & Linderström, 1999).

El cobre es un micronutriente esencial para el funcionamiento de los sistemas vegetales (Farago, 1994). No obstante, el aumento de la concentración de cobre en el suelo debido a distintas fuentes antrópicas contaminantes, puede producir efectos de toxicidad en aquellas especies vegetales sensibles a este tipo de estrés metálico.

Sin embargo, se debe considerar que la mayor parte del cobre presente en el suelo no está disponible para las plantas, ya que, en general, el cobre forma complejos estables con compuestos orgánicos presentes en el humus del suelo (Sparks, 1995; Nicholas, 1975). El Cu^{+2} y el $\text{Cu}(\text{OH})^+$ son mantenidos en los sitios de intercambio del suelo desde donde pueden ser desplazados por iones H^+ , volviéndose disponibles para las plantas (Minnich et al., 1987). Por lo tanto, a pH bajos se favorecen concentraciones elevadas de Cu^{+2} en la solución del suelo (Shorrocks & Alloway, 1985), el cual se considera fitodisponible.

La solubilidad de los complejos de cobre en la solución del suelo es de extrema importancia, ya que determina la disponibilidad de cobre para las plantas (Berqvist & Sundbom, 1980). Esta disponibilidad depende de la razón entre la concentración del metal y la concentración de la materia orgánica. A concentraciones relativamente bajas de cobre, prima la formación de pequeñas cantidades de complejos fácilmente solubles, mientras que a concentraciones relativamente altas de cobre, usualmente se promueve la formación de una gran cantidad de complejos menos solubles (Folkesson, 1982). Este fenómeno podría posiblemente ser interpretado como un ejemplo de la capacidad autoreguladora de la naturaleza.

En general, cuando los niveles de cobre superan el umbral crítico de toxicidad para una especie vegetal (e.g. mayor a 20-30 mg de cobre/kg de peso seco en las

hojas de las plantas de cultivo (Marschner, 1986; Treshow, 1970)) se produce una alteración en los procesos fisiológicos generales, tales como transpiración, respiración y fotosíntesis (Baker & Walker, 1989). Específicamente, cantidades excesivas de cobre en el suelo limitan el desarrollo normal de las raíces al alterar su metabolismo, generando sistemas radicales pequeños y superficiales, disminuyendo la productividad vegetal (Walley et al., 1974). El desarrollo reducido de las raíces restringe la captación de agua y de nutrientes, conduciendo a un desbalance nutricional e hídrico general de la planta (Farago, 1994). A nivel del vástago, el exceso de cobre induce síntomas generales de senescencia (Fernández y Henríquez, 1991).

El mecanismo de toxicidad del cobre en los vegetales, se produce a través de la interferencia de las reacciones metabólicas normales, principalmente, a través del bloqueo de las reacciones enzimáticas específicas que requieren hierro (Woolhouse, 1983). Entonces, la toxicidad por cobre se produciría, en parte, porque induce a una deficiencia de Fe.

Otros efectos visibles de toxicidad por cobre son:

- Clorosis homogénea en la lámina foliar (Sandmann & Böger, 1983).
- Enrojecimiento de la lámina foliar (Fernández y Henríquez, 1991).
- Inhibición del crecimiento radical en mayor magnitud que el crecimiento del vástago (Lexmond y Vorm, 1981), debido a que las raíces son los sitios donde primeramente se acumula el exceso de cobre en las plantas, así, la concentración en las raíces aumenta en forma proporcional a la concentración del cobre biodisponible en la solución suelo (Davis & Mertz, 1987).
- Alteración de la morfología radical, al inhibirse o estimularse la formación de raíces secundarias, dependiendo de la especie vegetal (Fernández y Henríquez, 1991).
- Pérdida de la pigmentación y reducción de la vitalidad del vástago (Marschner, 1986).

La concentración total de cobre presente en el suelo no se relaciona directamente con los efectos de toxicidad esperados para especies vegetales sensibles, sino que es la fracción de cobre del suelo que está biodisponible, la relacionada con tales efectos (Lander & Linderström, 1999). De esta forma, diversos

factores externos a la sensibilidad de las plantas, como la presencia de una matriz fisicoquímica compleja capaz de complejar el cobre incorporado al suelo (Ginocchio, 1997), junto con la solubilidad intrínseca de la forma química en la que el cobre está siendo incorporado (Kabata-Pendias, 1995), determinarían la biodisponibilidad del cobre para las plantas y, por lo tanto, la intensidad del efecto de toxicidad para una especie vegetal dada.

Aún no está claro si el cobre es captado como Cu^{+2} o como cobre complejado, pero su captación por las plantas es relativamente independiente del pH del suelo, específicamente a $\text{pH} > 5,5$ (Lander & Linderström, 1999). No obstante, se ha observado que en las plantas, los metales esenciales son usualmente transportados en la forma de complejos orgánicos desde las raíces al vástago. Estos complejos orgánicos son más móviles que los iones libres dentro de las plantas y tal sistema de transporte facilita la transferencia de los metales a las partes superiores de la planta (Folkesson, 1982). En las raíces, más del 99% del cobre está presente en forma complejada (Graham, 1979).

La utilización de cobre por las plantas depende predominantemente del movimiento de este metal entre las distintas estructuras morfológicas de la planta (Begon et al., 1990). Se ha señalado que las plantas desarrolladas en ambientes con altos niveles de cobre, frecuentemente transportan poco cobre a sus hojas, llegando incluso, en condiciones de exceso, a acumularse en grandes cantidades en la raíz, en tanto que en las porciones aéreas alcanza concentraciones comparativamente menores (Forbes, 1917; Laarsen, 1966; Taiz & Zeiger, 1991). Sin embargo, existen especies de plantas que no responden de la forma anteriormente explicada, sino que un exceso de cobre en las raíces de estas plantas, se traduce en un aumento lineal de cobre en las hojas (Baker, 1981).

Por lo tanto, para entender la dinámica del cobre en el suelo y su captación por las plantas, es necesario tomar en consideración una gran cantidad de factores bióticos, ambientales y químicos (Flemming & Trevors, 1989). Entre estos factores se encuentran los siguientes: el grado de deficiencia o exceso de cobre en la planta, la interacción del cobre con otros contaminantes metálicos o nutrientes, la profundidad

de las raíces, las condiciones de crecimiento, el estado nutricional y el porcentaje de transpiración de la planta; además, la captación es influenciada por factores ambientales como el nivel de luz, temperatura y condiciones de humedad del suelo (Folkesson, 1982). Otros factores bióticos que tienen influencia sobre la captación de cobre son la edad y el tamaño del organismo en estudio (Hobbie, 1992). La importancia de la edad se debe probablemente al hecho de que la necesidad del cobre como elemento nutritivo es mayor en plantas jóvenes (Groves et al., 1983). Por su parte, la fisiología de las plantas y el tiempo de exposición al metal tienen una influencia directa en la acumulación de metales en las plantas (Webber, 1981). Además, el pH del suelo, los complejos y la cantidad de metal en el suelo afectan el paso del metal entre las diferentes partes de la planta, por ejemplo, raíces y vástagos (porción aérea de la planta) (Allen et al., 1995).

Una de las mejores herramientas usadas actualmente para determinar los efectos fitotóxicos producidos por el cobre biodisponible en el suelo, son los bioensayos. Estos tienen como finalidad medir el efecto de cargas contaminantes de metales pesados incorporadas al suelo o su equivalente sobre la comunidad biótica terrestre (Kabata-Pendias & Pendias, 1984).

Los bioensayos consisten en un conjunto de pruebas experimentales, que pueden ser aplicadas bajo condiciones controladas (invernadero, cámaras de crecimiento, laboratorio), con generación de datos experimentales conducentes a establecer relaciones causa-efecto y/o dosis-respuesta, o bajo condiciones de campo (Ginocchio, 1997). Mediante los ensayos bajo condiciones controladas es posible:

- Controlar las variables externas a los suelos, como radiación solar, aporte hídrico, temperatura y vientos, que a nivel de campo son inmanejables y pueden afectar los ensayos hasta el punto de enmascarar los efectos debidos a los contaminantes,
- aplicar diversos tratamientos a un número elevado de muestras, todas ellas bajo las mismas condiciones ambientales estandarizadas,
- realizar una gran cantidad de ensayos en un corto tiempo con resultados confiables y validados, y

- obtener medidas cuantitativas confiables.

Sin embargo, existen muchos problemas asociados a la realización de ensayos dosis-respuesta o de toxicidad en condiciones controladas, como por ejemplo:

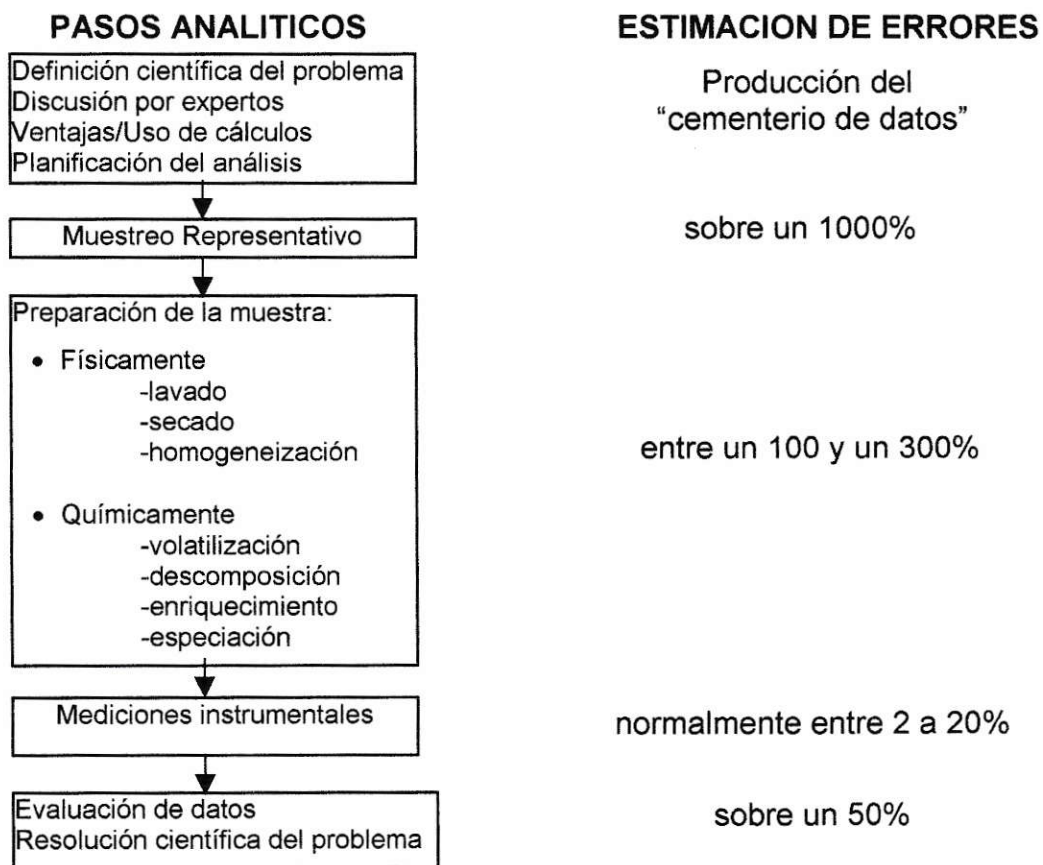
- La escala temporal de experimentación es reducida, lo que genera incertidumbre en cuanto a su relevancia o aplicabilidad a la situación natural.
- No considera todas las etapas del ciclo de vida de las plantas, las que podrían tener distintas sensibilidades al incremento de metales en el ambiente.
- No considera la variabilidad ambiental local en el incremento de metales en el suelo, producida por la alta heterogeneidad geológica, edáfica, topográfica, y microclimática, entre otros factores que pueden estar presentes en forma natural y conjunta a un nivel muy localizado.
- Las respuestas de las plantas en condiciones controladas normalmente no son representativas de las condiciones naturales de respuesta, ya que se les hace crecer en forma óptima, en ausencia de los múltiples factores de estrés presentes en terreno.

No puede olvidarse que la magnitud del cambio inducida en la respuesta de las plantas por una exposición a una carga metálica contaminante, es fuertemente dependiente de las condiciones energéticas del sistema biológico (Vitousek & Walker, 1987). Así, los resultados de ensayos bajo condiciones controladas serán siempre mayores que los emergentes de ensayos desarrollados a campo abierto, sin controlar las variables energéticas incidentes (Baker & Walker, 1989).

Con el fin de obtener resultados confiables y validados en los estudios que utilicen bioensayos para determinar la toxicidad producida por elementos contaminantes sobre diversas matrices ambientales, estos deben efectuarse siguiendo el proceso analítico. Asimismo, los análisis químicos y fisicoquímicos realizados a las matrices ambientales sometidas a ensayo deben ceñirse al concepto de calidad analítica, lo cual permitiría asegurar la confiabilidad de los resultados. Sin embargo, sólo en la última década se ha puesto énfasis en la aplicación del proceso analítico en los distintos procedimientos de análisis, por lo tanto, la mayor parte de

los estudios de toxicidad por metales pesados realizados con anterioridad a la última década presentan resultados dudosos por decir lo menos, lo cual impide una adecuada recopilación de datos y una comparación óptima.

Los porcentajes de error de los resultados están en estrecha relación con el desarrollo del proceso analítico, el cual depende en gran medida de la calidad de cada paso analítico. Un diagrama simplificado de los diferentes pasos analíticos durante el procedimiento de un análisis químico, incluyendo la estimación del error (Markert & Klausmeyer, 1990) se presenta a continuación:



Grandes esfuerzos se han y se siguen realizando con el objeto de minimizar los errores del proceso analítico, ya que esta es la única vía de ir resolviendo e interpretando los problemas de contaminación (Berrow & Burrige, 1977; Berry & Wallace, 1981).

IV.- ENSAYO DE FITOTOXICIDAD CON COBRE EN *Noticastrum sericeum*.

4.1.- ANTECEDENTES GENERALES:

La utilización de bioensayos para determinar la fitotoxicidad producida por los metales pesados incorporados al suelo o substratos de crecimiento, permite la realización de análisis tanto cualitativos como cuantitativos sobre los diversos efectos fitotóxicos producidos por la carga metálica.

En el presente estudio, se determinó el nivel de fitotoxicidad producido por dos formas químicas del cobre (CuSO_4 y CuO), sobre plántulas de *Noticastrum sericeum*. Estas plántulas fueron cultivadas en dos tipos de substratos de crecimiento: tierra de hoja comercial y en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L, a los cuales se les adicionó los compuestos de cobre en distintas dosis: 0, 10 y 100 mg/kg o mg/L.

Con el fin de precisar las propiedades fisicoquímicas de los substratos de crecimiento utilizados en el estudio y, además, para definir los posibles aportes metálicos realizados por estos substratos al ensayo, se realizó los correspondientes análisis químicos y fisicoquímicos de estos substratos.

La tierra de hoja utilizada como substrato sólido de crecimiento consistió en tierra de hoja reforzada, marca Terra Green, cuyo productor es Gaspar Green. Esta tierra está compuesta de corteza de pino reforzada con cama de champiñones; además, posee altos niveles de turba y nutrientes como N, P y K; y se caracteriza por su alta esponjosidad y por su pronunciado color oscuro.

Los resultados obtenidos mediante la determinación de ciertas características fisicoquímicas generales del substrato sólido utilizado en el ensayo, sin tratamiento previo con cobre, se indican en la tabla 2, en tanto que los contenidos metálicos de este mismo substrato, se muestran en la tabla 3:

Tabla 2: Valores de los parámetros fisicoquímicos determinados en el sustrato sólido (tierra de hoja comercial) utilizado en el ensayo, previo a la aplicación de cobre.

pH	%humedad	%MOT	CIC (meq/100g)	%saturación
Agua: 7,87 CaCl ₂ : 7,25	53,8	53,8	52,3	135,1

Tabla 3: Contenido de metales pesados en el sustrato sólido (tierra de hoja comercial) utilizado en el ensayo, previo a la aplicación de cobre.

Cu total (mg/kg)	Zn total (mg/kg)	Pb total (mg/kg)	Cd total (mg/kg)	Cu soluble (mg/kg)	Cu iónico (mg/kg)
38,04	57,92	5,28	0,33	0,018	2,51E-10

En la tabla 2, se observa que el sustrato sólido utilizado en el ensayo, sin tratamiento previo con cobre, presenta niveles de pH neutro, un contenido de materia orgánica elevado, una gran capacidad de retención de agua y una alta CIC. Por lo tanto, se presume que la mayor parte de la carga metálica adicionada en el ensayo no estará disponible para las plantas, puesto que se complejará con la materia orgánica presente. Además, al pH neutro del sustrato, casi la totalidad de los metales presentes se encontrarían complejados.

Por su parte, de la tabla 3 se observa que la concentración total de Cu, Zn, Pb y Cd y los niveles de cobre soluble y cobre iónico de la tierra de hoja utilizada son bajos, de tal modo, la contribución metalífera aportada por el sustrato sólido a la determinación de cobre a realizar en estos mismos sustratos enriquecidos con cobre, será mínima, considerando los grandes aportes de cobre proporcionados en el ensayo (10 y 100 mg/kg). Los datos presentados en las tablas anteriores

corresponden a parámetros del sustrato sólido sin tratamiento previo, por lo tanto, el sustrato no se ha sometido a ningún tipo de riego ni a la aplicación de cobre.

Además de los valores anteriormente expuestos, algunos de los parámetros fisicoquímicos determinados por el productor, se presentan en la tabla 4. En ella se observa que los valores de %MOT y CIC brindados por el productor son muy similares a los determinados en el presente estudio (diferiendo en alrededor de un 6,8% en el caso del %MOT y en 2,05 meq/100g en el caso de la CIC). Estos valores proporcionan un indicio de la exactitud de los resultados obtenidos.

Tabla 4: Valores de los parámetros fisicoquímicos del sustrato sólido (tierra de hoja comercial) utilizado en el ensayo, indicados por el productor.

%MOT	%Carbono	%Nitrógeno total	CIC (meq/100g)	%Relación C/N
47,08	27,35	0,97	50,25	28,20

Por su parte, al considerar que se utilizó soluciones acuosas de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L como sustrato líquido de crecimiento, es vital determinar las propiedades fisicoquímicas propias del líquido base en la preparación de las soluciones utilizadas en el presente estudio.

Por lo tanto, al igual que en el caso del sustrato sólido, se determinó algunos parámetros fisicoquímicos correspondientes al agua utilizada tanto en la preparación de las soluciones acuosas de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L (sustrato líquido de crecimiento), como en el riego del sustrato sólido durante el ensayo. Los resultados de los análisis del agua desionizada utilizada durante el ensayo de fitotoxicidad con cobre, se presentan en la tabla 5.

Tabla 5: Valores de algunos parámetros determinados en el agua desionizada utilizada en preparación de soluciones y riego durante el ensayo.

pH	Temperatura (°C)	Conductividad (μS/cm)	Contenido de cobre (mg/L)	Contenido de zinc (mg/L)	Contenido de plomo (mg/L)	Contenido de cadmio (mg/L)
4,77	22,9	8,4	Bajo L.D.	N.D.	bajo L.D.	Bajo L.D.

Donde:

- L.D: Límite de detección.
- N.D: No detectado.

En la tabla 5, se observa que el agua desionizada utilizada como base del substrato líquido empleado en el ensayo presenta una calidad aceptable, ya que la conductividad eléctrica y los contenidos de cobre, zinc, plomo y cadmio, indican la baja cantidad de metales disueltos que esta agua posee. Sin embargo, su pH es algo ácido, lo cual podría afectar su calidad.

En base a los resultados anteriores, en la tabla 6 se indican los valores de los límites de detección y de cuantificación para los metales analizados en el agua desionizada, mediante Espectroscopia de Absorción Atómica con horno de grafito (GFAAS) (Perkin Elmer).

Tabla 6: Valores de límites de detección (L.D) y límites de cuantificación (L.C) para los metales determinados en el agua desionizada utilizada en el ensayo, mediante la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica con HG.

	Cobre	Zinc	Plomo	Cadmio
Límite de detección	360 ppt	N.D	543 ppt	630 ppt
Límite de cuantificación	1,2 ppb	N.D	1,81 ppb	2,1 ppb

Es necesario establecer lo que se entiende por cada uno de estos términos:

$$\text{L.D.} = 3 * \delta$$

y

$$\text{L.C.} = 10 * \delta$$

Donde δ es la desviación estándar del blanco, la cual se obtuvo mediante continuas mediciones del blanco, compuesto por agua destilada desionizada, utilizando EAA-HG como técnica analítica.

De la tabla 6, se extrae que la utilización de la Espectroscopia de Absorción Atómica-HG como técnica analítica, permitió cuantificar concentraciones muy bajas de cobre (metal de interés en este estudio), proporcionando una alta precisión y exactitud en las medidas. Además, los valores indicados en la tabla 6 sirven como referencia a la hora de detectar o cuantificar los contenidos metálicos en diversas matrices ambientales.

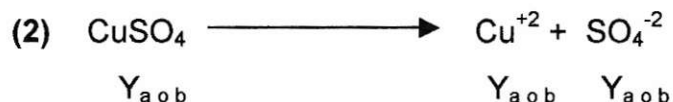
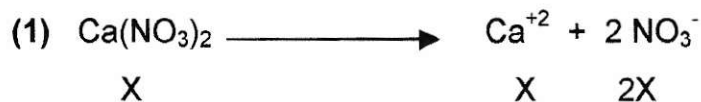
Por otro lado, considerando que en el presente ensayo se utilizó soluciones acuosas de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L enriquecidas con 0, 10 y 100 mg/L de CuSO_4 y de CuO como substratos líquidos de crecimiento, es necesario determinar teóricamente la concentración de cobre biodisponible en estas soluciones y, además, descartar la posible formación de CaSO_4 (s) en el caso de las soluciones de nitrato de calcio enriquecidas con sulfato de cobre, lo cual podría disminuir la cantidad de nutrientes para las plántulas.

Cabe destacar que el sulfato de cobre (CuSO_4) es una sal con alta solubilidad en agua, con un producto de solubilidad de $\log K = 2,4$ y una solubilidad de 143 g/l a 25°C. Al contrario, el óxido cúprico CuO , tiene una baja solubilidad en agua ($\log K = -20,5$) (Handbook of Chemistry and Physics, 1980-1981).

Por lo tanto, con el fin de demostrar que no precipita CaSO_4 en las soluciones de ensayo y, además, para determinar el grado de solubilidad de los compuestos utilizados, se realizaron los siguientes cálculos teóricos.

i) **Solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L enriquecida con CuSO_4 :**

Al establecer que el pH de la solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L se encontraba próximo a la neutralidad, por estequiometría se tienen las siguientes disociaciones:



En solución acuosa, el equilibrio de las ecuaciones (1) y (2) se desplaza a la formación de productos.

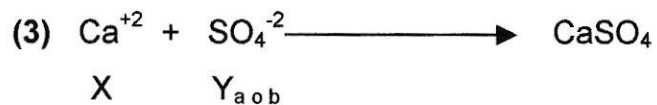
Donde:

$$X = 0,5 \text{ g/L} = 1,25 \times 10^{-2} \text{ M.}$$

$$Y_a = 10 \text{ mg/L de CuSO}_4 = 0,01 \text{ g/L} = 6,27 \times 10^{-5} \text{ M.}$$

$$Y_b = 100 \text{ mg/L de CuSO}_4 = 0,1 \text{ g/L} = 6,27 \times 10^{-4} \text{ M.}$$

El equilibrio de la formación de CaSO_4 es:



El producto iónico (PI) está dado por:

$$\text{PI} = [\text{Ca}^{+2}] [\text{SO}_4^{-2}]$$

$X \quad Y_{aob}$

Cuando :

$PI = K_{s0} \text{ CaSO}_4 \longrightarrow$ Solución saturada (equilibrio dinámico de formación y disociación de precipitado).

$PI < K_{s0} \text{ CaSO}_4 \longrightarrow$ no hay formación de precipitado.

$PI > K_{s0} \text{ CaSO}_4 \longrightarrow$ precipita.

Se tiene que:

(a) En el caso del tratamiento con CuSO_4 10 mg/L:

$$[\text{SO}_4^{-2}] = 6,27 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$[\text{Ca}^{+2}] = 0,0125 \text{ M}$$

$$K_{s0} \text{ CaSO}_4 = 2,4 \times 10^{-5}$$

$$PI = [\text{SO}_4^{-2}] [\text{Ca}^{+2}]$$

$$PI = 6,27 \times 10^{-5} * 0,0125$$

$$PI = 7,84 \times 10^{-7}$$

Por lo tanto:

$$\begin{array}{ccc} PI & < & K_{s0} \\ 7,84 \times 10^{-7} & < & 2,4 \times 10^{-5} \end{array}$$

NO PRECIPITA CaSO_4 .

(b) En el caso del tratamiento con CuSO_4 100 mg/L:

$$[\text{SO}_4^{-2}] = 6,27 \times 10^{-4} \text{ M}$$

$$[\text{Ca}^{+2}] = 0,0125 \text{ M}$$

$$K_{s0} \text{ CaSO}_4 = 2,4 \times 10^{-5}$$

$$PI = [SO_4^{-2}] [Ca^{+2}]$$

$$PI = 6,27 \times 10^{-4} * 0,0125$$

$$PI = 7,84 \times 10^{-6}$$

Por lo tanto:

$$\begin{array}{ccc} PI & < & K_{so} \\ 7,84 \times 10^{-6} & < & 2,4 \times 10^{-5} \end{array}$$

NO PRECIPITA $CaSO_4$.

ii) Solución de $Ca(NO_3)_2$ 0,5 g/L enriquecida con CuO:

Debido a que el CuO posee una baja solubilidad en agua, fue necesario recurrir a la constante de solubilidad para conocer la concentración de cobre iónico en solución, considerando un pH neutro. La ecuación del producto de solubilidad es la siguiente:



Dado:

$$\text{Log } K = -20,5$$

$$K_{so} = 3,162 \times 10^{-21}$$

$$K_{so} = [Cu^{+2}] \times [OH^{-}]^2$$

$$[OH^{-}] = 1 \times 10^{-7} \text{ M}$$

$$Cu^{+2} = K_{so} / [OH^{-}]^2$$

$$Cu^{+2} = 3,2 \times 10^{-7} \text{ M}$$

No fue considerada la fuerza iónica, ya que su efecto es prácticamente despreciable.

Por lo tanto, se considera que el CuSO_4 es una sal totalmente soluble en la solución acuosa de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L, donde el cobre iónico y por ende biodisponible, alcanza la concentración teórica de $6,27 \times 10^{-5}$ M y $6,27 \times 10^{-4}$ M en las soluciones enriquecidas con CuSO_4 de 10 y 100 mg/L, respectivamente. Además, se encontró que teóricamente no se produce la formación de ningún tipo de precipitado en la solución de nitrato de calcio enriquecida con sulfato de cobre.

En el caso de CuO , debido a su baja solubilidad, se obtuvo que la concentración teórica de cobre biodisponible es de $3,2 \times 10^{-7}$ M, la cual es ínfima en comparación con la concentración de cobre biodisponible en las soluciones sulfatadas de 10 y 100 mg/L.

Una vez establecidos los parámetros fisicoquímicos de los substratos de crecimiento utilizados en el ensayo y establecidas las concentraciones teóricas de cobre biodisponible en las soluciones enriquecidas con 10 y 100 mg/L de CuSO_4 y CuO , se procedió a realizar los análisis cualitativos y cuantitativos de los efectos fitotóxicos producidos por el cobre. Los análisis cualitativos realizados se basaron en la observación de los efectos morfofisiológicos que produjo el cobre sobre cada sistema vegetal, como la inhibición del crecimiento o necrosis. Por su parte, los análisis cuantitativos realizados permitieron detallar numéricamente los efectos fitotóxicos que produjo la carga metálica adicionada, mediante la determinación de la sobrevivencia de las plántulas sometidas a ensayo y a través de la medición de ciertos parámetros propios de las plantas, como son la longitud y peso seco de raíces y vástagos. Asimismo, se efectuaron análisis químicos a las muestras vegetales, los cuales también permitieron demostrar numéricamente los efectos de fitotoxicidad producidos por el cobre.

4.2.- PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO:

4.2.1.- LAVADO DE POTES PLASTICOS:

El lavado del material plástico (potes) fue el primer procedimiento realizado en este estudio. Estos pots se mantuvieron en una solución de ácido nítrico al 5% durante 24 horas, posteriormente se enjuagó 2 veces con agua desionizada a pH 4,77 y se secó al aire por otras 24 horas.

Tal procedimiento se realizó con el fin de extraer cualquier partícula e ion metálico adherido a las paredes de estos pots, los cuales que pudieron interferir en las determinaciones a realizar.

4.2.2.- PRETRATAMIENTO DEL SUBSTRATO SOLIDO:

Previo al montaje del ensayo, el substrato sólido fue tamizado hasta conseguir un tamaño de partícula <5 mm. Posteriormente, se pesó un pote relleno con tierra de hoja para calcular la cantidad de substrato a utilizar. Se separó y empaquetó la tierra de hoja correspondiente a cada uno de los tratamientos a realizar, en 5 bolsas plásticas debidamente selladas y rotuladas. Luego, se procedió a adicionar el compuesto de cobre al substrato sólido, según el siguiente esquema:

Bolsa 1: sólo tierra de hoja (880 g).

Bolsa 2: tierra de hoja (860 g) + 0,0086 g de CuSO_4 (10 mg/kg).

Bolsa 3: tierra de hoja (870 g) + 0,0870 g de CuSO_4 (100 mg/kg).

Bolsa 4: tierra de hoja (800 g) + 0,0080 g de CuO (10 mg/kg).

Bolsa 5: tierra de hoja (870 g) + 0,0870 g de CuO (100 mg/kg).

Una vez enriquecido el substrato sólido, se procedió a humedecerlo periódicamente con 100 ml de agua desionizada a pH 4,77 y a homogeneizarlo

manualmente durante los siguientes 10 días, para permitir la adecuada incorporación del cobre a la tierra de hoja (figura 2).

Se debe considerar, que las concentraciones de 10 y 100 mg/kg de CuSO_4 y CuO corresponden a las concentraciones teóricamente adicionadas al sustrato sólido.

4.2.3.- PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE SOLUCIONES-SUBSTRATO:

La preparación de soluciones para su utilización como sustrato líquido de ensayo, se realizó según el siguiente protocolo:

- a) Se preparó 5 litros de una solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L, para lo cual se agregó 2,5 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (Riedel-de Haën) en un matraz de 5L y se aforó con agua desionizada a pH 4,77.
- b) Utilizando la solución antes mencionada, se procedió a preparar los distintos tratamientos según el siguiente esquema:
 - * 1L de solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L.
 - * 1L de solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L + 0,01 g de CuSO_4 (10 mg/L).
 - * 1L de solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L + 0,10 g de CuSO_4 (100 mg/L).
 - * 1L de solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L + 0,01 g de CuO (10 mg/L).
 - * 1L de solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L + 0,10 g de CuO (10 mg/L).

Las soluciones descritas fueron preparadas en matraces de aforo de 1L, con su respectiva identificación.

Este procedimiento se realizó cada 2 días durante un periodo de 22 días.

4.2.4.- METODOLOGIA APLICADA AL ENSAYO DE FITOTOXICIDAD:

El primer paso requerido en este procedimiento fue la siembra de las semillas de *Noticastrum sericeum* en cápsulas de Petri, utilizando papel absorbente como sustrato de inicio y agua desionizada como medio de cultivo. Para esto, se colocó papel absorbente en la base de las cápsulas, el cual se humedeció ligeramente con agua desionizada y luego se esparció alrededor de 50 semillas uniformemente dentro de cada cápsula, volviendo a humedecer el sustrato de inicio. Las cápsulas de Petri fueron selladas con paraplast para mantener el grado de humedad adecuado y luego se trasladaron a la cámara de crecimiento (25 de Agosto de 1999), la cual aportó la luz y temperatura necesarias para la germinación de las semillas (figura 1). La cámara de crecimiento utilizada para la germinación de las semillas, se caracteriza por presentar luz artificial intensa, emanada de tubos fluorescentes de 18 WTB, con una regulación de fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Posteriormente, se procedió a preparar de las soluciones acuosas de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L enriquecidas con cobre (metodología 4.2.3). Además, se tamizó la tierra de hoja comercial, la cual se separó en distintas bolsas plásticas de acuerdo al número de tratamientos (5) y se le aplicó el reactivo en cantidades correspondientes (metodología 4.2.2 y figura 2).

Luego de 4 días en la cámara de crecimiento, las plántulas se trasladaron a la sala de trabajo para su traspaso a los potes de ensayo (una plántula por pote), los que fueron previamente lavados en solución ácida (metodología 4.2.1). Estos potes contenían uno de los 2 sustratos de trabajo:

- a) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5g/L.
- b) Tierra de hoja comercial (previamente tamizada).

en un volumen adecuado para la siembra de las plántulas, cubriendo aproximadamente el 90% del pote, lo que equivale a 80 ml aproximadamente.

METODOLOGÍA

Figura 1. Generación de plántulas de *Noticastrum sericeum* en cámara de crecimiento.

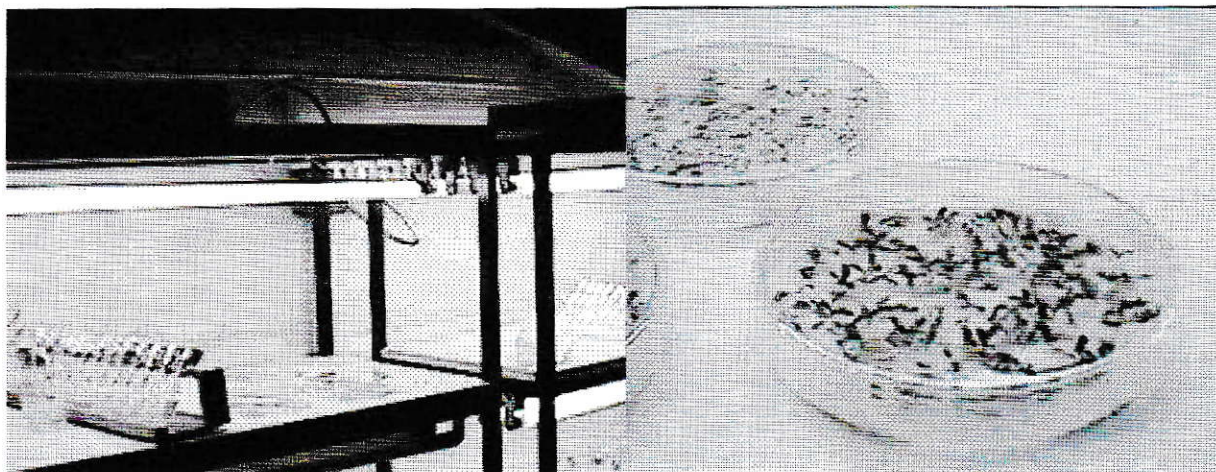
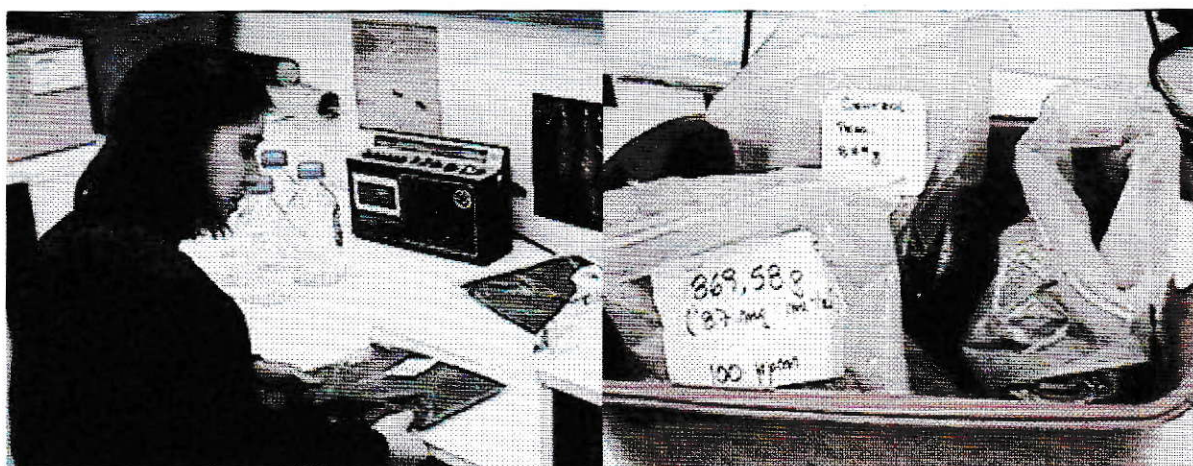


Figura 2. Enriquecimiento del sustrato sólido (tierra de hoja) con CuSO_4 y CuO .



Los potes que contenían sustrato sólido fueron perforados en la base para permitir el escurrimiento del exceso de agua de riego.

A cada uno de los 2 sustratos de crecimiento, se les aplicó previo a la plantación, los siguientes tratamientos (concentraciones teóricas):

- a) Control
- b) CuSO_4 10 mg/L o mg/kg
- c) CuSO_4 100 mg/L o mg/kg
- d) CuO 10 mg/L o mg/kg
- e) CuO 100 mg/L o mg/kg

Considerando que cada tratamiento presentaba 10 réplicas, se contaba entonces con 100 potes de estudio (50 unidades experimentales para cada tipo de sustrato).

El procedimiento adoptado en el traspaso de las plántulas desde las cápsulas de Petri a los sustratos de crecimiento, dependió del tipo de sustrato de ensayo:

- En el caso del sustrato sólido (tierra de hoja), se debe considerar que éste fue tratado con anterioridad a la siembra de las plántulas (metodología 4.2.2). Posterior al pretratamiento de la tierra de hoja, se procedió a rellenar los 50 potes ya rotulados de acuerdo al tratamiento aplicado, llenando el pote hasta un 90% de su capacidad. En esta etapa del ensayo, se evitó agregar cualquier tipo de contaminación anexa a la correspondiente al ensayo, para lo cual se utilizó guantes de látex. Una vez agregado el sustrato sólido al pote, se verificó que el volumen de éste fuese el adecuado luego de regarlo con agua desionizada. En el caso que el volumen de tierra de hoja fuese inferior a lo requerido debido al efecto de secado del sustrato sólido, se procedió a rellenar nuevamente los potes tratando de igualar la cantidad de sustrato sólido en todos estos.

Luego, se realizó la siembra de las plántulas utilizando pinzas para sostenerlas (cuidando de no dañarla) y con ayuda del dedo índice se elaboró la cavidad central (figura 3-A).

Una vez plantadas, las plántulas se llevaron al invernadero, en donde cada una de ellas (50 plántulas en sustrato sólido) fue regada cada 2 días (comenzando el

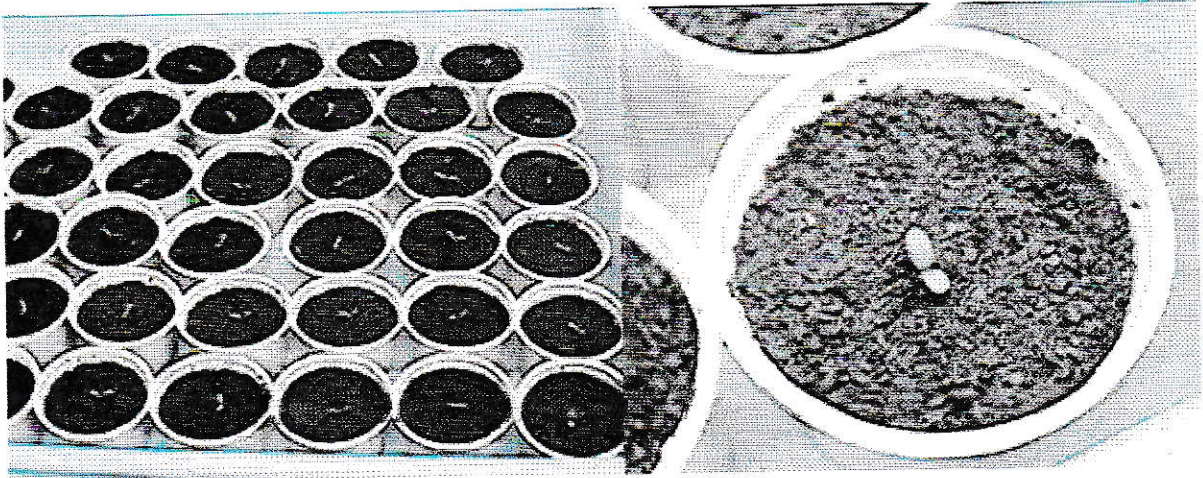
mismo día de la plantación: 31 de Agosto) con aproximadamente 33 ml de agua desionizada a pH 4,77.

- En el caso del substrato líquido (solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L), se utilizó el mismo tipo de potes que en el substrato sólido, aunque de color distinto. En el presente caso, se utilizó tapas flotantes de plumavit para cubrir el pote, previamente rotulado según tratamiento, con el fin de evitar las posibles pérdidas de solución por evaporación y, además, para soportar la plántula. Producto del material de las tapas utilizadas, se contó con un soporte flexible y liviano para las plántulas y se evitó casi completamente la evaporación de las soluciones, ya que el plumavit es un aislante térmico muy eficaz para este tipo de ensayos.

Una vez establecido el montaje del ensayo, se rellenó los potes con cada una de las soluciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L (metodología 4.2.3) hasta el 90% de su capacidad, para luego colocar cada plántula en el orificio central de la tapa flotante de plumavit, en la cual existía una pequeña abertura que permitía tal procedimiento. Luego de realizada esta fase del ensayo, se introdujo la tapa con la plántula en el interior del pote relleno con la respectiva solución (10 potes para cada uno de los 5 tratamientos), verificando que la plántula estuviese colocada en forma apropiada y que la tapa flotase adecuadamente en la solución (figura 3-B). Este procedimiento se realizó los días 29 y 30 de Agosto.

Figura 3. Montaje experimento en tierra de hoja comercial (A) y en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L (B).

A)



B)



Finalmente se procedió a trasladar el ensayo al invernadero (31 de Agosto), donde los potes de trabajo con las respectivas plántulas fueron mantenidos durante 22 días en el caso del sustrato líquido y 23 días en el caso del sustrato sólido (figura 4); periodo durante el cual se recambió cada 2 días los aproximadamente 80 ml de la solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L y $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L enriquecida con cobre que cada pote contenía, con el fin de mantener las concentraciones de cobre experimentales constantes. Además, se regó cada 2 días las plántulas en tierra de hoja con 33 ml de agua desionizada aproximadamente. Durante este tiempo también fue necesario verificar diariamente el estado de cada una de las plántulas de ensayo, con el fin de realizar la determinación cualitativa de los efectos producidos por el cobre sobre las plántulas.

El invernadero donde se mantuvo el ensayo, cuenta con un sistema de automatización de la temperatura, humedad y del fotoperiodo. Este lugar se caracteriza por proporcionar un fotoperiodo de 12 horas de luz (principalmente natural, complementada con luz artificial emanada de tubos fluorescentes que proporcionan radiación fotosintética de 15W y 35 lux) y 12 horas de oscuridad; además, cuenta con sistema de aire acondicionado automatizado para regular la temperatura (la cual varió entre 18 a 25°C diariamente, durante el presente ensayo), con un humidificador (A fhoenix manufacturing. Hidro-cooling) para controlar la humedad relativa, la cual permaneció alrededor de un 50% durante el periodo de ensayo y, con un ventilador para homogeneizar el aire interior, en cuanto a su temperatura y humedad.

La ordenación de los potes de experimentación en el invernadero fue al azar, para evitar así que un efecto anexo al tratamiento, como exceso o deficiencia de luz, exceso o deficiencia de viento proporcionado por el ventilador, etc., fuese el causante de la muerte de la totalidad de las réplicas (10) de un dado tratamiento. O sea, la disposición aleatoria de cada una de las réplicas aseguró que los efectos morfofisiológicos que presentaron las plántulas se debieran principalmente a un efecto del tratamiento aplicado. Una vez en el invernadero, el ensayo se desarrollo bajo condiciones adecuadas de crecimiento y resistencia para las plantas.

Figura 4. Mantenimiento del ensayo en invernadero bajo condiciones ambientales controladas.



Una vez transcurridos los 22 días (en el caso de las plántulas en sustrato líquido) y los 23 días (en el caso de las plántulas en sustrato sólido), se procedió a realizar la cosecha de las plántulas de estudio (figura 5-A). Para la cosecha de las plántulas crecidas en sustrato sólido, se utilizó una espátula con el fin de extraer cuidadosamente la tierra de hoja circundante a la raíz, procurando de no arrancar las raíces secundarias de las plántulas.

Fue necesario tener extrema precaución en extraer la totalidad de las raíces de las plántulas desde el sustrato sólido, ya que algunas de sus ramificaciones tendieron a desprenderse de la raíz principal, pudiendo provocar grandes errores en los análisis estadísticos por alteración en el número de ramificaciones y en la productividad de la raíz.

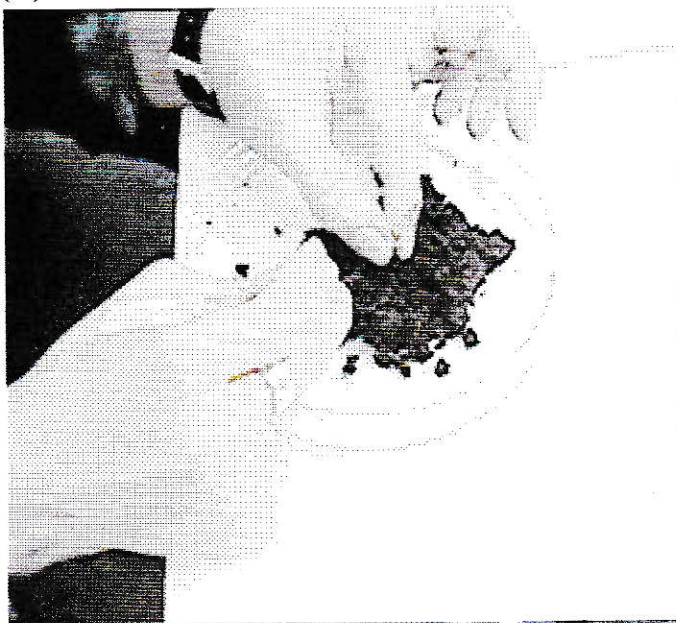
La tierra de hoja recolectada de cada uno de los potes de ensayo fue introducida en bolsas plásticas selladas y debidamente identificadas según el tratamiento aplicado a este sustrato para su posterior análisis fisicoquímico. Con respecto a las plántulas en solución, solo se extrajo cuidadosamente la raíz del orificio central de cada tapa flotante de plumavit, ya que en este caso, la raíz se encontraba libre de partículas que pudiesen entorpecer su cosecha.

Posteriormente, se procedió a lavar las plántulas según metodología EPA (metodología 4.2.5 y figura 5-B) para así extraer cualquier partícula que haya quedado atrapada entre las raíces, especialmente en el caso de las plántulas crecidas en sustrato sólido. Luego, se realizó la determinación de las variables respuesta (figura 5-C), las cuales se indican a continuación:

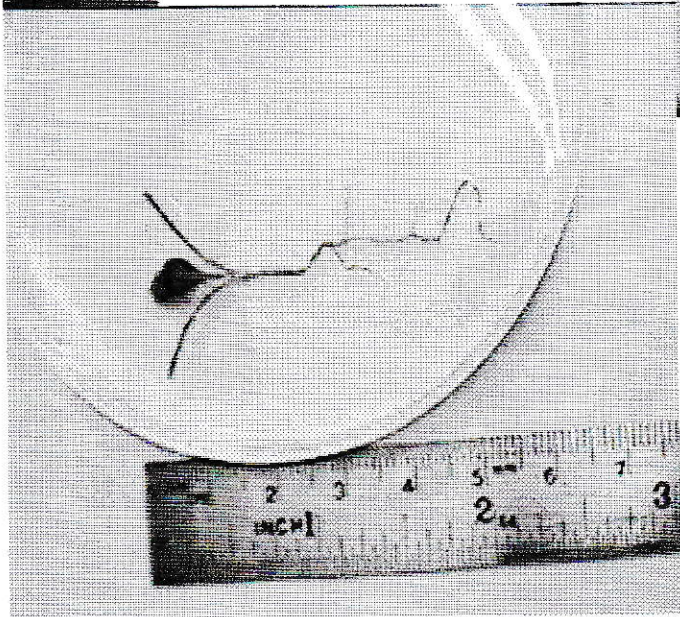
- Longitud de raíz principal.
- Longitud del cotiledón.
- Número de ramificaciones o producción de raíces secundarias.
- Producción o número de hojas nuevas.
- Productividad de raíces (biomasa en peso seco).
- Productividad de vástagos (biomasa en peso seco).

Figura 5. Cosecha de las plántulas (A), lavado (B) y cuantificación de variables respuesta (C).

(A)



(B)



(C)

Por último, las plántulas se separaron en su vástago y raíz, se empaquetó cada una de las estructuras vegetales en sobres debidamente sellados y rotulados para un posterior análisis químico.

4.2.5.- LAVADO DE MUESTRAS VEGETALES (METODOLOGIA EPA):

Las muestras vegetales fueron lavadas rápida y secuencialmente con el siguiente protocolo de lavado:

- Agua destilada desionizada a pH 4,77
- Solución de HCl 0,01N
- Agua destilada desionizada a pH 4,77
- Solución de EDTA 0,05M
- Agua destilada desionizada a pH 4, 77 (mínimo 2 veces).

4.2.6.- METODOLOGIA DE ANALISIS ESTADISTICO:

Los análisis estadísticos realizados en esta etapa del estudio, se basaron en la comparación de los datos obtenidos entre los distintos tratamientos realizados, utilizando Análisis de Varianza (Andeva) de una vía. Se empleó *a posteriori* la prueba HSD (“honest significant difference”) de Tukey (Steel & Torrie, 1985). Para llevar a cabo estos análisis, se empleó el paquete estadístico Statistica para Windows (StatSoft, 1993).

4.3.- PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS:

4.3.1.- OBSERVACIONES VISUALES (Determinación cualitativa):

Las determinaciones cualitativas realizadas a cada una de las plántulas sometidas a ensayo, se efectuaron de acuerdo al sustrato de crecimiento. Por tal motivo, los análisis de los resultados obtenidos en esta etapa del estudio se plantean según los efectos visibles producidos por el cobre en plántulas crecidas en sustrato sólido y en sustrato líquido.

4.3.1.1.- Efectos visibles en plántulas crecidas en sustrato sólido:

Los efectos morfofisiológicos visibles que produjo el cobre en las plántulas mantenidas en sustrato sólido, se muestran en la tabla 7, la cual señala el comportamiento diario de las plántulas con respecto al estado de sus cotiledones.

En la tabla 7, se observa que el cobre no produjo efectos substanciales sobre las plántulas cultivadas en sustrato sólido, independiente de la forma química y dosis de cobre adicionada, evidenciándose un desarrollo normal de estas plántulas. Tales resultados se debieron probablemente a que el cobre se complejó fuertemente con el alto contenido de materia orgánica presente en la tierra de hoja utilizada en el ensayo (de aproximadamente un 54%), comprobando la gran capacidad complejante de la carga metálica que posee este sustrato. Además, la ausencia de síntomas visibles en las plántulas mantenidas en sustrato sólido, se atribuye también a que el rango de concentración de cobre escogido para el ensayo (de 0 a 100 mg/kg), no fue suficiente como para producir efectos tóxicos en estas plántulas, sin descartar la posibilidad que a mayores concentraciones de cobre adicionadas, se produzcan efectos tóxicos en las plántulas.

Tabla 7: Comportamiento diario de las plántulas crecidas en sustrato sólido, en función del estado del vástago durante el periodo de ensayo.

Tratamiento	Días																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
control	1	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	4	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	5	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	6	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	7	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	ph	ph	ph	ph	ph	ph	ph
	8	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	9	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
	10	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
CuSO ₄ 10mg/kg	1	n	n	n	n	lm	lm	m	m	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt	mt	
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	4	n	n	n	n	n	n	n	n	lm	lm	ph	ph	ph	ph	ph	ph	ph	ph	ph	ph	ph	ph	ph	
	5	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	6	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	7	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	8	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	9	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	10	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
CuSO ₄ 100mg/kg	1	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	2	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	3	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	lm	lm	lm	lm	lm	lm	lm	lm	lm	lm	lm	lm	
	4	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	5	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	6	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	7	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	8	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	9	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
	10	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	

Al analizar la tabla 7, se observa que en el caso de las plántulas en tratamiento control-sólido, solo una de las 10 réplicas sufrió la pérdida de uno de los cotiledones a partir del día 17 de su plantación, el resto de las plántulas (90%) siguió desarrollándose normalmente. Al comparar el estado inicial de las plántulas mantenidas en el tratamiento control-sólido (figura 6 a), con el estado de estas plántulas luego de 10 días de experimentación (figura 7 a), se observa un crecimiento normal de éstas, evidenciándose incluso, la formación de nuevas hojas. Asimismo, al observar el estado de las plántulas en tratamiento control en el día de su cosecha (figura 8 a), se evidencia el crecimiento notorio y substancial de estas plántulas.

Con respecto a las plántulas sometidas a tratamiento con CuSO_4 10 mg/kg-sólido, se observa que una de las plántulas sufrió la pérdida de uno de los cotiledones a partir del día 11 del montaje del ensayo y otra de las réplicas evidenció marchitez total de los cotiledones a partir del día 5 de su plantación. Las otras 8 réplicas (80%) permanecieron inalteradas. Si se compara el estado de las plántulas sometidas a tratamiento con CuSO_4 10 mg/kg-sólido en el primer día de ensayo (figura 6 b), con el estado evidenciado por estas mismas plántulas en el décimo día de experimentación (figura 7 b), se visualiza el desarrollo normal de las plántulas, aunque con brotes de hojas más tardíos que en el caso del control. Además, al observar el estado de estas plántulas en el último día de ensayo (figura 8 b), se evidencia un gran desarrollo de las plántulas, con hojas nuevas, grandes y fuertes.

En el caso de las plántulas mantenidas en substrato sólido enriquecido con 100 mg/kg de CuSO_4 , se observa que una de las réplicas presentó una leve marchitez a partir del día 11 de su plantación. Todas las demás réplicas (90%) siguieron creciendo normalmente. Al comparar el estado inicial de las plántulas mantenidas en tratamiento con CuSO_4 100 mg/kg-sólido (figura 6 c), con el estado de estas mismas plántulas luego de 10 días de ensayo (figura 7 c), se evidencia el crecimiento normal de las plántulas en el substrato sólido, produciéndose el brote de nuevas hojas. Asimismo, al observar el estado de estas plántulas en el último día de experimentación (figura 8 c), se comprueba el alto desarrollo alcanzado.

RESULTADOS

Figura 6. Tratamientos en sustrato sólido sometidos a adiciones de 0 mg/kg (A), 10 mg/kg (B) y 100 mg/kg (C) de CuSO_4 al cabo de 1 día de experimentación.

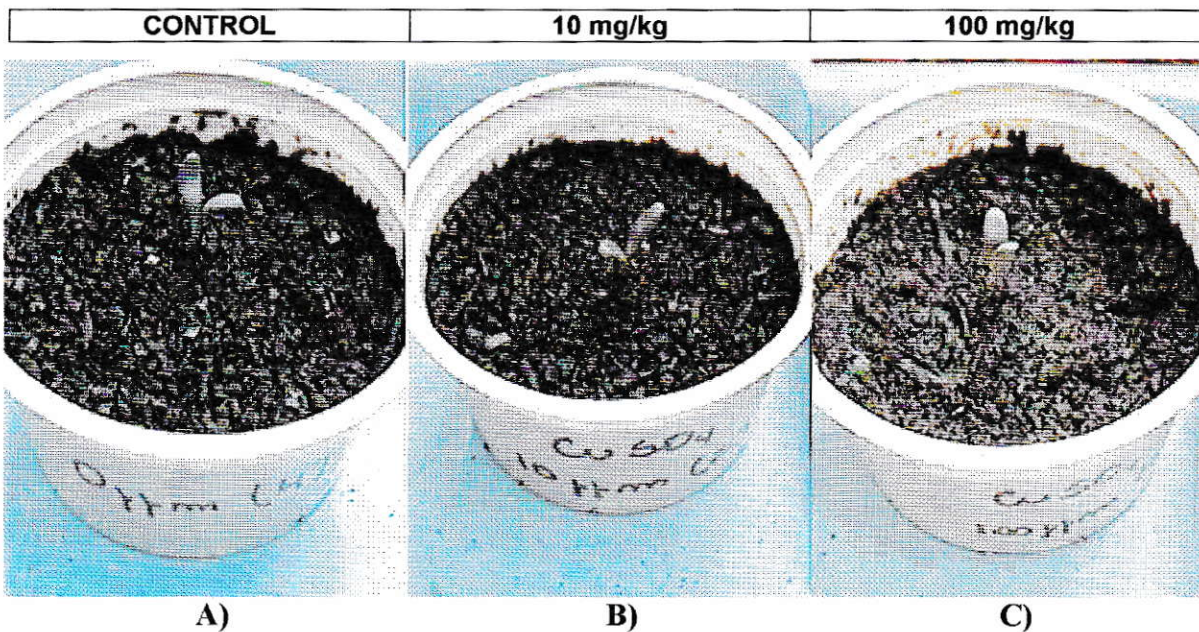


Figura 7. Tratamientos en sustrato sólido sometidos a adiciones de 0 mg/kg (A), 10 mg/kg (B) y 100 mg/kg (C) de CuSO_4 al cabo de 10 días de experimentación.

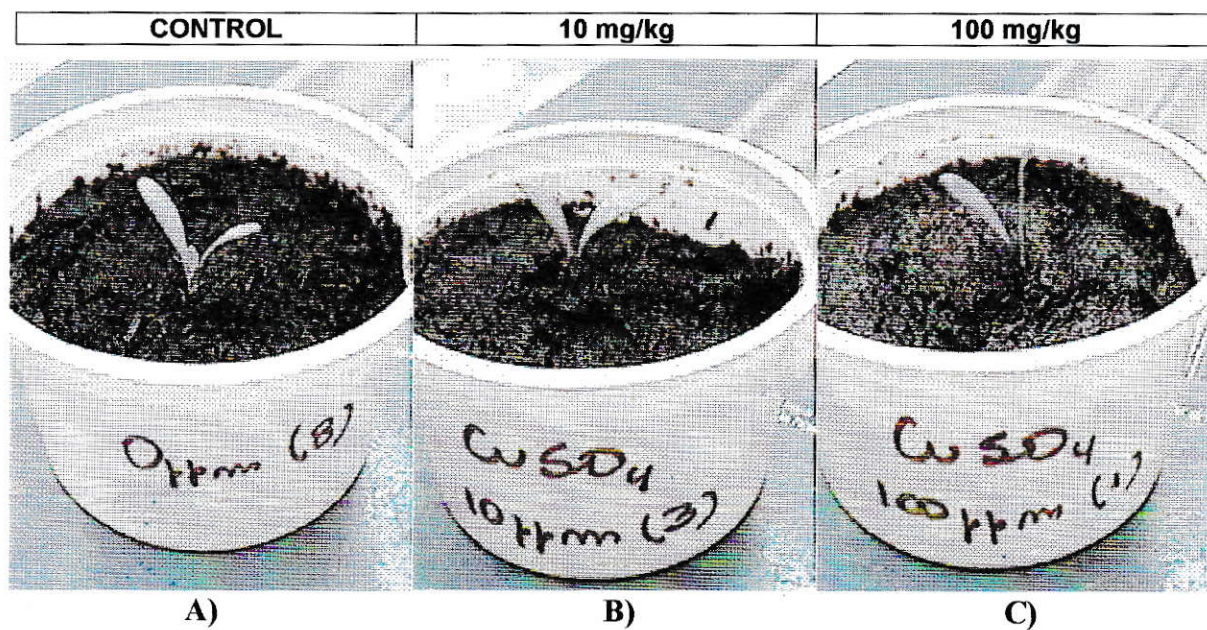
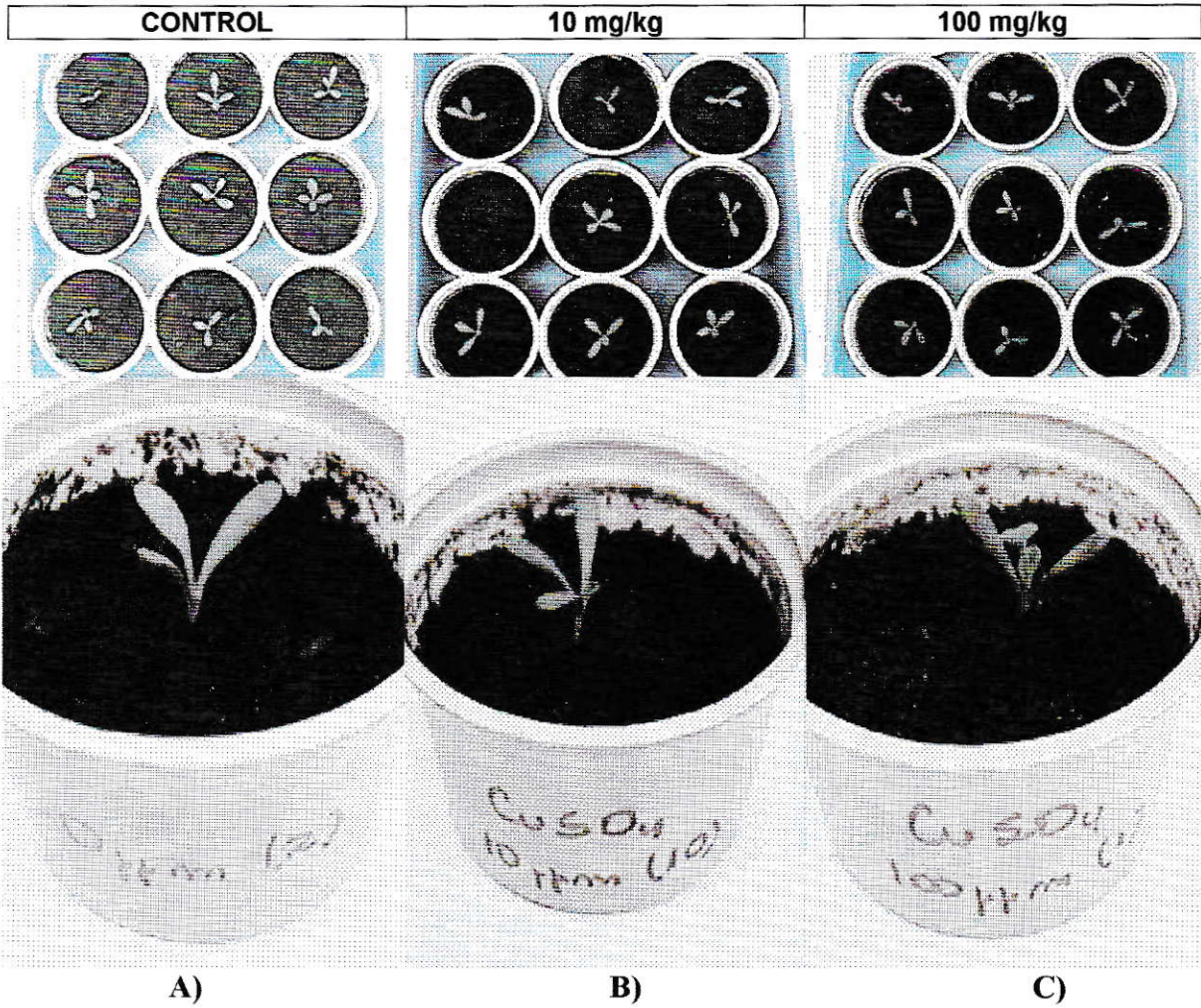


Figura 8. Tratamientos en sustrato sólido sometidos a adiciones de 0 mg/kg (A), 10 mg/kg (B) y 100 mg/kg (C) de CuSO_4 al cabo de 23 días de experimentación.



Con respecto a las plántulas sometidas a tratamiento con CuO 10 mg/kg-sólido, se observa un fenómeno muy similar al ocurrido con las plántulas mantenidas en substrato sólido enriquecido con 10 mg/kg de CuSO₄, ya que en este caso, una de las réplicas sufrió la pérdida de uno de los cotiledones a partir del día 10 y otra evidenció leve marchitez en sus cotiledones a partir del día 7 de su plantación. Las otras 8 réplicas (80%) no presentaron daño aparente. Al comparar el estado de las plántulas mantenidas en tratamiento con CuO 10 mg/kg-sólido en el día 1 del ensayo (figura 9 b), con el estado presentado por estas plántulas en el décimo día de experimentación (figura 10 b), se visualiza el desarrollo normal de las plántulas, evidenciándose brotes de hojas. De igual forma, al observar el estado de estas mismas plántulas en el día de su cosecha (figura 11 b), se evidencia el alto grado de desarrollo alcanzado por las plántulas, presentándose la formación de nuevas hojas.

Por último, en el caso de las plántulas sometidas a tratamiento con CuO 100 mg/kg-sólido, se observa que solo una de las réplicas sufrió la pérdida de un cotiledón a partir del día 11 del montaje del ensayo. Todas las demás réplicas (90%) siguieron desarrollándose normalmente. Al comparar el estado de las plántulas mantenidas en tratamiento con CuO 100 mg/kg-sólido en el primer día de ensayo (figura 9 c), con el estado de estas mismas plántulas en el día 10 de experimentación (figura 10 c), se verifica que las plántulas prosiguieron creciendo normalmente. Además, al observar el estado de las plántulas sometidas a este mismo tratamiento en el último día de ensayo (figura 11 c), se comprueba el alto nivel de desarrollo alcanzado por estas plántulas, evidenciándose la formación de hojas nuevas.

En todos los tratamientos, una o dos de las réplicas presentaron ciertas irregularidades con respecto al resto. Aunque se debe considerar que en todo material biológico vivo existe variabilidad y pérdida de réplicas debido a la manipulación de ellas. No obstante, la pérdida de réplicas observada en algunos tratamientos no afectó las apreciaciones visuales generales del ensayo.

Figura 9. Tratamientos en sustrato sólido sometidos a adiciones de 0 mg/kg (A), 10 mg/kg (B) y 100 mg/kg (C) de CuO al cabo de 1 día de experimentación.

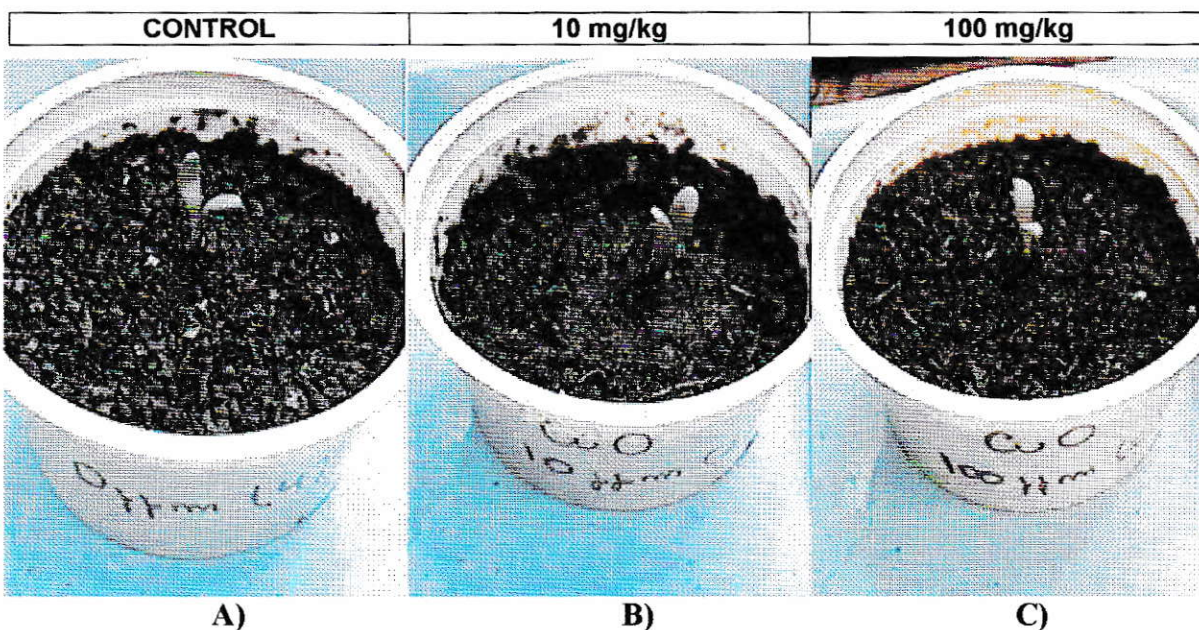


Figura 10. Tratamientos en sustrato sólido sometidos a adiciones de 0 mg/kg (A), 10 mg/kg (B) y 100 mg/kg (C) de CuO al cabo de 10 días de experimentación.

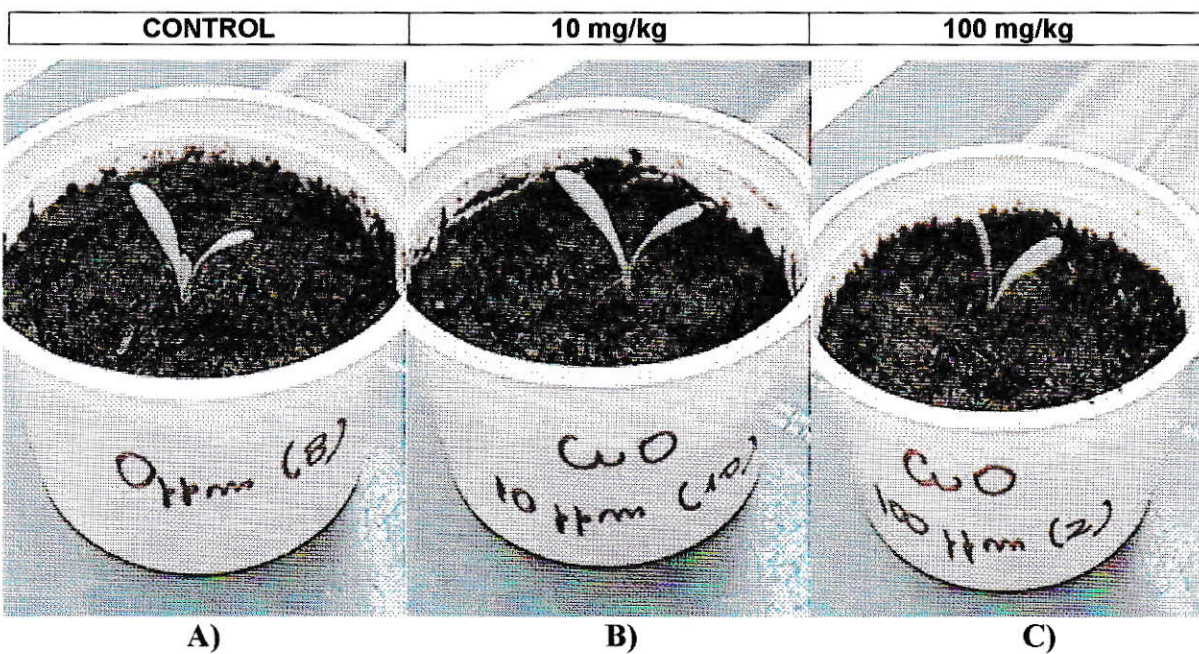
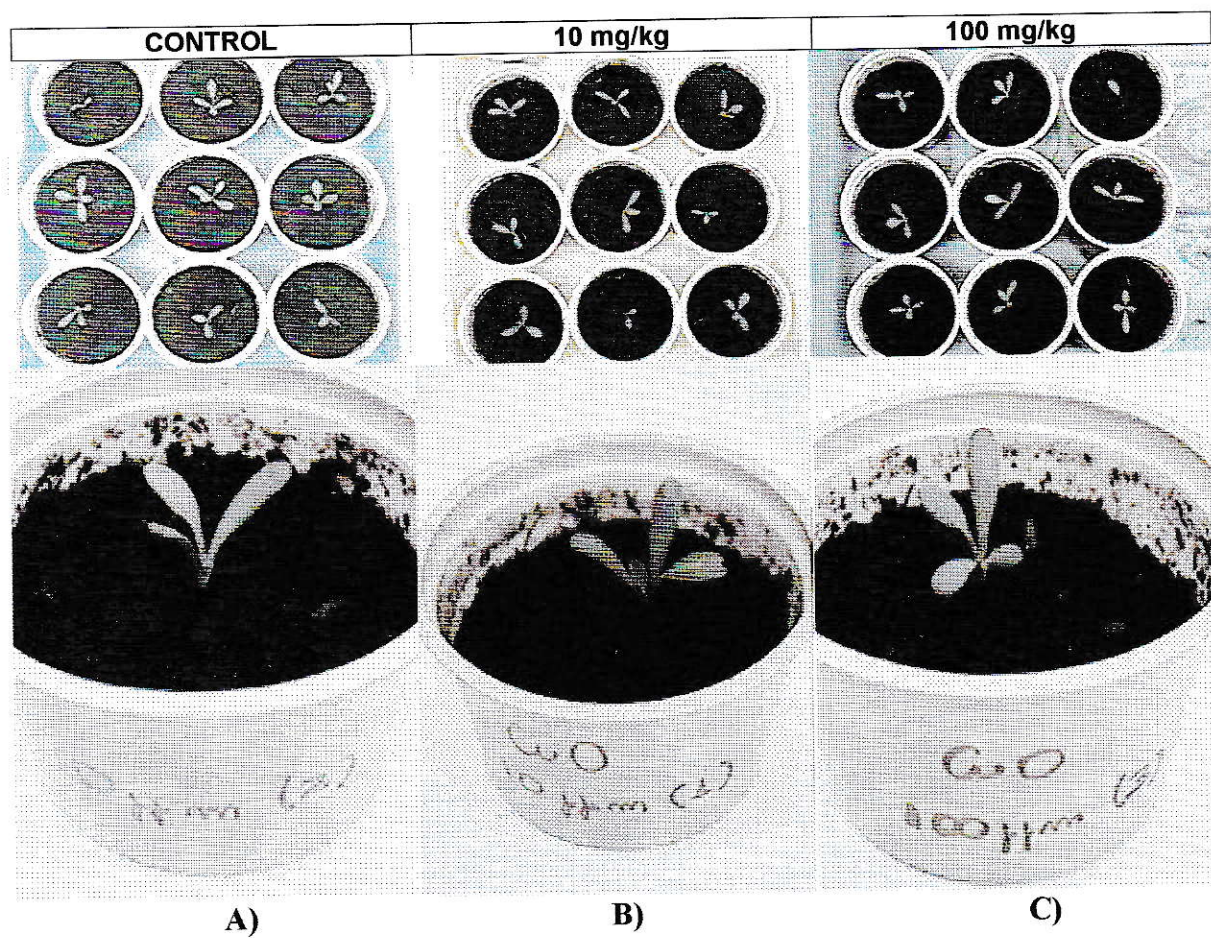


Figura 11. Tratamientos en sustrato sólido sometido a adiciones de 0 mg/kg (A), 10 mg/kg (B) y 100 mg/kg (C) de CuO al cabo de 23 días de experimentación.



Además de los factores mencionados anteriormente, la ausencia de síntomas fitotóxicos producidos por el cobre sobre las plántulas cultivadas en sustrato sólido, pudo deberse también a una posible lixiviación del cobre producida por los continuos riegos realizados durante el ensayo, lo cual reduciría la biodisponibilidad del cobre para las plántulas. No obstante, la leve heterogeneidad de los resultados obtenidos no fue significativa como para atribuirla a ciertos factores.

4.3.1.2.- Efectos visibles en plántulas mantenidas en sustrato líquido:

Como se mencionó anteriormente, en el presente ensayo se utilizó una solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L como sustrato líquido de crecimiento, con el fin de simular la composición química más básica de la solución suelo. La solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ no aporta ningún tipo de nutrientes a la planta (con excepción del Ca^{+2}), pero se debe tener en cuenta que las plántulas poseen una cierta cantidad de nutrientes en los cotiledones, mantenidos desde el estado de semilla. Aunque estos nutrientes almacenados no son suficientes para permitir un desarrollo normal de las plantas, estos permitieron la mantención y el leve crecimiento de las plántulas durante el período en el que se desarrolló los ensayos experimentales. Además, para los objetivos de este estudio, no se requería un crecimiento exagerado de la planta, puesto que el ensayo fue planteado para observar los efectos provocados por el cobre en el corto plazo.

Si se hubiese utilizado solución nutritiva como sustrato líquido, se hubiese tenido un sustrato químicamente complejo, en el que posiblemente se produciría una competencia entre los iones pertenecientes a la solución nutritiva y los iones Cu^{+2} adicionados en el ensayo, alterando la biodisponibilidad de iones cobre en el sistema y, por ende, los efectos de toxicidad producidos por el cobre en las plántulas.

Los resultados de las observaciones visuales realizadas a cada una de las plántulas mantenidas en sustrato líquido, se presentan en la tabla 8, la cual señala

el comportamiento diario experimentado por las plántulas con respecto a los efectos tóxicos producidos por el cobre, tanto en raíces como en vástagos.

La exposición al cobre de las plántulas mantenidas en substrato líquido, resultó en la marchitez de los cotiledones y en la necrosidad de la raíz principal, especialmente en aquellas plántulas mantenidas en soluciones enriquecidas con CuSO_4 .

En la tabla 8, se observa que en el caso de las plántulas sometidas a tratamiento control-líquido, 4 de las 10 réplicas presentaron daño morfofisiológico visible; el resto de las plántulas (60%) se desarrollaron normalmente. A pesar de lo anterior, las raíces de todas las réplicas se visualizaron sin daño alguno. Al comparar el estado de las plántulas mantenidas en tratamiento control-líquido en el primer día de experimentación (figura 12 a), con el estado de estas plántulas en el décimo día de ensayo (figura 13 a), se observa el escaso crecimiento experimentado por las plántulas, ya que solo algunas réplicas presentaron el brote de nuevas hojas. Al comprobar el estado de estas mismas plántulas en el último día de ensayo (figura 14 a), se visualiza que los cotiledones de estas plántulas no exhibieron aumento de tamaño, en cambio, sus raíces presentaron un aumento en longitud. Los efectos morfofisiológicos evidenciados por 4 de las 10 réplicas pudieron deberse a un posible efecto del calcio presente en la solución, o bien, a deficiencias en las condiciones de ensayo o a la variabilidad natural de la especie. Por lo tanto, no es posible establecer certeramente el origen de tales efectos.

Tabla 8: Comportamiento diario de las plántulas mantenidas en sustrato líquido, en función del estado de la raíz y del vástago durante el ensayo.

Tratamiento		Día																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
control	1	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	
	2	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	m/rn	
	3	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	m/rn	m/rn	m/rn	m/rn	mt/rn
	4	n/rn	n/rn	n/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	lm/rn	m/rn	m/rn	m/rn	m/rn	m/rn	m/rn	m/rn	m/rn	mt/rn	mt/rn	mt/rn	mt/rn	mt/rn	mt/rn
	5	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn
	6	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn
	7	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn
	8	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn
	9	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	lm/rn
	10	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	n/rn	lm/rn	m/rn	m/rn
CuSO ₄ 10mg/L	1	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rs	m/rs	m/rs	m/rs	m/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	
	2	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	m/rc	m/rs	m/rs	m/rs	mt/rs
	3	n/rn	n/rn	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	m/rc	m/rc	m/rc	mt/rc	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs
	4	n/rn	n/rn	n/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rs	m/rs	m/rs	m/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs
	5	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	lm/rc	m/rc	m/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs
	6	n/rn	n/rn	n/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	m/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs
	7	n/rn	n/rn	n/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	m/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs
	8	n/rn	n/rn	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	m/rc	m/rc	m/rc	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs
	9	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	lm/rc	lm/rc	m/rc	m/rc	m/rs	m/rs	m/rs	m/rs	m/rs	m/rs	m/rs	m/rs
	10	n/rn	n/rn	lm/rc	lm/rc	lm/rc	m/rc	m/rc	m/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs
CuSO ₄ 100mg/L	1	n/rn	lm/rc	m/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	
	2	n/rn	lm/rc	m/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	
	3	n/rn	lm/rc	m/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	
	4	n/rn	lm/rc	m/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs
	5	n/rn	lm/rc	m/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs
	6	n/rn	lm/rc	m/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs
	7	n/rn	lm/rc	m/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs
	8	n/rn	lm/rc	m/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs
	9	n/rn	lm/rc	m/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs
	10	n/rn	lm/rc	m/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rc	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs	mt/rs

CuO 10mg/L	1	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc		
	2	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc		
	3	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	
	4	n/rn	n/rn	n/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	
	5	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	
	6	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc
	7	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc
	8	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc
	9	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc
	10	n/rn	n/rn	n/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc
CuO 100mg/L	1	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	
	2	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	
	3	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/sr	n/sr	n/sr	n/sr	n/sr	n/sr	n/sr	n/sr	n/sr	n/sr	n/sr	n/sr
	4	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc
	5	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rs
	6	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc
	7	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rc	m/rs
	8	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rc	lm/rs	lm/rs	lm/rs	lm/rs
	9	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rs	n/rs	n/rs
	10	n/rn	n/rn	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	n/rc	lm/rc	lm/rs	lm/rs

Terminología:

n: vástago normal.

lm: leve marchitez del vástago.

m: marchitez del vástago.

mt: marchitez total del vástago.

rn: raíz normal.

rc: raíz con inicio de necrosis.

rs: raíz totalmente necrótica.

sr: pérdida de raíz.

Además, en la tabla 8 se observa que en el caso de las plántulas mantenidas en solución enriquecida con 10 mg/L de CuSO_4 , la totalidad de las réplicas (100%) evidenció marchitez total de los cotiledones, la cual comenzó a manifestarse a partir del tercer y cuarto día del montaje del ensayo; además, se evidenció necrosidad de la raíz en la totalidad de las plántulas. Al verificar el estado de las plántulas mantenidas en tratamiento con CuSO_4 10 mg/L-líquido en el día 1 del ensayo (figura 12 b), se observa el inicio de necrosis en las raíces de las plántulas y algunos vástagos marchitos. Además, al examinar el estado de estas plántulas en el décimo día de ensayo (figura 13 b), se comprueba la muerte total del tejido vegetal, debido a la excesiva dosis de cobre a la que fueron expuestas estas plántulas, evidenciándose también, atrofia de las raíces y un engrosamiento notorio de éstas estructuras. Asimismo, al comprobar el estado de las plántulas sometidas a este tratamiento en el día de su cosecha (figura 14 b), se observa que las plántulas continuaron totalmente necróticas, debido a que esta situación es irreversible.

Por su parte, en la tabla 8 se observa que la totalidad de las réplicas (100%) de las plántulas mantenidas en solución enriquecida con 100 mg/L de CuSO_4 , presentaron marchitez total de los cotiledones y necrosis en la raíz, evidenciándose ambas respuestas desde el segundo día del montaje del ensayo aproximadamente. Al verificar el estado de las plántulas sometidas a tratamiento con CuSO_4 100 mg/L-líquido en el día 1 del experimento (figura 12 c), se observa que la totalidad de las plántulas se encontraban muy marchitas en comparación al resto de los tratamientos, evidenciándose cierta marchitez del vástago e inicio de necrosidad en la raíz. Al examinar el estado de estas plántulas en el día 10 de experimentación (figura 13 c), se observa la elevada toxicidad causada por los altos niveles de cobre sobre estas plántulas, ya que la marchitez de los vástagos y la necrosidad de las raíces se acentuaron aún más, alcanzándose la muerte total de las plántulas. Asimismo, al verificar el estado de estas plántulas en el último día de experimentación (figura 14 c), se observa que las plántulas continuaron totalmente necróticas.

Figura 12. Tratamientos en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L sometida a adiciones de 0 mg/L (A), 10 mg/L (B) y 100 mg/L (C) de CuSO_4 al cabo de 1 día de experimentación.

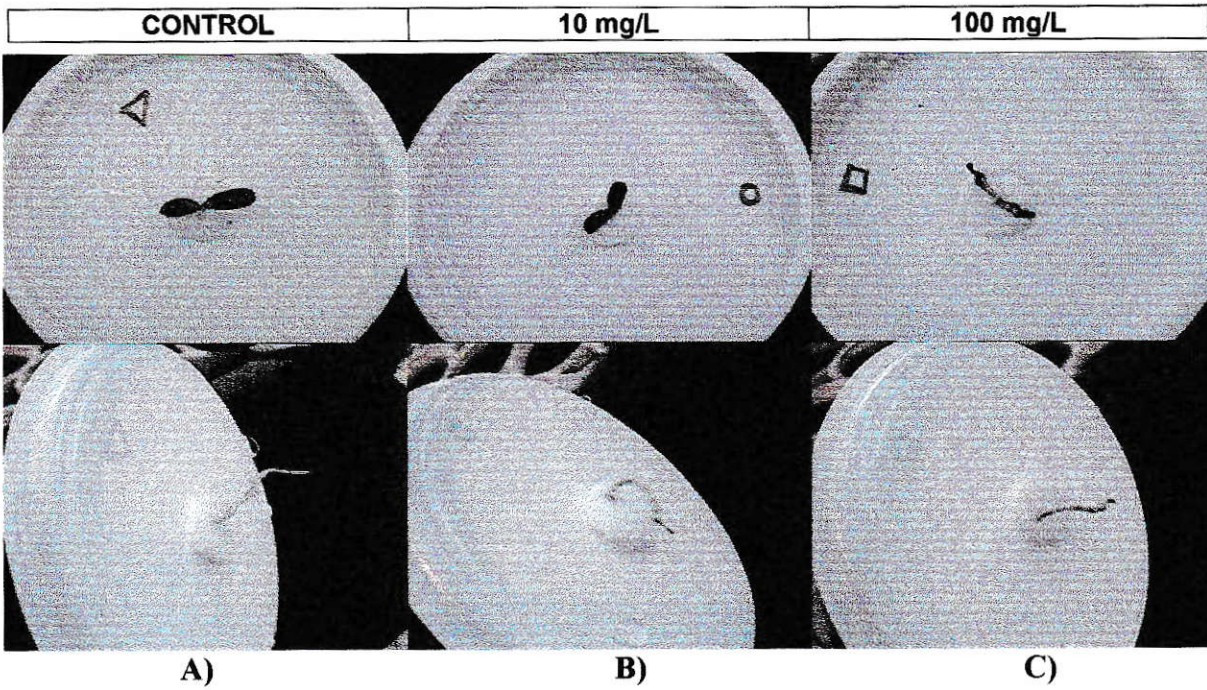


Figura 13. Tratamientos en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L sometida a adiciones de 0 mg/L (A), 10 mg/L (B) y 100 mg/L (C) de CuSO_4 al cabo de 10 días de experimentación.

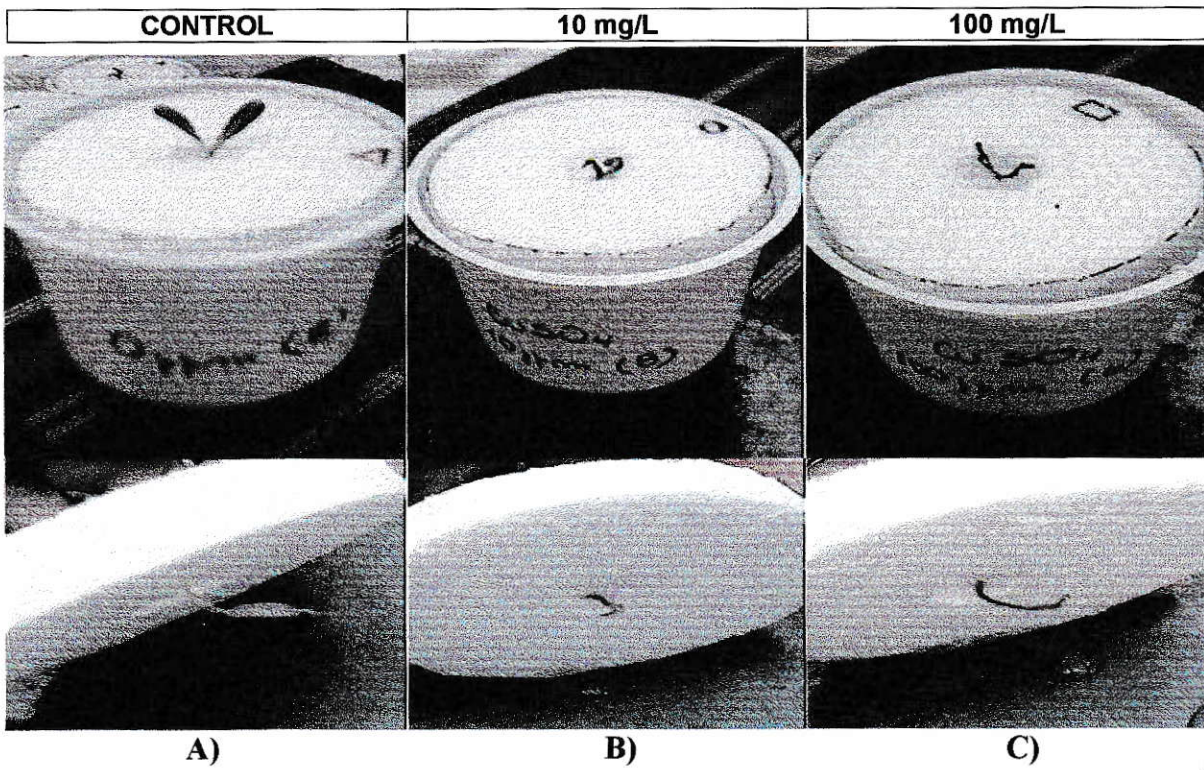
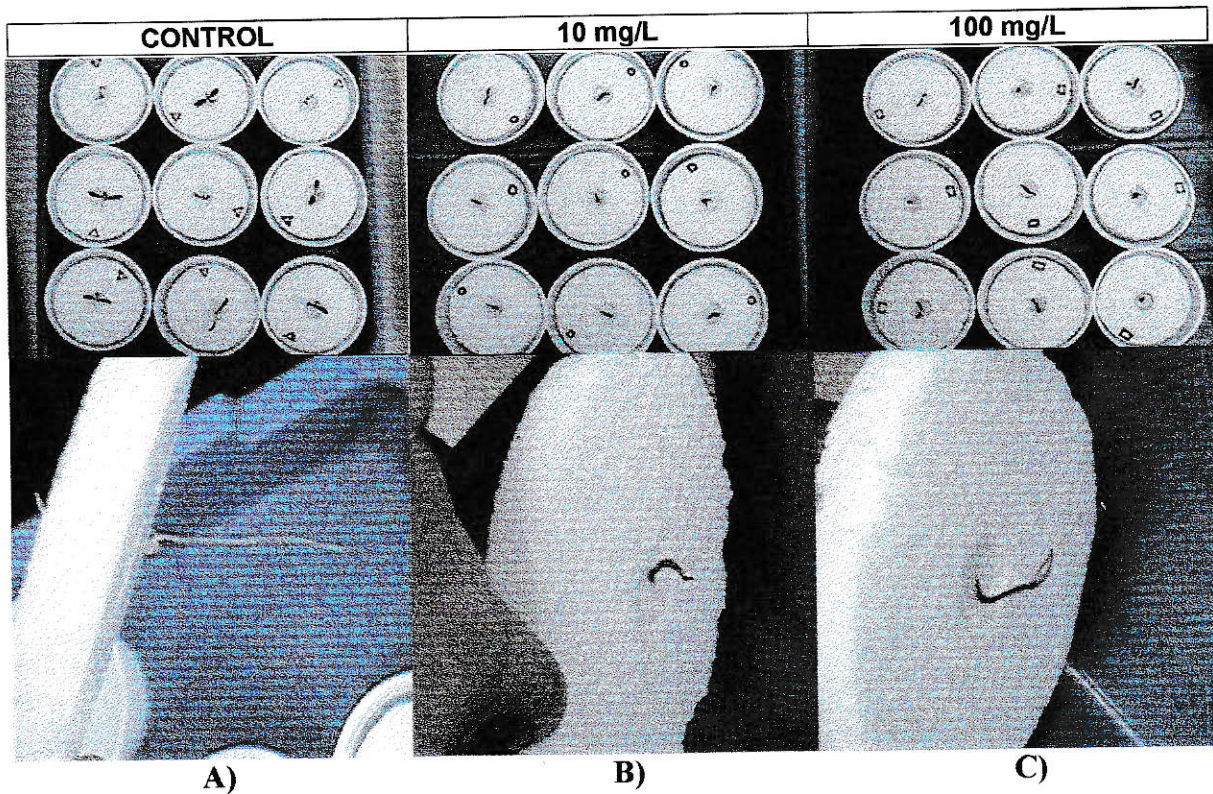


Figura 14. Tratamientos en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L sometida a adiciones de 0 mg/L (A), 10 mg/L (B) y 100 mg/L (C) de CuSO_4 al cabo de 22 días de experimentación.



Con respecto a las plántulas mantenidas en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L enriquecida con 10 mg/L de CuO, se observa que sólo 3 de las réplicas evidenciaron daños morfofisiológicos visibles en los vástagos producto de la adición de cobre. Las réplicas restantes (70%) no presentaron daño alguno en sus cotiledones. La totalidad de las réplicas, presentó raíces con inicio de necrosis, la cual se evidenció desde el segundo día del montaje. Al observar el estado de las plántulas sometidas a tratamiento con CuO 10 mg/L-líquido en el día inicial del ensayo (figura 15 b), no se visualizan daños en estas plántulas. Además, al comprobar el estado de estas plántulas en el décimo día de experimentación (figura 16 b), se observa que las plántulas no se han desarrollado en absoluto, manteniendo el mismo tamaño de inicio, aunque se observó un inicio de necrosidad en la raíces y un leve engrosamiento de estas estructuras. Por consiguiente, al verificar el estado de estas mismas plántulas en el último día de experimentación (figura 17 b), se observa una total necrosidad de las raíces, lo cual no afectó mayormente a los vástagos.

Por último, en la tabla 8 se observa que de las 10 réplicas mantenidas en solución enriquecida con 100 mg/L de CuO, 5 presentaron síntomas visibles producto de la adición de cobre. El 50% restante, no presentó ningún daño morfofisiológico visible. Con respecto a las raíces, se observa que la mayor parte de las réplicas presentaron raíces totalmente necróticas, las cuales no se asociaron necesariamente con los daños evidenciados en los cotiledones. Al examinar el estado de las plántulas sometidas a tratamiento con CuO 100 mg/L-líquido en el primer día de ensayo (figura 15 c), se visualiza un inicio de necrosidad en las puntas de algunas raíces, sin afectar a los vástagos. Consecuentemente, al comprobar el estado de estas plántulas en el día 10 del ensayo (figura 16 c), se observa que las plántulas no han continuado afectándose mayormente, manteniendo la leve necrosidad en las puntas de las raíces y vástagos inalterados. Sin embargo, al verificar el estado de estas mismas plántulas en el último día de experimentación (figura 17c), se observa que la necrosidad de las raíces ha aumentado, afectando a algunos vástagos de las plántulas.

Figura 15. Tratamientos en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L sometida a adiciones de 0 mg/L (A), 10 mg/L (B) y 100 mg/L (C) de CuO al cabo de 1 día de experimentación.

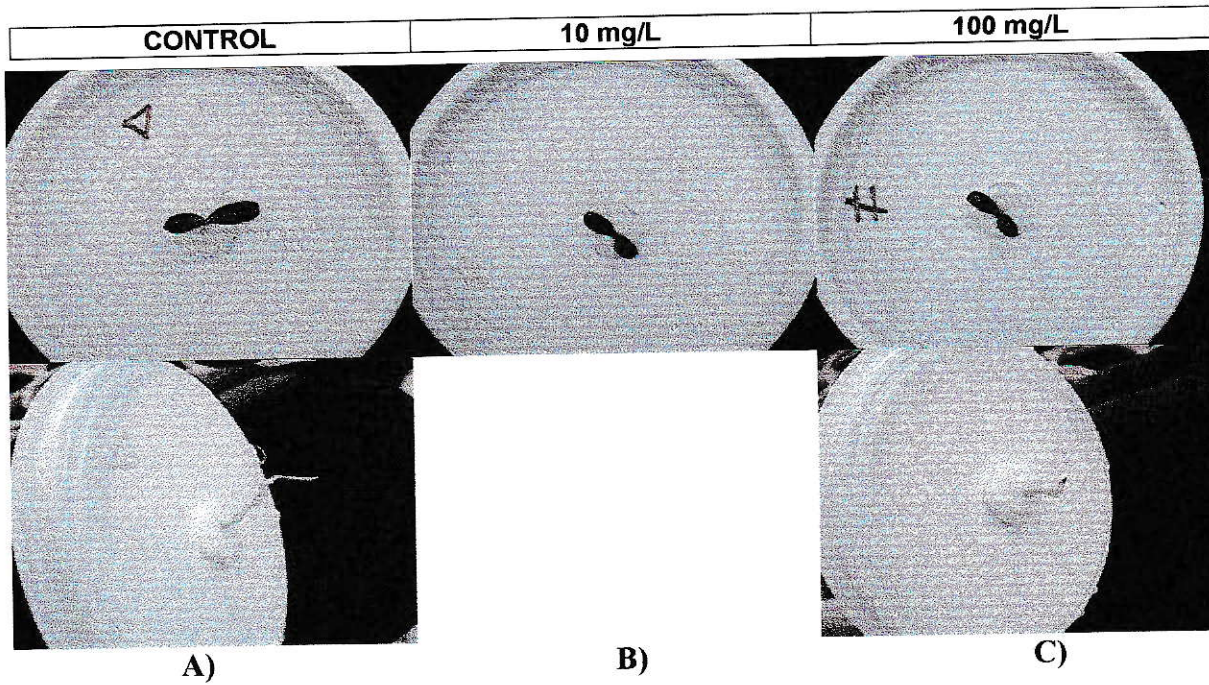


Figura 16. Tratamientos en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L sometida a adiciones de 0 mg/L (A), 10 mg/L (B) y 100 mg/L (C) de CuO al cabo de 10 días de experimentación.

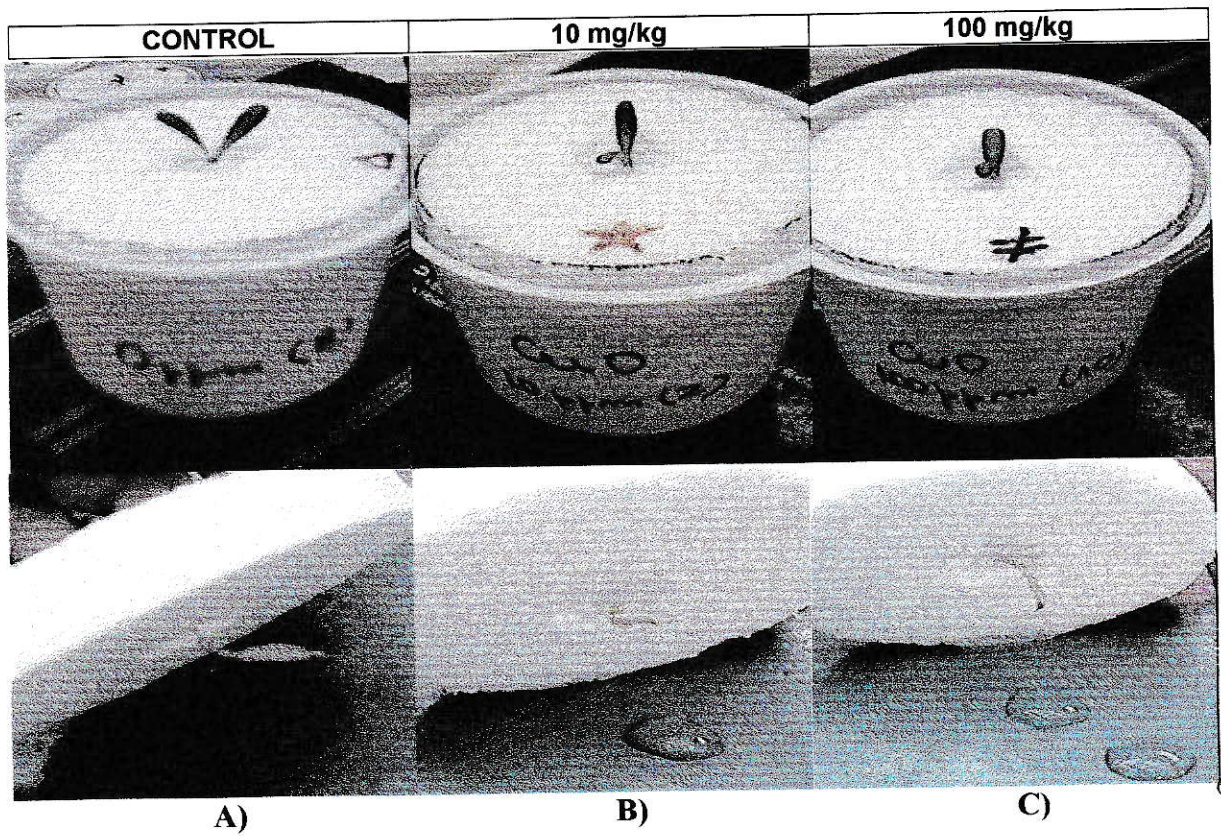
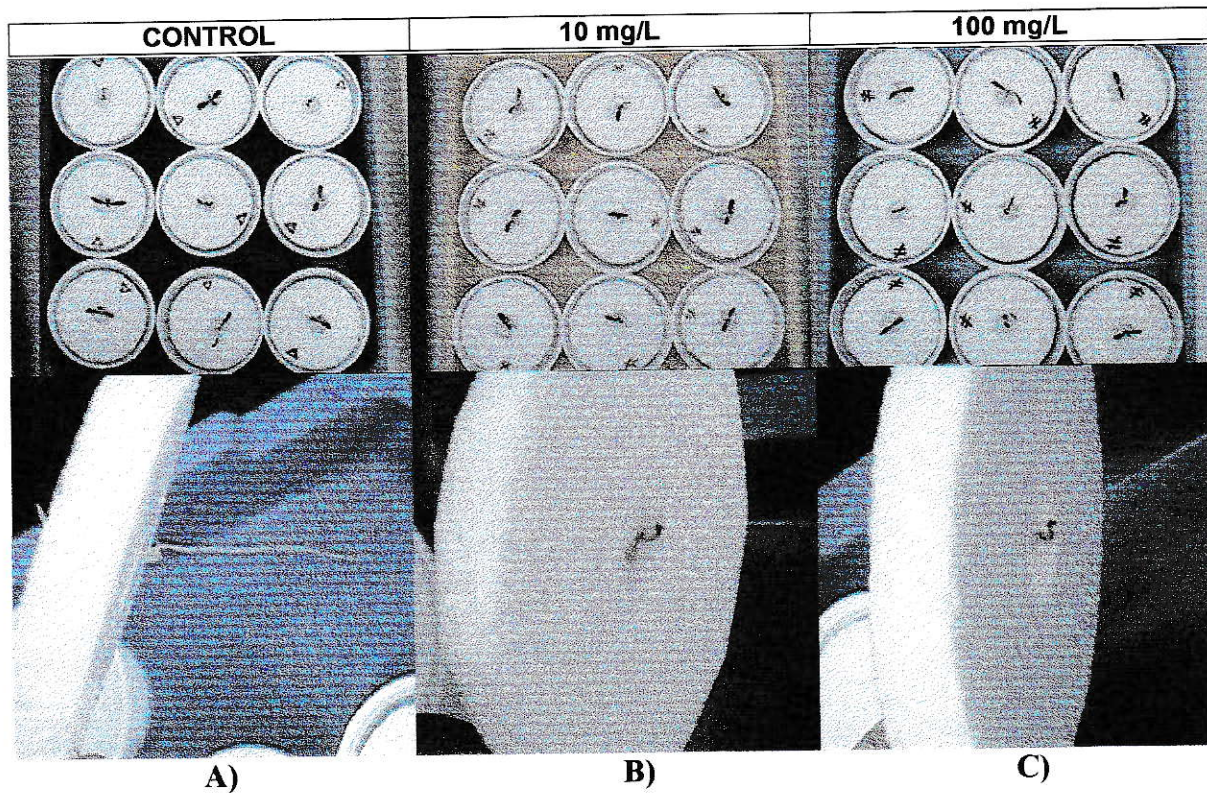


Figura 17. Tratamientos en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L sometida a adiciones de 0 mg/L (A), 10 mg/L (B) y 100 mg/L (C) de CuO al cabo de 22 días de experimentación.



Los efectos tóxicos producidos por el cobre sobre las plántulas mantenidas en solución, fueron substancialmente superiores a los producidos en las plántulas cultivadas en substrato sólido. Tales resultados, pueden ser atribuibles a la mayor biodisponibilidad del cobre en el medio líquido. En el substrato sólido, gran parte de este elemento habría sido complejado por la gran cantidad de materia orgánica presente, por lo tanto, no se encontraría directamente disponible para la planta.

La toxicidad del cobre es mayor en aquellas plántulas sometidas a adiciones de CuSO_4 que de CuO , lo cual se atribuye a la mayor solubilidad en agua que este primer compuesto de cobre posee.

4.3.2.- SOBREVIVENCIA DE LAS PLANTULAS (determinación cuantitativa):

Otro modo de visualizar los efectos producidos por el cobre sobre las plántulas de *Noticastrum sericeum* mantenidas en los 2 tipos de substratos de crecimiento, es mediante el conocimiento del periodo de sobrevivencia de las plántulas sometidas a ensayo a contar del primer día del montaje del ensayo, recordando que la cosecha de estas plántulas se realizó luego de 22 días (en el caso de las plántulas mantenidas en solución) y de 23 días (en el caso de las plántulas mantenidas en substrato sólido) de experimentación (tabla 9).

Tabla 9: Sobrevivencia (días) de las plántulas de *N. sericeum* tratadas con CuSO_4 y con CuO , utilizando como substrato soporte solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L y tierra de hoja comercial.

Conc. Teórica del Cu en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L	Sobrevivencia de las plántulas (días \pm SD)	Conc. Teórica del Cu en substrato sólido (tierra de hoja)	Sobrevivencia de las plántulas (días \pm SD)
Control	20,2 \pm 3,79	Control	23,0 \pm 0,00
CuSO_4 10 mg/L	10,3 \pm 3,97	CuSO_4 10 mg/kg	21,4 \pm 5,06
CuSO_4 100 mg/L	3,00 \pm 0,00	CuSO_4 100 mg/kg	23,0 \pm 0,00
CuO 10 mg/L	19,0 \pm 6,32	CuO 10 mg/kg	23,0 \pm 0,00
CuO 100 mg/L	20,7 \pm 2,11	CuO 100 mg/kg	23,0 \pm 0,00

Como muestra la tabla 9, la mayor parte de las plántulas mantenidas en sustrato sólido sobrevivieron normalmente a las condiciones expuestas por el tratamiento. Solo una de las 10 réplicas sometidas a tratamiento con CuSO_4 10 mg/kg murió, lo cual pudo deberse a un problema de falta de homogeneización del compuesto de cobre en el sustrato sólido, conduciendo a que existiesen zonas con una mayor concentración de cobre; o bien, se debió a deficiencias en el trasplante, a deficiencias en las condiciones ambientales óptimas para el desarrollo de la plántula, lo cual se contempló al ubicar azarosamente las réplicas en el invernadero, o a la variabilidad natural de la especie de ensayo.

Contrariamente a lo ocurrido con las plántulas en sustrato sólido, las plántulas mantenidas en solución se vieron bastante afectadas por la carga metálica adicionada, especialmente aquellas plántulas sometidas a adiciones de 100 mg/L de CuSO_4 , estableciéndose que el estrés metálico al cual fueron sometidas las plántulas en solución, fue suficiente como para que todas las réplicas de un mismo tratamiento presentaran necrosis total.

Al igual que en el caso de las plántulas cultivadas en sustrato sólido, las respuestas morfofisiológicas evidenciadas en las plántulas en tratamiento control-líquido se atribuyen a deficiencias en el transplante y/o en las condiciones ambientales óptimas para el desarrollo de las plantas, a la variabilidad natural de la especie de planta utilizada, a una escasez de nutrientes, o probablemente a la presencia de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

4.3.3.- MEDICION DE VARIABLES RESPUESTA (determinación cuantitativa):

Los efectos morfológicos y/o fisiológicos producidos en las plántulas mantenidas en dos tipos de sustratos de crecimiento (solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L y tierra de hoja comercial) mediante la adición de cobre en dos formas químicas distintas (CuSO_4 y CuO) y en dosis diferentes, fueron determinados mediante la medición de los siguientes parámetros:

- Longitud de raíz o crecimiento de la raíz principal.
- Producción de raíces secundarias o número de ramificaciones.
- Número de hojas nuevas producidas.
- Tamaño o longitud del cotiledón.
- Productividad de la raíz o biomasa en peso seco de raíz.
- Productividad del vástago o biomasa en peso seco de vástago.

Los valores de cada una de las variables respuesta mencionadas anteriormente, para cada una de las réplicas de cada tratamiento aplicado en el ensayo, tanto en sustrato sólido como en sustrato líquido, se muestran en la tabla 10.

Además, se realizó los análisis estadísticos correspondientes a cada uno de los parámetros determinados, mediante la aplicación de ANDEVAS de una vía. Tal procedimiento fue realizado para comprobar la existencia o ausencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Además, se aplicó *a posteriori* la prueba de HSD de Tukey, para conocer los tratamientos que mostraron diferencias significativas.

Tabla 10: Variables respuesta o parámetros cuantitativos determinados en plántulas de *N.sericeum* según tratamiento aplicado en el ensayo.

TRATAMIENTO	REPLICA	LONG. RAIZ (cm)	N° RAMIFICACIONES	N° HOJAS NUEVAS	LONG. COTILEDON (cm)	PESO SECO RAIZ (mg)	PESO SECO VASTAGO (mg)
control líquido	1	5,9	4	2H	1,1	0,960	3,150
	2	0,9	1	1H	1,0	0,260	2,010
	3	2,0	0	1H	0,9	0,450	3,000
	4	2,0	1	0	1,0	0,430	2,710
	5	2,8	0	2H	1,2	0,650	2,980
	6	4,7	3	2H	1,1	0,780	2,870
	7	2,2	9	1H	1,6	1,180	3,160
	8	2,2	5	2H	1,5	0,970	3,720
	9	2,4	2	2H	1,1	1,080	3,240
	10	4,5	3	1,5H	1,1	0,850	2,900
Promedio		3,0	3	1,5	1,2	0,761	2,974
CuSO₄10mg/L líquido	1	0,9	0	0	0,9	0,240	1,610
	2	1,2	0	0	0,8	0,290	1,740
	3	0,9	0	0	0,8	0,310	1,630
	4	1,2	0	0	0,8	0,390	1,740
	5	1,7	0	0	1,0	0,360	1,900
	6	1,2	0	0	0,9	0,260	1,400
	7	0,9	0	0	1,0	0,290	1,850
	8	1,0	0	0	0,9	0,360	1,860
	9	0,3	0	0	1,0	0,130	2,020
	10	1,2	0	0	0,9	0,310	1,500
Promedio		1,1	0	0	0,9	0,294	1,725
CuSO₄100mg/L líquido	1	1,0	0	0	0,9	0,330	1,820
	2	0,9	0	0	0,9	0,060	1,130
	3	1,3	0	0	1,2	0,250	1,810
	4	0,8	0	0	1,0	0,240	1,250
	5	1,2	0	0	1,1	0,310	2,020
	6	1,6	0	0	0,7	0,310	1,380
	7	1,0	0	0	0,9	0,310	1,220
	8	1,0	0	0	0,8	0,190	1,230
	9	1,2	0	0	1,0	0,190	1,360
	10	0,8	0	0	1,0	0,200	1,240
Promedio		1,1	0	0	1,0	0,239	1,446
CuO10mg/L líquido	1	1,0	0	1B	1,3	0,340	3,120
	2	0,8	0	1H	1,3	0,450	3,470
	3	1,1	0	1H	1,0	0,660	2,530
	4	0,8	0	1H	1,1	0,270	2,270
	5	0,7	0	2H	1,2	0,600	3,320
	6	1,0	0	1H	1,2	0,190	3,340
	7	1,0	0	1H	1,0	0,540	2,620
	8	0,8	0	1H	1,2	0,540	3,260
	9	1,1	0	1,5H	1,0	0,530	2,690
	10	1,0	0	1,5H	1,2	0,310	2,990
Promedio		0,9	0	1,2	1,2	0,443	2,961

CuO100mg/L líquido	1	1,1	0	1H	0,8	0,460	2,170
	2	1,1	0	1H	1,2	0,390	3,610
	3	0,5	0	1H	1,2	0,370	2,580
	4	1,0	0	1,5H	1,1	0,450	2,840
	5	1,0	0	1H	0,9	0,320	2,160
	6	0,9	0	0	1,1	0,250	2,090
	7	0,9	0	1H	1,2	0,570	2,740
	8	1,0	0	1H	1,5	0,370	3,430
	9	0,9	0	0	1,2	0,170	3,270
	10	1,2	0	1H	1,2	0,330	3,210
Promedio		1,0	0	0,9	1,1	0,368	2,810
control sólido	1	6,3	6	2H	2,1	0,670	3,740
	2	5,5	4	1,5H	1,9	0,760	3,590
	3	8,3	4	1H	2,2	0,830	3,820
	4	7,2	7	2H	2,1	0,770	4,900
	5	6,0	9	2H	2,1	0,840	4,740
	6	7,0	3	2H	2,3	0,630	4,890
	7	3,8	3	1H	1,8	0,470	2,250
	8	6,2	3	2H	1,9	0,640	3,910
	9	8,8	2	2H	1,9	0,750	3,690
	10	4,1	3	2H	2,0	0,660	4,580
Promedio		6,3	4	1,8	2,0	0,702	4,011
CuSO₄10mg/kg sólido	1	0,0	0	0	0,0	0,000	0,000
	2	6,0	6	2H	2,1	0,620	4,950
	3	5,6	6	2H	1,9	0,780	4,290
	4	1,8	0	0	0,0	0,470	0,000
	5	5,2	8	2H	2,1	0,700	4,360
	6	5,2	6	2H	2,1	0,610	4,070
	7	6,0	8	2H	2,0	0,700	4,430
	8	3,2	5	2H	1,9	0,550	3,600
	9	6,4	7	2H	2,0	0,570	4,340
	10	4,0	2	2H	2,1	0,290	4,200
Promedio		4,3	5	1,6	1,6	0,529	3,424
CuSO₄100mg/kg sólido	1	6,3	6	2H	2,1	0,780	4,300
	2	4,5	5	2H	2,0	0,620	4,150
	3	7,8	5	2H	2,0	0,730	4,000
	4	5,0	4	1,5H	2,0	0,520	3,920
	5	8,4	2	1,5H	1,8	0,600	3,230
	6	5,2	5	2H	2,1	0,650	3,850
	7	2,8	0	1,5H	2,1	0,440	3,540
	8	9,0	6	2H	2,1	0,780	4,150
	9	6,2	5	2H	2,1	0,610	4,270
	10	5,4	3	1H	2,1	0,440	3,000
Promedio		6,1	4	1,8	2,0	0,617	3,841

CuO10mg/kg sólido	1	6,5	8	2H	2,4	0,001	0,006
	2	3,0	2	1H	2,0	0,300	1,760
	3	5,3	8	2H	2,1	0,690	4,530
	4	7,2	4	1,5H	2,0	0,770	3,920
	5	5,4	7	1,5H	2,1	0,940	4,880
	6	5,1	6	1,5H	2,0	0,710	3,200
	7	7,2	5	2H	2,0	0,810	4,580
	8	3,0	3	2H	1,9	0,430	3,640
	9	6,0	4	2H	2,1	0,760	4,980
	10	6,9	8	2H	2,2	0,920	3,730
Promedio		5,6	6	1,8	2,1	0,728	4,089
CuO100mg/kg sólido	1	5,3	5	2H	1,8	0,390	3,000
	2	4,8	4	2H	2,2	0,580	4,140
	3	6,9	4	2H	2,1	0,710	3,730
	4	6,3	8	1,5H	2,2	0,720	4,280
	5	8,3	8	2H	2,3	0,800	4,460
	6	4,2	9	2H	2,3	0,730	4,000
	7	6,0	5	2H	2,1	0,550	3,920
	8	6,2	2	2H	1,9	0,660	3,300
	9	4,0	0	1B	1,8	0,590	2,120
	10	5,3	6	2H	2,3	0,620	4,600
Promedio		5,7	5	1,9	2,1	0,635	3,755

4.3.3.1.- Longitud de raíz (crecimiento raíz principal):

En la tabla 10, se observa que aquellas plántulas mantenidas en substrato líquido, presentaron longitudes de raíz principal significativamente menores que las plántulas crecidas en substrato sólido (ANDEVA, $P < 0,01$). La carga metálica adicionada en el ensayo, afectó en forma considerable a las plántulas en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5g/L enriquecidas con cobre, ya que en este caso, el cobre se encuentra más disponible para su captación por las plantas a través de la raíz, que en el caso del substrato sólido, donde el cobre fue posiblemente complejoado con la materia orgánica presente (especialmente humus). Los resultados obtenidos indican una alta variabilidad, especialmente en las longitudes de raíz principal de las plántulas mantenidas en solución.

Las raíces de las plántulas en control-líquido fueron largas y delgadas, con una coloración blanquecina. Por el contrario, las raíces de las plántulas mantenidas en soluciones enriquecidas con cobre, permanecieron del mismo tamaño con el cual fueron transplantadas desde las cápsulas de Petri, presentando atrofia, engrosamiento y una consecuente necrosis, por lo tanto, las longitudes de la raíz principal de estas plántulas fueron significativamente menores que las presentadas por las plántulas mantenidas en solución control (figura 18, letras a y c).

Los tests *a posteriori* indicaron que la longitud de la raíz principal de las plántulas en control-líquido y en CuSO_4 10mg/L y 100mg/L-líquido, no presentaron diferencias significativas (figura 18, letra a), debido principalmente a la alta variabilidad en las longitudes de las raíces principales de las réplicas en control-líquido, aunque se observa una clara tendencia a la disminución del crecimiento de la raíz principal de las plántulas sometidas a tratamientos sulfatados. En este mismo contexto, se debe considerar que la adición de 10 mg/L de CuSO_4 al substrato líquido, probablemente provocó que las plántulas superaran los umbrales críticos de toxicidad, por lo tanto, la adición de 100 mg/L de esta sal de cobre, no produjo mayores efectos fitotóxicos en estas plántulas. Tal afirmación ratifica que, una vez

superados los umbrales críticos de toxicidad de las plantas, las adiciones de mayores concentraciones metálicas no varían el estado de necrosis de las plantas.

Por otra parte, los tests *a posteriori* permitieron verificar que el daño producido en las raíces de las plántulas en solución se debió a un efecto del cobre más que a un efecto de déficit en la disponibilidad de nutrientes dependiente del sustrato, ya que el crecimiento medio de la raíz principal de las plántulas en control-líquido, fue similar al crecimiento medio de las raíces principales de las plántulas crecidas en sustrato sólido (Figura 18, letra b). En este punto, es necesario recordar que las plántulas en solución no recibieron todos los nutrientes necesarios por parte de la solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L; por lo tanto, las plántulas solamente sobrevivieron con los nutrientes almacenados en los cotiledones y con los aportes de calcio brindados por la solución.

Las plántulas mantenidas en solución enriquecida con CuO , presentaron diferencias significativas con las plántulas en control-líquido en relación con la longitud de la raíz principal (Figura 18, letra a y c). Tal observación, contradice el supuesto de que el estrés metálico debiese ser mayor en las plántulas mantenidas en solución de CuSO_4 -líquido que en las plántulas en CuO -líquido, dado que el CuSO_4 es mucho más soluble en agua que el CuO y, por lo tanto, el cobre se encuentra más disponible para la planta. Sin embargo, se debe considerar que en el presente estudio, solo se midió la longitud de la raíz principal al finalizar el ensayo, lo cual pudo inducir a no detectar efectos significativos entre los distintos tratamientos. Lo ideal sería determinar las diferencias entre la longitud de la raíz principal al inicio y al final del ensayo, lo cual mostraría efectivamente la inhibición del crecimiento sobre la longitud radical inicial de las plántulas. Por lo tanto, la variabilidad natural de la longitud radical inicial de las plántulas, puede estar enmascarando los efectos producidos por el cobre.

Por último, los tests *a posteriori* indicaron que las longitudes de las raíces principales de las plántulas en sustrato sólido, no variaron notoriamente entre las réplicas (Figura 18, letra b), sin importar el tratamiento al que fueron sometidas. Tales resultados permiten aseverar que la carga metálica en la tierra de hoja no afectó el

presente parámetro en forma significativa. Solo se observa una cierta variación en el caso de CuSO_4 100mg/kg-sólido, la cual no llegó a ser significativa.

4.3.3.2.- Producción de raíces secundarias (Nº de ramificaciones):

En la tabla 10, se observa que la producción de raíces secundarias es notoriamente mayor en las plántulas crecidas en substrato sólido que en las plántulas mantenidas en solución (ANDEVA, $P < 0,01$). Al igual que en el caso de la longitud de la raíz principal, la producción de raíces secundarias de las plántulas en solución se vio bastante afectada por el estrés metálico al cual fueron sometidas estas plántulas. Este hecho, se atribuye exclusivamente a que el cobre se encuentra más biodisponible en solución que en tierra de hoja.

Con respecto a las plántulas mantenidas en solución, se observa que las únicas plántulas que desarrollaron ramificaciones fueron las del tratamiento control-líquido, siendo inhibida en forma significativa la producción de raíces secundarias en los otros tratamientos en solución. Por lo tanto, los efectos tóxicos del cobre sobre la actividad meristemática se evidencian claramente mediante este parámetro.

Los tests *a posteriori* indicaron que la producción de raíces secundarias de las plántulas en control-líquido comparada con la de las plántulas mantenidas en soluciones enriquecidas con cobre, no presentó diferencias significativas, dada la gran variabilidad en la producción de raíces secundarias mostrada por las réplicas de control-líquido (Figura 19, letra a). Sin embargo, se observa una clara tendencia a la disminución en la producción de raíces secundarias en todas las plántulas mantenidas en soluciones enriquecidas con cobre.

Los tests *a posteriori* indicaron además, que los efectos evidenciados en las plántulas en solución se atribuyen principalmente a un efecto de la adición de cobre y no a la escasez de nutrientes; ya que al comparar la productividad de raíces secundarias de las plántulas en control-líquido con la productividad de raíces secundarias de las plántulas en los tratamientos desarrollados en substrato sólido, no se observan diferencias significativas entre ellas, aunque la producción de raíces

secundarias del control-líquido tiende a disminuir en comparación a la evidenciada por las plántulas en substrato sólido (Figura 19, letra b).

En el caso de las plántulas en solución, se esperaba reafirmar la hipótesis de que la producción de raíces secundarias se vería mayormente afectada en las plántulas sometidas a tratamientos sulfatados, que en las plántulas mantenidas en solución enriquecida con CuO, debido a un efecto de solubilidad. Sin embargo, el análisis estadístico no ratifica tal afirmación, lo cual se atribuye al escaso número de réplicas con las que contaba cada tratamiento.

Por su parte, el análisis estadístico *a posteriori* realizado a las plántulas en substrato sólido, indicó que la producción de raíces secundarias promedio en control-sólido, es menor que la producción de raíces secundarias promedio evidenciada por las plántulas en los tratamientos con CuO 10 mg/kg-sólido, CuO 100 mg/kg-sólido e inclusive que en CuSO₄10 mg/kg-sólido (figura 19, letra b). Tales resultados se atribuyen a la escasez de réplicas en cada caso, o bien, a una leve inhibición del meristema de la raíz principal, lo que pudo estimular la actividad de los meristemas secundarios de las plántulas mantenidas en substrato sólido enriquecido con cobre, en un intento por mantener la actividad radical y, por ende, la sobrevivencia de las plántulas, ya que existe evidencia que indica que las concentraciones elevadas de metales, pueden tanto inhibir como estimular la formación de raíces secundarias (Baker, 1987).

La gran variabilidad en el número de raíces secundarias evidenciada por las plántulas mantenidas en substrato líquido, indica que este parámetro no es de gran utilidad para comprobar fehacientemente la fitotoxicidad producida por el cobre y otros metales en estudio.

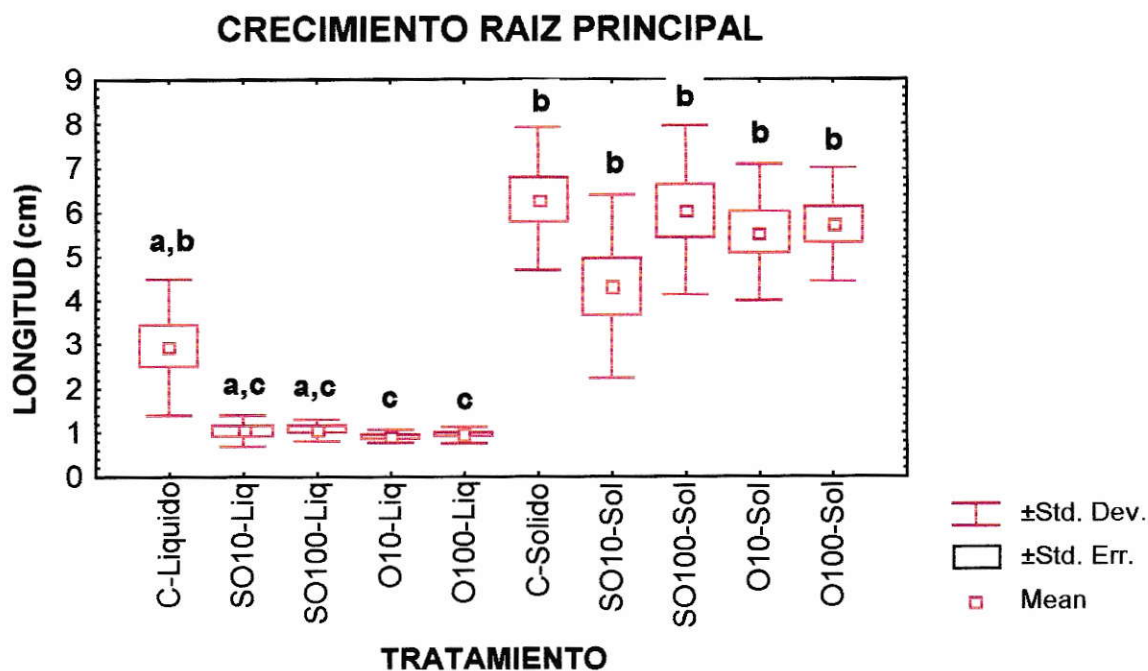


Figura 18: Variación en la longitud de la raíz principal de las plántulas sometidas a ensayo en función del tratamiento aplicado. Determinación realizada mediante HSD de Tukey. Las letras sobre el punto indican las diferencias o igualdades entre los distintos tratamientos.

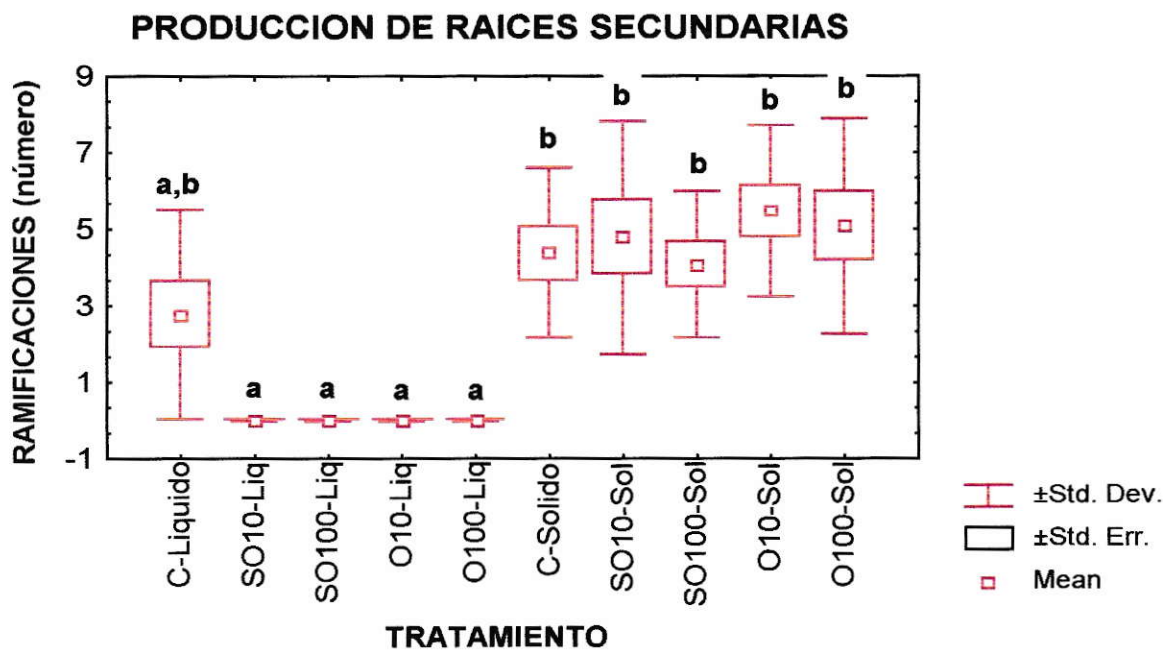


Figura 19: Variación en la producción de raíces secundarias de las plántulas sometidas a ensayo en función del tratamiento aplicado. Determinación realizada mediante HSD de Tukey. Las letras sobre el punto indican las diferencias o igualdades entre los distintos tratamientos.

4.3.3.3.- Hojas nuevas producidas (Nº de hojas nuevas):

En la tabla 10, se observa que la producción de hojas nuevas en las plántulas crecidas en sustrato sólido es mayor que en las plántulas mantenidas en solución (sin considerar los cotiledones) (ANDEVA, $P < 0,01$). Tal afirmación es totalmente cierta para el caso de las plántulas mantenidas en solución sulfatada, donde la producción de hojas nuevas fue nula. La gran variabilidad en la producción de hojas nuevas de las plántulas crecidas en solución, se debe principalmente a la mayor biodisponibilidad que presenta el cobre en el sustrato acuoso en comparación con el sustrato sólido.

Los tests *a posteriori* indicaron que no se produjeron diferencias significativas entre los tratamientos en sustrato sólido y el control-líquido con respecto a la producción de hojas nuevas (figura 20, letra c). De tal modo, los resultados obtenidos en el análisis estadístico, confirman el hecho de que el estrés metálico al cual se sometieron las plántulas, fue el principal responsable de la disminución en la productividad de hojas nuevas de las plántulas en solución (Figura 20, letras a,c). Por lo tanto, se desecha nuevamente la hipótesis de un posible desmedro en la productividad de las plántulas en solución, debido a la escasez de nutrientes que esta posee.

Las plántulas en solución sulfatada presentaron diferencias significativas con respecto a la producción de hojas nuevas con las plántulas en control-líquido y en los tratamientos con CuO-líquido (Figura 20, letra b). Tales resultados se pudieron deber a que las plántulas en solución enriquecida con CuSO_4 presentaron mayores daños morfofisiológicos visibles que el resto de las plántulas sometidas a ensayo, los cuales se manifestaron a los pocos días de ser transplantadas desde las cápsulas de Petri al sustrato acuoso enriquecido con CuSO_4 (especialmente con 100mg/L de CuSO_4); por lo tanto, no tuvieron la posibilidad de producir hojas nuevas, ya que el tejido necrótico no tiene la capacidad de producir. En este caso, posiblemente el cobre superó la capacidad tampón de la raíz y afectó consecuentemente al vástago, de tal

modo, el metal pasa al vástago (por previa inhibición del sistema radical) produciendo inhibición en la producción de hojas nuevas.

No se observan diferencias significativas en lo referente a producción de hojas nuevas entre las plántulas en control-líquido y las plántulas en CuO 10 mg/L-líquido y en CuO 100 mg/L-líquido (Figura 20, letra d). Sin embargo, las plántulas en solución de óxido de cobre presentan una clara tendencia a la disminución de su productividad de hojas nuevas con respecto a las plántulas en tratamiento control-líquido, debido a la presencia de cobre.

La producción de hojas nuevas de las plántulas mantenidas en sustrato sólido tiende a ser muy similar en todos los tratamientos (Figura 20, letra c); por lo tanto, el efecto del cobre sobre el sustrato sólido en relación a este parámetro, no produjo efectos visibles. Las plántulas crecidas sustrato sólido disponían de una gran cantidad de nutrientes, provenientes desde la tierra de hoja y desde los cotiledones, de tal modo, les fue posible producir hojas nuevas, lo cual es primordial para la realización de la fotosíntesis y, por ende, para la producción continua de azúcares, lo cual ayuda a la subsistencia y crecimiento de la planta.

4.3.3.4.- Tamaño de cotiledones (longitud):

Una gran cantidad de estudios sobre fitotoxicidad de metales pesados, han empleado la longitud del cotiledón, como una medida adicional para determinar las respuestas diferenciales de las plantas sometidas a un estrés metálico.

La determinación de la longitud del cotiledón se realizó escogiendo uno de los dos cotiledones que presentaba cada plántula.

En la tabla 10, se observa que las longitudes de cotiledones de las plántulas mantenidas en solución, fueron inferiores a las longitudes de cotiledones presentadas por las plántulas crecidas en sustrato sólido (ANDEVA, $P < 0,01$). Además, la variabilidad de estos resultados es relativamente alta, especialmente en las plántulas mantenidas en solución. Esta variabilidad es más marcada en el caso de las plántulas

mantenidas en solución sulfatada, donde las longitudes de los cotiledones son notoriamente menores que las presentadas por los demás tratamientos en solución.

Producto de la escasez de nutrientes a la cual se vieron sometidas las plántulas en solución, ya que los nutrientes almacenados por los cotiledones de las plántulas en su estado de embrión no fueron suficientes para un desarrollo normal de la planta y la solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ no aportó nutrientes a las plántulas, con excepción de calcio; se presume que no existió una distribución equitativa de los nutrientes de las plántulas a cada una de las estructuras vegetales, puesto que la mayor parte de los nutrientes fueron utilizados por las plántulas para la producción de hojas nuevas, lo que se tradujo en un desmedro del tamaño de los cotiledones.

Al contrario de lo ocurrido con las plántulas en solución, las plántulas en substrato sólido obtuvieron nutrientes de la tierra de hoja (además de los nutrientes almacenados por las plántulas desde su estado de semilla), lo cual influyó en que estas plántulas presentasen cotiledones con mayores tamaños que las plántulas mantenidas en substrato líquido.

Los tests *a posteriori* permitieron observar que, al contrario de las variables respuesta anteriormente analizadas, la falta de nutrientes fue la principal razón por la cual los tamaños de cotiledones de las plántulas mantenidas solución se diferenciaron significativamente con los tamaños de cotiledones presentados por las plántulas crecidas substrato sólido (figura 21). La afirmación anterior, se basa en el análisis de los valores medios de longitud de cotiledones para plántulas en control-líquido y en control-sólido (Figura 21, letras a y b,c), donde las plántulas en este último caso, presentaron un tamaño medio de cotiledón significativamente superior al evidenciado por las plántulas mantenidas en control-líquido.

Además, los test *a posteriori* indicaron que no se produjeron diferencias significativas con respecto al tamaño de cotiledones entre las plántulas mantenidas en solución enriquecida con 10 y 100 mg/L de CuSO_4 y CuO (Figura 21, letra a), aunque el tamaño de los cotiledones de las plántulas sometidas a tratamientos con CuSO_4 10 y 100 mg/L-líquido, tendieron a disminuir por efecto de la mayor solubilidad que esta sal de cobre posee en agua. Por el contrario, se observan diferencias

significativas entre todos los tratamientos en solución y todos los tratamientos en sustrato sólido (Figura 21, letra a y b,c).

En tierra de hoja, se observan longitudes promedio de cotiledones mucho mayores que en las plántulas mantenidas solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L, con valores muy constantes entre sí (Figura 21, letra b); salvo en el caso de las plántulas sometidas a tratamiento con CuSO_4 10mg/kg-sólido, donde el tamaño de los cotiledones de las plántulas presenta una gran variabilidad (Figura 21, letra c). Esto conlleva a que se produzcan diferencias significativas entre la longitud de los cotiledones de las plántulas crecidas sustrato sólido enriquecido con de 10 y 100 mg/kg de CuO y la longitud de los cotiledones de las plántulas sometidas a tratamiento con CuSO_4 10 mg/kg-sólido. Tal fenómeno, se atribuye a un efecto del bajo número de réplicas realizadas.

La alta diferenciación evidenciada entre las longitudes de los cotiledones de las plántulas crecidas en solución y el tamaño de los cotiledones de las plántulas crecidas en sustrato sólido, indican que este parámetro es un herramienta de gran utilidad para comparar el efecto fitotóxico del cobre en plantas mantenidas en distintos sustratos de crecimiento.

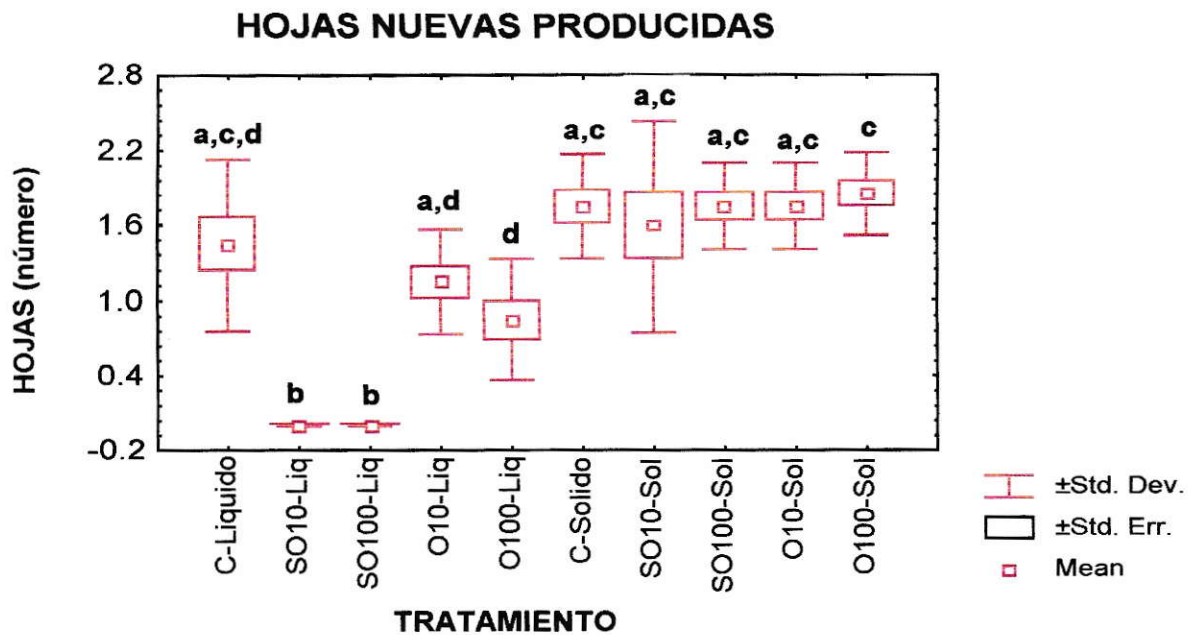


Figura 20: Variación en la producción de hojas nuevas de las plántulas sometidas a ensayo en función del tratamiento aplicado. Determinación realizada mediante HSD de Tukey. Las letras sobre el punto indican las diferencias o igualdades entre los distintos tratamientos.

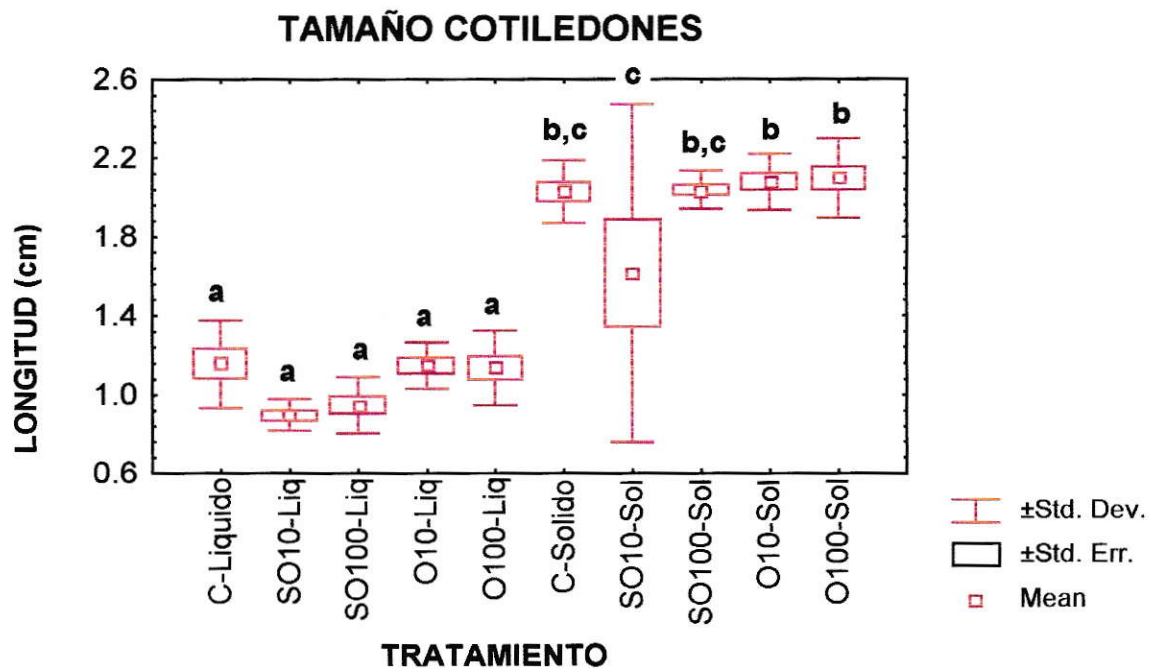


Figura 21: Variación en el tamaño de los cotiledones de las plántulas sometidas a ensayo en función del tratamiento aplicado. Determinación realizada mediante HSD de Tukey. Las letras sobre el punto indican las diferencias o igualdades entre los distintos tratamientos.

4.3.3.5.- Productividad de la raíz (peso seco raíz):

El rendimiento, en término de producción de biomasa o productividad, proporciona una fácil medida para la evaluación de los efectos diferenciales producidos en las plantas, por acción del tratamiento con cobre.

En la tabla 10 se observa que las productividades de la raíz de las plántulas crecidas en sustrato sólido, fueron superiores a las productividades de raíz de las plántulas mantenidas en solución (ANDEVA, $P < 0,01$). Tales resultados se deben a la mayor biodisponibilidad del cobre en el sustrato líquido.

Este parámetro también se vio influenciado por la forma química en la que se adicionó el cobre en solución, ya que las plántulas mantenidas en solución sulfatada, presentaron una productividad de raíz notoriamente menor que el resto de las plántulas en solución.

La productividad de la raíz de las plántulas sometidas a ensayo, no se vio tan afectada por el tipo de sustrato de crecimiento como en el caso de la longitud de raíz, ya que al atrofiarse las raíces de las plántulas en solución enriquecida con cobre, estas estructuras vegetales tendieron a engrosarse, por lo tanto, su peso seco aumentó debido a este fenómeno. La explicación a estos resultados se basa en que, al ser la raíz es la estructura vegetal directamente afectada por las adiciones de cobre realizadas, se presume que los meristemas radicales principales de las plántulas en solución se vieron inhibidos, por lo tanto, las raíces principales no continuaron creciendo. Sin embargo, los meristemas radicales secundarios intentaron producir ramificaciones, pero la carga metálica en solución fue tan elevada, que este proceso también se vio inhibido. De este modo, las raíces de las plántulas en soluciones enriquecidas con CuSO_4 y con CuO , tendieron a ser más cortas, pero de mayor grosor que las plántulas mantenidas en tierra de hoja.

Los tests *a posteriori* indicaron que, en el caso de las plántulas en solución, no se observan efectos fitotóxicos evidentes debido a la falta de nutrientes como en el caso de la longitud de cotiledones, ya que tanto las plántulas de control-líquido como las plántulas sometidas a tratamiento control-sólido, presentaron productividades de

raíz similares, por lo tanto, no se produjo una diferencia significativa entre estos tratamientos (figura 22, letra a).

Las productividades de raíz de las plántulas mantenidas en soluciones enriquecidas con 10 y 100 mg/L de CuSO_4 , fueron significativamente inferiores que las productividades de raíz de las plántulas crecidas en substrato sólido (figura 22, letra a y b). Tal efecto, se debió a que el sulfato de cobre es una sal muy soluble en agua, por lo tanto, el cobre se encontraba casi completamente biodisponible, lo cual produjo la atrofia de estas raíces a los pocos días de experimentación, impidiendo que las plántulas reaccionasen al estrés metálico al cual fueron sometidas.

Al igual que las plántulas mantenidas en soluciones sulfatadas, las plántulas sometidas a tratamiento con CuO 100 mg/L-líquido, también presentaron bajas productividades de raíz. Al comparar los valores de las productividades medias de raíz las plántulas en control-líquido con las productividades de raíz de las plántulas mantenidas en CuSO_4 10 mg/L-líquido, CuSO_4 100 mg/L-líquido y en CuO 100 mg/L-líquido, se presentan diferencias significativas entre ellas (Figura 22, letra a y b). Por el contrario, al comparar las productividades medias de raíz de las plántulas en control-líquido con las productividades de raíz evidenciadas por las plántulas en de CuO 10 mg/L-líquido, no se presentan diferencias significativas, aunque se observa una tendencia a la disminución en la productividad de raíz de las plántulas mantenidas en este último tratamiento (Figura 22, letra a).

Por su parte, los tests *a posteriori*, mostraron que los valores medios de productividad de raíz de las plántulas crecidas en substrato sólido, tienden a ser constantes para todas las plántulas mantenidas en este substrato, independiente del tratamiento aplicado. De este modo, no se observan diferencias significativas entre las productividades de raíz de las plántulas sometidas a tratamiento control-sólido, CuSO_4 10 mg/kg-sólido, CuSO_4 mg/kg-sólido, CuO 10 mg/kg-sólido y CuO 100 mg/kg-sólido (figura 22, letra a). Tampoco se observan diferencias significativas entre las productividades de raíz de todos los tratamientos en substrato sólido y las productividades de raíz del control-líquido y del CuO 10 mg/L-líquido (Figura 22, letra a), con respecto a la variable de análisis.

El análisis de la productividad de raíz es un gran instrumento para el estudio estadístico de los datos de sistemas vegetales, ya que brinda resultados congruentes y fáciles de manejar.

4.3.3.6.- Productividad del vástago (peso seco vástago):

Mediante el presente análisis, se encontró que las productividades medias de vástago de las plántulas mantenidas en solución, fueron levemente inferiores a las productividades medias de vástagos presentadas por las plántulas crecidas en sustrato sólido (ANDEVA, $P < 0,01$).

En el presente caso, se esperaba que la productividad de vástagos no se viese tan afectada por la carga metálica adicionada como la productividad de raíz, lo cual se cumplió totalmente. Tal hecho, se debió esencialmente a que la raíz es la primera barrera afectada directamente por el metal, la cual una vez superada, permite el paso del metal hacia el vástago. Por lo general, el vástago es mayormente afectado por falta de nutrientes que por un estrés metálico, lo cual es ratificado por los resultados obtenidos.

Los tests *a posteriori*, indicaron que las productividades medias de vástago fueron muy similares para cada una de las réplicas, independientemente del tratamiento y sustrato de crecimiento (figura 23). Por lo tanto, se establece que no existió un efecto significativo del cobre sobre esta variable respuesta. Sólo se observa un leve efecto por falta de nutrientes, a nivel de biomasa producida, en aquellas plántulas mantenidas en sustrato líquido.

Las plántulas sometidas a tratamiento con CuSO_4 100 mg/L-líquido, presentaron el menor valor de productividad media de vástago entre todos los tratamientos, presentado diferencias significativas con las productividades medias de vástagos de las plántulas sometidas a los tratamientos control-sólido y CuO 10mg/kg-sólido (Figura 23, letra a y b).

Además, los test *a posteriori*, indicaron que la productividad media de vástago de las plántulas en tratamiento con CuSO_4 10mg/L-líquido, presenta gran variabilidad,

lo cual se atribuye a un efecto del bajo número de réplicas realizadas. Además, se debe considerar que las plántulas mantenidas en soluciones sulfatadas, se marchitaron tempranamente, mucho antes que todas las demás plántulas en solución. Por lo tanto, considerando que el tejido necrótico no tiene la posibilidad de producción, las plántulas en solución sulfatada presentaron una productividad de vástago aminorada.

Como solo se observan diferencias significativas entre las productividades de vástagos de las plántulas sometidas a tratamientos con CuSO_4 100 mg/L-líquido y las productividades de vástagos de las plántulas en control-sólido y en CuO 10 mg/kg-sólido, las demás plántulas sometidas a los tratamientos no incluidos en la excepción anterior, no presentan diferencias significativas con respecto a su productividad de vástago (Figura 23, letra a). Por tal motivo, es posible afirmar que la productividad de vástago fue la variable menos afectada por la adición de cobre y por la escasez de nutrientes (que solo afectó levemente a algunas de las plántulas en solución), que el resto de las variables respuesta analizadas.

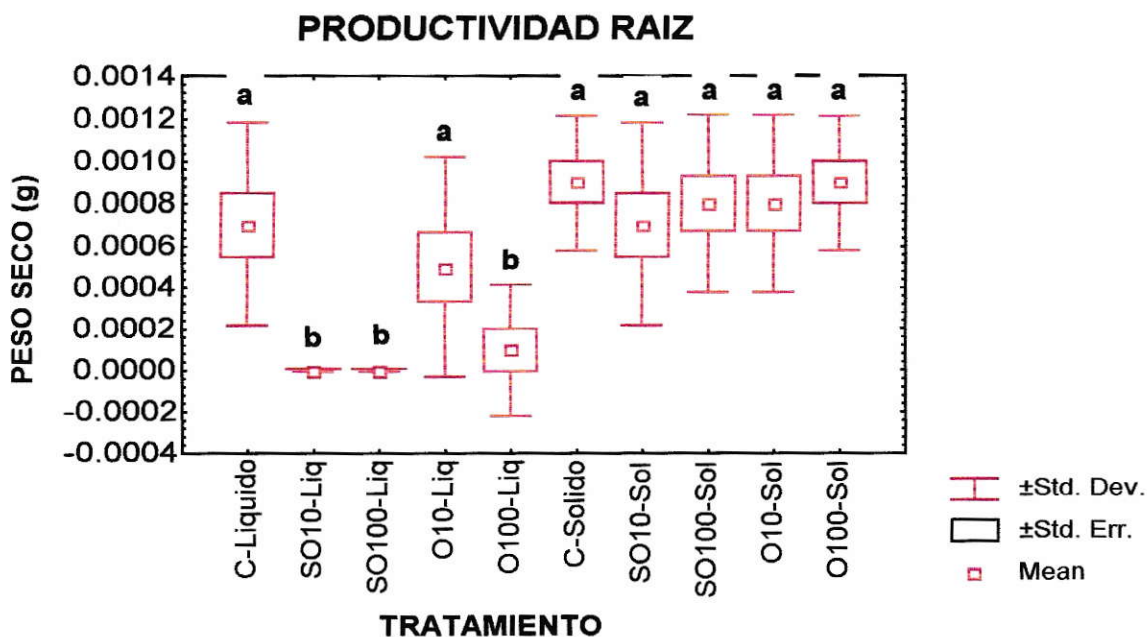


Figura 22: Variación en la productividad de raíz de las plántulas sometidas a ensayo en función del tratamiento aplicado. Determinación realizada mediante HSD de Tukey. Las letras sobre el punto indican las diferencias o igualdades entre los distintos tratamientos.

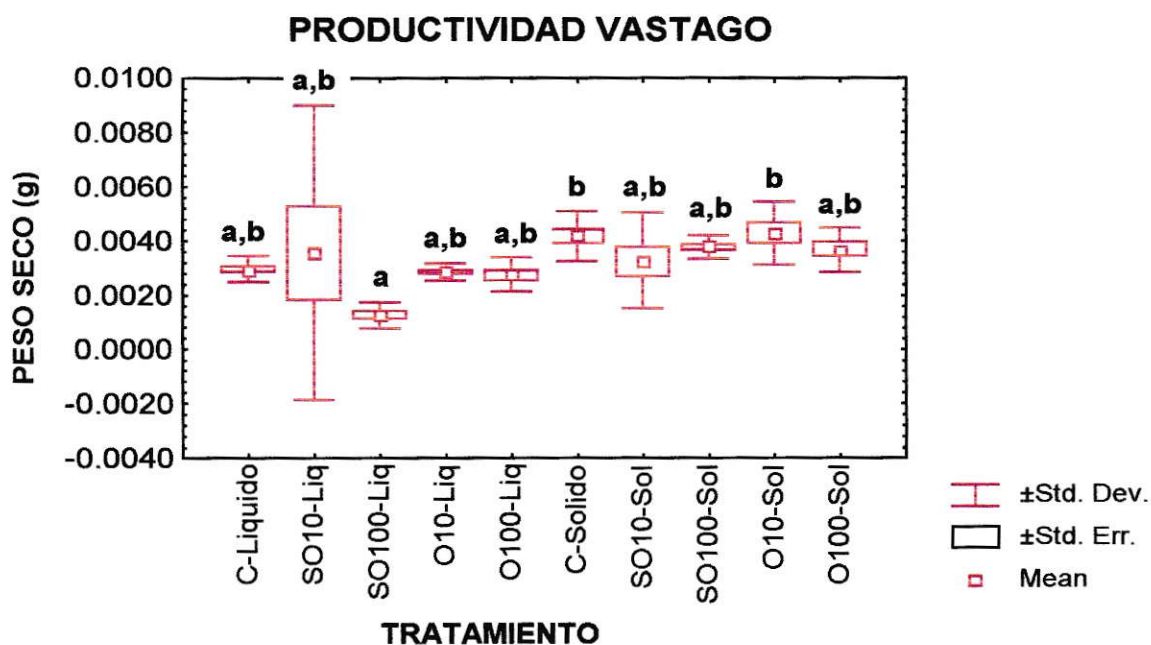


Figura 23: Variación en la productividad del vástago de las plántulas sometidas a ensayo en función del tratamiento aplicado. Determinación realizada mediante HSD de Tukey. Las letras sobre el punto indican las diferencias o igualdades entre los distintos tratamientos.

V.- ANALISIS FISICOQUIMICO DE MUESTRAS DE SUBSTRATO SOLIDO Y ANALISIS QUIMICO DE *Noticastrum sericeum*.

5.1.- ANALISIS FISICOQUIMICO DEL SUBSTRATO SOLIDO (TIERRA DE HOJA):

5.1.1.- PREPARACION DE LABORATORIO DE MUESTRAS DE SUELO O EQUIVALENTE PARA ANALISIS FISICOQUIMICO:

5.1.1.1.- Antecedentes generales:

La preparación de las muestras de suelo o equivalentes previo al análisis fisicoquímico, se realiza con el fin de lograr la homogeneización, secado y tamización adecuada del sustrato sólido y obtener así, resultados representativos y exactos en las determinaciones a realizar. Este procedimiento es esencial para los posteriores análisis fisicoquímicos, puesto que por convención internacional todos los resultados obtenidos en estos análisis deben presentarse en base a suelo seco, utilizando un tamaño de partícula <2 mm o ≤ 250 μ m, según la determinación a realizar al sustrato sólido.

5.1.1.2.- Procedimiento:

Se pesó cada una de las muestras de sustrato sólido al momento de su llegada al laboratorio y en forma posterior a su secado al aire hasta peso constante, para lo cual se utilizó una cabina de secado con tiraje forzado de aire, diseñada para operar a una temperatura no superior a los 30°C. De este modo, se procedió a calcular el % de humedad de cada una de las muestras de sustrato sólido.

Una vez secas, las muestras fueron trituradas manualmente, para esto se cubrieron con un plástico y se pasó el rodillo de madera sobre ellas. Luego, se

tamizó las muestras utilizando un tamiz de polietileno N° 10 (USDA, 1996). Esto corresponde a las fracciones de sustrato sólido con tamaño de partícula < 2 mm de diámetro, las cuales fueron retenidas para análisis. Las fracciones >2 mm fueron descartadas.

Se esparció las fracciones < 2 mm en las bandejas y se procedió a mezclarlas en forma homogénea. Luego, las muestras se separaron en cuatro porciones iguales (cuadrante), combinando dos porciones en forma diagonal, las cuales se guardaron como muestras. Se combinó las otras dos porciones restantes y se guardaron como muestras testigo.

Unos 10 gramos de cada muestra de sustrato sólido con tamaño de partícula <2mm fueron molidos utilizando un molino de bolas (molino recíproco) durante 3 minutos a 580 rpm, hasta conseguir un tamaño de partícula $\leq 250 \mu\text{m}$.

Las muestras de sustrato con ambos tamaños de partículas (<2mm y <250 μm) fueron utilizadas en los distintos análisis, por lo tanto, todos los datos sobre su preparación se registraron en el libro de registros del laboratorio y en la etiqueta del envase.

Simultáneamente, se tomó 10 g de cada muestra de sustrato sólido con tamaño de partícula <2mm y se secaron a 105°C por 24 horas, con el fin de eliminar cualquier indicio de humedad remanente y, de este modo, calcular el factor de humedad correspondiente a cada muestra.

Se chequeó visualmente la presencia de carbonatos en las muestras de sustrato sólido, de acuerdo a la cantidad de efervescencia producida en las muestras ante la adición de gotas de HCl 1N.

Ver apéndice 5 b).

5.1.2.- DETERMINACION DE pH DEL SUBSTRATO SOLIDO EN AGUA Y EN SOLUCION DE CLORURO DE CALCIO:

5.1.2.1.- Antecedentes generales:

Debido a que el pH de los suelos varía ampliamente según su hábitat y profundidad, los distintos tipos de suelo presentan diversas conductas ante la adición de cargas contaminantes de metales pesados. Además, se debe considerar que el pH influye considerablemente en la solubilidad y movilidad de los metales en el suelo, con los consecuentes efectos sobre los sistemas vegetales. Por lo tanto, la medición de este parámetro en agua o en electrolito es de gran relevancia para evaluar los efectos tóxicos de los metales en el sistema suelo.

5.1.2.2.- Procedimiento:

El pH fue determinado en la solución sobrenadante de suspensiones substrato sólido-agua destilada y substrato sólido-CaCl₂ 0,01M; en ambos casos en una relación 1:5. Se utilizó este protocolo debido a que se trabajó con un substrato sólido altamente orgánico.

Para esto, se pesó 5 g de muestra de substrato seco al aire en un vaso de polipropileno de 100 ml. Luego se agregó 25 ml de agua destilada desionizada a pH 5,6, agitando frecuentemente. Se dejó reposar durante 1h, agitando cada 15 minutos.

Se realizó el mismo procedimiento, pero se reemplazó el agua destilada desionizada por 25 ml de solución de CaCl₂ 0,01M.

El pH-metro fue calibrado usando buffer 7,00 y 4,00. Se usó buffer de pH 9,00 para chequear linealidad.

Para leer el pH de las muestras, se colocó el electrodo combinado de vidrio y calomelano en la solución sobrenadante (el bulbo del electrodo debió quedar sobre el sedimento de substrato). Se agitó con una bagueta por 30 segundos y después de 1 minuto se leyó el pH, cuyo valor se registró en el libro de registro del laboratorio. El

electrodo fue lavado con abundante agua destilada para extraer cualquier tipo de partícula que pudo quedar adherida a él.

Se colocó la próxima muestra. Una vez que se leyó todas las muestras, se dejó el electrodo (previamente lavado y secado) inmerso en solución de KCl 3M.

Ver apéndice 5 c).

5.1.3.- DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CARBONO ORGANICO EN EL SUBSTRATO SOLIDO POR EL METODO DE COMBUSTION HUMEDA DE WALKLEY-BLACK:

5.1.3.1.- Antecedentes generales:

Considerando que la biodisponibilidad de los metales en el suelo dependen ampliamente del contenido de materia orgánica presente en este medio, la determinación del % MO es útil para establecer los niveles de metales disponibles para las plantas.

Ya que el CO es el mayor componente de la materia orgánica del suelo, la medición de este parámetro puede servir como una determinación indirecta del contenido de MO presente en un suelo. Los valores de %CO son multiplicados por el factor de "Van Bemmelen" de 1,724 para calcular el %MO. Este factor se basa en la suposición que la materia orgánica contiene un 58% de CO. Sin embargo, debido a que el contenido de carbón orgánico en los suelos es altamente variable, la utilización de este factor es solo una aproximación.

5.1.3.2.- Procedimiento:

El contenido de CO en el presente estudio fue determinado mediante el método de combustión húmeda de Walkley-Black. Para esto, se pesó 0,15 g de sustrato seco al aire con tamaño de partícula $<250 \mu\text{m}$ en un vaso de titulación, el cual fue oxidado con una mezcla de 20,00 ml de solución de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y 40 ml de H_2SO_4 concentrado, agitando frecuentemente el recipiente. Se ajustó la cantidad adicionada de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a la cantidad de H_2SO_4 para mantener una relación de volumen igual a 1:2.

Posteriormente, se colocó el vaso con la mezcla sustrato- $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ - H_2SO_4 en un agitador reciproco, agitando durante 1 minuto.

Si la mezcla sustrato-dicromato-ácido adquiere un color de tonalidad azul-verde es señal de que todo el dicromato fue reducido. En este caso, se agrega más dicromato y ácido, manteniendo la razón 1:2 (v/v).

Luego de 30 min. la reacción fue interrumpida por dilución con 180 ml de agua destilada desionizada.

El exceso de dicromato (no reducido) fue potenciométricamente titulado con sulfato ferroso 1 N.

Se titularon 8 blancos, correspondientes a 20,00 ml de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1N más 40 ml de H_2SO_4 concentrado, sin sustrato. El gasto del sulfato ferroso en la titulación de cada blanco se usó para calcular su normalidad (promedio).

Posteriormente, el equipo de titulación automática se programó para adicionar un volumen del titulante (FeSO_4) conforme a la variación del potencial de la solución titulada (excedente de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Se estimó que el dicromato reducido durante la reacción es equivalente al contenido de CO del sustrato sólido. Al término de la titulación se anexó los resultados imprimidos al libro de registro.

Ver apéndice 5 d).

5.1.4.- DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO DEL SUBSTRATO SOLIDO:

5.1.4.1.- Antecedentes generales:

La capacidad de intercambio catiónico (CIC), es una reacción reversible en la solución del suelo, que puede producirse en los sitios permanentemente cargados o dependientes del pH, sobre la superficie de partículas orgánicas y minerales.

La CIC depende de la carga negativa de los componentes del suelo. El mecanismo para estas cargas es la sustitución isomórfica dentro de las capas de minerales silicatados; rompimiento de enlaces en minerales y superficies externas; disociación de grupos funcionales en compuestos orgánicos; y adsorción preferencial de ciertos iones sobre la superficie de partículas (Rhoades, 1982).

Por lo tanto, la determinación de este parámetro permite estimar la cantidad de cationes intercambiables que un suelo puede absorber.

5.1.4.2.- Procedimiento:

En el presente estudio, la capacidad de intercambio catiónico fue determinada a través de la saturación de los sitios de intercambio de la tierra de hoja con acetato de amonio a pH 7. Para esto, se pesó 20 g de sustrato sólido seco al aire con tamaño de partícula <2 mm en un matraz erlemeyer de 250 ml y se agregó 50 ml de solución de NH_4OAc . Se tapó el matraz y se agitó por 20 minutos a 125 rpm en el agitador recíproco. Se dejó reposar durante la noche y se transfirió el contenido del matraz a un embudo Büchner con papeles filtro Whatman N°42. Posteriormente, se filtró la mezcla usando succión suave y se procedió a lavar la torta con 200 ml de NH_4OAc , agregando pequeñas cantidades, de modo que el lavado no requirió menos de 1 hora. Luego, el sustrato saturado con NH_4^+ fue lavado con 100 ml etanol, adicionado en pequeñas cantidades, para remover el exceso de NH_4^+ . El filtrado obtenido fue descartado.

El desplazamiento del amonio absorbido se realizó mediante la aplicación de 240 ml de NaCl al 10% al substrato presente en el embudo Büchner (torta), usando pequeñas cantidades, drenando completamente después de cada adición. Luego, se transfirió el filtrado a un matraz volumétrico de 250 ml y se ajustó el volumen con agua destilada desionizada a pH 5,6.

Se pipeteó una alícuota de 5 ml del líquido aforado y se introdujo a un tubo de destilación. Se colocó el tubo de destilación en el aparato de destilación micro-Kjeldahl, agregando lentamente 20 ml de NaOH 1N. Se procedió a destilar la solución. Se recibió el destilado en un matraz erlenmeyer de 250 ml que contenía 10 ml de H₃BO₃ al 2% y 10 gotas de mezcla indicadora. Se destiló hasta que el H₃BO₃ se tornó verde.

Por último, se tituló el amonio presente en el líquido destilado con H₂SO₄ 0,01N, a un punto final rojo (pH 4,6), utilizando un blanco para comparar.

Ver apéndice 5 e).

5.1.5.- DETERMINACION DEL CONTENIDO DE COBRE TOTAL EN MUESTRAS DE SUELO O SU EQUIVALENTE:

5.1.5.1.- Antecedentes generales:

El conocimiento del contenido de cobre total de un suelo permite definir, en cierto modo, el grado de contaminación del sistema suelo. Por lo tanto, la determinación de la concentración total de cobre en un suelo es preponderante para establecer el nivel de toxicidad a la cual se ven sometidos los seres vivos (incluido los vegetales) que habitan tal sistema.

La utilización del método de digestión total en horno microondas para el tratamiento de muestras de suelo, permite minimizar el consumo de reactivos y evitar la pérdida de elementos volátiles. Por lo tanto, este método presenta grandes ventajas para la determinación del contenido de cobre total de muestras de suelo.

5.1.5.2.- Procedimiento:

Se pesó 0,25 g de muestra de sustrato sólido con tamaño de partícula <250 μm , directo en el vaso de teflón del microondas. Se hizo lo mismo con el material de referencia y muestra control de laboratorio. Posteriormente, se colocó el vaso dentro de la carcasa numerada.

Bajo campana, se agregó a la muestra 9 ml de HNO_3 concentrado, 5 ml de HF y 2 ml de H_2O_2 . Se contó con un blanco cada 5 muestras, el cual se compuso solo de los reactivos en los volúmenes mencionados anteriormente. Luego, se puso el vaso cerrado en el rotor de microondas y se selló el sistema. Se digirió las muestras de acuerdo al programa recomendado por el fabricante.

Una vez terminada la digestión, se mantuvo un período de ventilación de 10 min. y luego se sacó el rotor del equipo de microondas para colocarlo en el sistema de enfriamiento durante 10 min. Se destapó los vasos bajo campana, y se colocaron en el rotor de evaporación del sistema microondas para la remoción del HF. El proceso de evaporación se ejecutó hasta que se obtuvo un líquido denso (casi sequedad). Luego, se agregó 5 ml de HNO_3 conc. y se volvió a evaporar.

Se llevó las muestras al sistema de enfriamiento. Luego de enfriar, las muestras fueron aforadas a 25 ml con agua destilada desionizada a pH 5,6 y condicionadas en medio HNO_3 al 2% para una posterior lectura de cobre por Espectroscopia de Absorción Atómica-llama (longitud de onda: 324,8 nm).

Ver apéndice 5 f).

5.1.6.- OBTENCION DEL EXTRACTO DE SATURACION:

5.1.6.1.- Antecedentes generales:

La obtención del extracto de saturación es una medida de la solución del suelo.

La pasta de saturación del suelo es una mezcla particular de suelo y agua, es decir, refleja la luz en la superficie, fluye lentamente cuando se inclina el envase y escurre libre y limpiamente de la espátula. La razón suelo:agua es usada debido a que es la forma más eficiente de obtener suficiente extracto para el análisis. El extracto de pasta saturada que deriva de la pasta de saturación, es una solución acuosa importante ya que muchas propiedades fisicoquímicas del suelo se relacionan con la composición del extracto de saturación, como conductividad eléctrica y la concentración de solutos mayores.

5.1.6.2.- Procedimiento:

Se colocó 200 g de substrato sólido con tamaño de partícula <2 mm en un envase de plástico de 1000 ml. Posteriormente se agregó agua desionizada para llevar la muestra cercana a la saturación y se mezcló con la espátula con un máximo de agitación, para obtener un punto definitivo de saturación. La pasta fue cubierta y dejada en reposo por 24 horas. Al día siguiente, se rechequeó el criterio de saturación, es decir, el agua no debió colectarse en la superficie del substrato, la pasta no debió endurecerse y no debió perder su reflejo después de reposar.

Se calibró pH metro con buffer de pH 7,00 y pH 4,00. Luego, se insertó suavemente el electrodo de vidrio-calomelano dentro de la pasta saturada hasta que la solución de KCl del electrodo se encontró por debajo de la superficie de la pasta saturada, se anotó el pH en el libro de registro del laboratorio. Se repitió el mismo procedimiento con las muestras siguientes.

Una submuestra se usó para determinar el porcentaje de saturación (SP) de cada muestra de tierra de hoja. Para esto, se colocó 20 g de pasta saturada en una

cápsula, y se pesó la cápsula más muestra. Posteriormente, se colocó la cápsula en una estufa a 105 °C, y se dejó durante la noche (24 h). Se sacó las cápsulas de la estufa y se dejaron enfriar en la desecadora por 1 h. Luego, se pesó la muestra de pasta seca en estufa y se registró el peso. Se calculó el PS.

Posteriormente se procedió a la obtención del extracto de saturación. Para esto, se adicionó la pasta saturada a un embudo Büchner, colocando el papel filtro en el centro del embudo. Posteriormente, se colocó el embudo en un matraz kitasato, conectado al sistema de vacío. Se golpeó suavemente el embudo para remover el aire atrapado en la pasta y se procedió a extraer suficiente extracto.

Por último, se filtró el extracto de saturación para prevenir el desarrollo de microorganismos, lo cual se realizó a través de un sistema de microfiltración.

Ver apéndice 5 g).

5.1.7.- PROPIEDADES DEL EXTRACTO DE SATURACION. pH, CONDUCTIVIDAD ELECTRICA Y COBRE SOLUBLE:

5.1.7.1.- Antecedentes generales:

La medición de ciertos parámetros en el extracto de saturación, permite definir el estado de un suelo y los niveles de metales solubles presentes. Por lo tanto, su determinación es esencial para establecer las condiciones de un suelo sometido a niveles metálicos considerables.

La conductividad eléctrica del extracto de saturación es usada como criterio para clasificar un suelo como salino. Otros usos de esta medición incluyen la estimación de la concentración total de cationes en el extracto, porcentaje de sales en solución, porcentaje de sales en el suelo y presión osmótica.

Por su parte, el pH de este extracto permite definir el pH del substrato en condiciones de campo.

Además, el extracto puede ser utilizado para la determinación de cobre soluble, indicando la cantidad de cobre presente en forma soluble en el suelo.

5.1.7.2.- Procedimiento:

a) Conductividad eléctrica (CE)

Se calibró el conductivímetro y celda usando KCl 0,010 N y se ajustó la lectura digital a 1,412.

Posteriormente, se leyó la conductividad del extracto de saturación de cada muestra, insertando el conductivímetro totalmente en la solución, se esperó que la lectura se estabilizara y se registró la CE en el libro de registro del laboratorio.

b) Lectura de pH

Se calibró el pH-metro, usando buffer pH 4 y pH 7. Luego, se leyó el pH del extracto de saturación. Se registró la lectura una vez estabilizada en el libro de registro del laboratorio. Finalmente se lavó el electrodo con agua destilada desionizada a pH 5,6 y se dejó sumergido en una solución de KCl 3M.

c) Determinación de cobre soluble por Absorción Atómica de Llama

Se colocó el recipiente con el extracto bajo la sonda de aspiración del equipo de Absorción Atómica-llama y se leyó el contenido de Cu soluble. Se registró las lecturas obtenidas en el libro de registro del laboratorio.

Ver apéndice 5 h).

5.1.8.- DETERMINACION DE COBRE IONICO MEDIANTE ELECTRODO ESPECIFICO DE COBRE:

5.1.8.1.- Antecedentes generales:

Mediante el extracto de saturación del suelo, es posible determinar el contenido de cobre ionico presente en el sistema, utilizando un electrodo específico de cobre. Asimismo, la determinación del contenido de cobre iónico del suelo permite definir los niveles de cobre biodisponibles para su captación por las plantas, ya que el Cu^{+2} penetra fácilmente a los sistemas vegetales a través de las raíces.

5.1.8.2.- Procedimiento:

Inicialmente se procedió a chequear el electrodo específico de cobre, para lo cual colocó 50 ml de agua destilada desionizada a pH 5,6, 1 ml de ISA y 0,5 ml del estándar de cobre de 1000 mg de Cu/L o del estándar de 0,1M de Cu en la celda de medición y se hizo circular agua a 20°C. Se registró la temperatura, el pH y la lectura en mV del electrodo específico de cobre en el libro de registro. Luego, se agregó 5 ml del estándar de cobre de 1000 mg de Cu/L o del estándar de 0,1M de Cu y se registró la temperatura, el pH y la lectura en mV del electrodo específico de cobre. Se procedió a calcular la diferencia entre las lecturas en mV provenientes de los pasos anteriores, cuya diferencia debe estar entre 25 y 30.

Posteriormente se procedió a calibrar el electrodo específico de cobre utilizando una serie de soluciones de calibración, ingresando la temperatura, el pH y la lectura en mV del electrodo específico de cobre en el libro de registro del laboratorio y en el computador, obteniendo la curva: **mV versus concentración de Cu^{+2}** .

Se filtró las muestras de substrato sólido provenientes del extracto de saturación a través de un filtro de membrana de 0,22 μm , para eliminar las posibles partículas en suspensión y luego se colocó 20 ml de estos en una celda con circulación de agua a 20°C, agregando 0,2 ml de ISA. Se procedió a colocar el

electrodo de pH y el electrodo específico de cobre en la solución y se agitó en forma moderada. Se registró la temperatura, el pH y la lectura en mV del electrodo específico de cobre en el libro de registro.

Una vez conocida la lectura en mV de la muestra, determinada por el electrodo específico de cobre, se recurrió a la ecuación de la recta de la curva de calibración, correspondiente al gráfico mV v/s concentración de Cu^{+2} previamente elaborado, con el fin de determinar la concentración de cobre iónico de cada muestra. Para esto, se interpoló la lectura en mV de cada muestra en la ecuación de la recta del gráfico mV versus concentración de Cu^{+2} .

Luego de realizada las lecturas, se lavó el electrodo específico de cobre, se pulió con huincha pulidora y se dejó en solución de H_2SO_4 0,025M hasta que alcanzó un potencial de -15 mV.

Ver apéndice 5 i).

5.2.- ANALISIS DE MUESTRAS VEGETALES (RAICES Y VASTAGOS):

5.2.1.- PREPARACION DE MUESTRAS VEGETALES:

5.2.1.1.- Antecedentes generales:

La preparación de las muestras vegetales comprende lavado, secado y molienda de las muestras. Este procedimiento es de vital importancia, ya que permite obtener muestras fácilmente digeribles y eliminar aquellas sustancias que pueden interferir en la determinación.

Debido a que por convención internacional, todos los resultados obtenidos en este tipo de determinaciones deben expresarse en base a tejido vegetal seco, el secado de las muestras vegetales hasta peso constante es preponderante para la obtención de resultados mayormente representativos y exactos.

5.2.1.2.- Procedimiento:

Inicialmente, las muestras vegetales fueron registradas en el libro de registro del Laboratorio. Ya que estas muestras habían sido lavadas previamente según metodología EPA, no fue necesario realizar este procedimiento nuevamente.

Posteriormente, se secó las muestras ya lavadas en estufa con aire forzado hasta peso constante y se registró el peso de la muestra seca en el libro de registro.

Debido que la cantidad de muestra vegetal con la que se contaba era muy pequeña, no fue necesario realizar la molienda de esta, pero si fue indispensable unir las 10 réplicas de cada tratamiento.

Por lo tanto, se unió las 10 réplicas correspondientes a cada uno de los 5 tratamientos y se trasvasó el material a un envase plástico. Se registró los datos en la etiqueta del envase y en el libro de registro. Las muestras se guardaron en desecadora, para evitar que absorbieran humedad ambiente.

Ver apéndice 5 j).

5.2.2.- DETERMINACION DE COBRE TOTAL EN MUESTRAS VEGETALES MEDIANTE DIGESTION EN MICROONDAS:

5.2.2.1.- Antecedentes generales:

La determinación del contenido de cobre en los tejidos vegetales permite definir la carga metálica propia de las plantas, además, mediante tal procedimiento es posible determinar a grandes rasgos, el grado de contaminación de una zona determinada.

La digestión húmeda de muestras vegetales utilizando sistemas cerrados permite minimizar el consumo de reactivos y evitar la pérdida de elementos volátiles. De este modo, la digestión en microondas presenta una amplia ventaja ante los otros métodos de descomposición de muestras vegetales, considerando, además, la

relativa rapidez con que este proceso actúa sobre el tejido vegetal para la obtención del extracto. Sin embargo, este método solo permite el procesamiento de unas pocas muestras por digestión, lo cual es un inconveniente cuando se requiere tratar una gran cantidad de muestras.

5.2.2.2.- Procedimiento:

Las muestras de raíces y vástagos fueron trituradas manualmente, evitando la pérdida de muestra. Posteriormente, se pesó en el vaso de teflón del microondas, 0,001-0,039 g de muestra vegetal (el peso varió según disponibilidad de muestra), se hizo lo mismo con el material de referencia y muestra control. Luego, se colocó el vaso dentro de la carcasa numerada y bajo campana se agregó 6 ml de ácido nítrico y 1 ml de peróxido de hidrógeno. Se contó con un blanco cada 5 muestras, el cual estuvo constituido solo por los reactivos en los volúmenes mencionados.

Se selló el sistema y se procedió a digerir las muestras de acuerdo al programa recomendado por el fabricante del equipo de microondas.

Se sacó el rotor del equipo de microondas y se procedió a trasladar los vasos a la unidad de evaporación, donde se evaporó las muestras hasta que se obtuvo un líquido denso. Se colocó los vasos en el sistema de enfriamiento durante 10 min.

Se trasvasó las muestras evaporadas a un matraz de aforo de 10 ml, lavando muy bien el vaso de teflón con agua destilada desionizada, para incluir el lavado dentro del matraz. Posteriormente, se agregó al matraz 1 ml de ácido nítrico al 2% y se aforó con agua destilada desionizada a pH 5,6, para un posterior análisis de cobre por EAA-HG (longitud de onda: 324,8 nm).

Ver apéndice 5 k).

□ OBSERVACIONES:

La totalidad del material fungible, plástico y los recipientes de teflón utilizados en los procedimientos anteriormente mencionados fue lavado de acuerdo al protocolo de lavado descrito en el apéndice 5 a).

Todos los datos obtenidos en las determinaciones realizadas al substrato sólido fueron calculados en base a substrato seco al aire hasta peso constante. Se tomó este criterio, ya que el factor de humedad de las muestras, determinado mediante secado de las muestras a 105°C por 24 horas, demostró que el contenido de agua que permanecía en el substrato sólido luego de ser secado al aire hasta peso constante era mínimo y, por lo tanto, la corrección por el factor de humedad no fue necesaria.

Los procedimientos de análisis utilizados en este estudio, fueron en su mayoría los recomendados por el United States Department of Agriculture (USDA, 1996) o por la Soil Science Society of America. El programa de control y aseguramiento de calidad para monitoreo ambiental fue el recomendado por la Agencia Estadounidense del medio ambiente USEPA (Schumacher et al., 1995). Este programa recomienda la aplicación de un chequeo de calibración, de exactitud, de precisión y de contaminación de acuerdo a la determinación a realizar en el substrato sólido.

5.3.- PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.3.1.- CONTENIDO DE HUMEDAD DE LAS MUESTRAS DE TIERRA DE HOJA:

Una vez llegadas al laboratorio, las muestras de tierra de hoja fueron sometidas a diferentes procedimientos, de acuerdo a los análisis correspondientes.

El código de registro de muestra y el número de laboratorio son las herramientas de identificación de las muestras a lo largo de la serie de análisis. Por su parte, el % de humedad y el factor de humedad de cada muestra son los parámetros que permitieron conocer el contenido de agua del sustrato sólido.

Los pesos, los % de humedad y los factores de humedad correspondientes a cada muestra de sustrato sólido, se indican en la tabla 11.

Tabla 11: Identificación de las muestras de laboratorio y su correspondiente contenido de humedad expresado en % (relacionado con el peso de la muestra seca al aire) y como factor (relacionado con el peso de la muestra seca a 105°C)

Código de registro de Muestra	Nºlaborat	Peso sustrato Húmedo (g)	Peso sustrato Seco al aire (g)	%Humedad	Peso muestra < 2 mm (g)	Peso muestra secada 105°C (g)*	Peso sustrato seco a 105°C (g)	Factor de humedad
Sin trat. Prev.	99SO379	340	221	53,8	213	10,005	9,675	1,03
Control-t	99SO380	359	223	61,0	198	10,004	9,782	1,02
Control-r	99SO381	368	227	62,1	226	10,011	9,798	1,02
CuSO ₄ 10-t	99SO382	360	219	64,4	209	10,008	9,742	1,03
CuSO ₄ 10-r	99SO383	366	220	66,4	221	10,012	9,625	1,04
CuSO ₄ 100-t	99SO384	361	218	65,6	216	10,007	9,711	1,03
CuSO ₄ 100-r	99SO385	359	220	63,2	226	10,008	9,663	1,04
CuO10-t	99SO386	358	215	66,5	205	10,012	9,652	1,04
CuO10-r	99SO387	357	219	63,0	202	10,007	9,741	1,03
CuO100-t	99SO388	357	219	63,0	199	10,004	9,832	1,02
CuO100-r	99SO389	349	216	61,6	203	10,008	9,869	1,01
PROMEDIO				63%				1,03
SD				3,5				9,8E-03

t= muestra testigo, r= réplica.

* Señala el peso de la muestra del sustrato seco al aire tomado para su secado a 105°C.

El % de humedad de las muestras, indicó el contenido de agua presente en el sustrato sólido luego de ser expuesto a un secado al aire hasta peso constante. Por su parte, el factor de humedad de cada muestra se calculó a partir de los valores de sustrato seco al aire y sustrato seco a 105°C por 24 horas, indicando el remanente de agua que permanecía en el sustrato sólido luego de ser secado al aire.

Al analizar los datos mostrados en la tabla 11, se observa que el % de humedad de las muestras de tierra de hoja varía desde un 54% a un 67% aproximadamente, según el tratamiento aplicado. Es necesario recordar que cada una de las muestras de sustrato sólido, fue sometida a continuos riegos durante el ensayo (metodología 4.2.2, pag. 31). Por el contrario, la tierra de hoja sin tratamiento previo no se sometió a riego, por lo tanto, el contenido de humedad determinado es con el que proviene desde su envase. Las pequeñas variaciones encontradas en el % de humedad de las muestras de sustrato sólido sometidas a ensayo (excluyendo la tierra sin tratamiento previo), se pueden atribuir a la gran heterogeneidad del sustrato utilizado, aún después de la homogeneización manual realizada.

Además, se observa que los factores de humedad de todas las muestras de tierra de hoja son pequeños y prácticamente iguales, con un promedio de 1,03; de tal modo, no fue necesario corregir los valores obtenidos en cada una de las determinaciones realizadas.

Por otro lado, fue esencial verificar visualmente la presencia de carbonatos en las muestras de tierra de hoja mediante la aplicación de HCl 1N, con el fin de determinar el contenido de estas sustancias en el sustrato sólido utilizado. De este modo, se observó la aparición reducida de pequeñas burbujas al adicionar HCl al sustrato, comprobando así que la presencia de carbonatos en la tierra de hoja utilizada en el ensayo, es Débil (W) o mínima (apéndice 5 b). Los carbonatos de calcio pueden actuar como un fuerte absorbente de los metales pesados; sin embargo, la escasa presencia de estos en el sustrato utilizado, indicó que probablemente la complejación experimentada por el cobre durante el ensayo, se debería principalmente a la materia orgánica presente en la tierra de hoja.

□ **CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS GENERALES DEL SUBSTRATO SOLIDO:**

Los valores de las características fisicoquímicas generales (%CO, %MO, CIC y pH tanto en agua como en CaCl₂) que presenta el sustrato sólido utilizado en el ensayo según los distintos tratamientos aplicados, se muestran en la tabla 12:

Tabla 12: Características fisicoquímicas generales del sustrato sólido utilizado en los distintos tratamientos

Tratamiento	CIC (meq/100g)	CO (%)	MO (%)	pH	
				Agua	CaCl ₂
Sin tratamiento previo	52,3	31,2	53,9	7,87	7,25
Control	53,2	31,6	54,5	7,75	7,13
CuSO ₄ 10mg/kg	52,8	31,6	54,5	7,77	7,21
CuSO ₄ 100 mg/kg	52,9	31,8	54,8	7,79	7,24
CuO 10mg/kg	53,2	31,6	54,5	7,80	7,20
CuO 100mg/kg	53,4	31,7	54,7	7,74	7,20
PROMEDIO	53,0	31,6	54,5	7,79	7,21
SD	0,39	0,20	0,31	0,047	0,042

5.3.2.- VALORES DE pH DEL SUBSTRATO SOLIDO EN AGUA Y EN CaCl₂:

La determinación de pH de cada una de las muestras de sustrato sólido y sus respectivas réplicas, se realizó 3 veces. Los valores de pH obtenidos tanto en agua como en cloruro de calcio 0,01 M, se muestran en el apéndice 6 a) y un resumen en la tabla 12.

Los criterios utilizados para validar las mediciones de pH fueron:

En cada una de los 3 sets de análisis realizados (15 muestras cada uno), se utilizó 1 muestra en duplicado, 1 muestra control QCPS y 4 chequeos de calibración a pH 4,0. La diferencia absoluta entre los valores de pH para muestras en duplicado no debe variar en más de 0,1 unidades de pH, para considerar un set válido. El valor de pH del QCPS permaneció dentro de 0,1 unidades del pH. Los chequeos de calibración estuvieron dentro de $4,0 \pm 0,05$ unidades de pH. Los valores anteriores indican que los resultados obtenidos fueron ampliamente satisfactorios.

En la tabla 12, se observa que los valores de pH de las muestras de tierra de hoja varían en un rango de 7,74-7,87, en el caso del pH en agua y entre 7,13-7,25 en CaCl_2 . Teóricamente no debiese existir variación entre estas dos medidas de pH. Las variaciones de pH obtenidas, pueden ser atribuidas a que, en medio de CaCl_2 , el catión calcio actúa como floculante, disminuyendo el efecto de suspensión producido en la mezcla tierra:agua; además, la medición del pH en CaCl_2 permite independizarse de la relación sustrato sólido/agua. En este contexto, la determinación de pH en CaCl_2 es más representativa de la acidez del sustrato sólido.

Se debe considerar que a los valores de pH encontrados, se favorece la capacidad amortiguadora de la carga metálica en el sustrato sólido. Además, el pH del sustrato sólido afecta directamente la disponibilidad del cobre para las plántulas, ya que la solubilidad y la formación de complejos dependen de esta variable. De acuerdo a los valores de pH obtenidos, es posible establecer que en el presente ensayo, probablemente la mayor parte del cobre adicionado a la tierra de hoja estaría complejoado con la materia orgánica, por lo tanto, no se encontraría fitodisponible.

Por otro lado, se observa que los valores de pH en agua y en CaCl_2 de las muestras de sustrato sólido, son muy similares entre sí, independiente del tratamiento aplicado en el ensayo, lo cual indica que el cobre adicionado, tanto al estado de sulfato como de óxido de cobre, no afectó mayormente a este parámetro.

5.3.3.- CONTENIDO DE CARBONO ORGANICO DEL SUBSTRATO SOLIDO:

La determinación del contenido de carbón orgánico y del % de materia orgánica de las muestras de sustrato sólido se realizó 3 veces, considerando cada muestra y sus respectivas réplicas. Los resultados obtenidos se dan a conocer en el apéndice 6 b) y un resumen en la tabla 12.

Los criterios utilizados para validar las mediciones de %CO fueron:

Se empleó 1 muestra en duplicado por cada set de 18 muestras. Las determinaciones de carbón orgánico, mostraron que la diferencia porcentual relativa promedio de los valores de %CO de las muestras en duplicado fue de 0,3%. Esto se encuentra dentro del criterio recomendado por Schumacher et al. (1995). El valor de % CO medido en la muestra control QCPS estuvo dentro del 10% del promedio acumulado a lo largo del tiempo, lo que es aceptable. Se empleó 4 blancos de análisis con el fin de estandarizar la solución de sulfato ferroso, encontrándose una deferencia porcentual relativa de un 0,4%.

En la tabla 12 se observa que los valores de % CO del sustrato sólido varían en un rango de 31,2%-31,8% y los valores de % MO varían entre 53,9%-54,8%, lo cual indica un contenido de materia orgánica anormalmente alto en relación con la de los suelos normales. Estos resultados eran hasta cierto punto predecibles, ya que el sustrato sólido estaba constituido solo de tierra de hoja.

Dado que el sustrato sólido utilizado presenta un alto contenido de materia orgánica, podría esperarse que la mayor parte del cobre adicionado durante el ensayo fuese complejado, lo cual trae como consecuencia la retención de los contaminantes metálicos, en especial del cobre, en el sustrato sólido.

La disminución del contenido de materia orgánica entre la tierra de hoja sin tratamiento previo y el control, se debió probablemente a que una pequeña parte de la materia orgánica fue asimilada por las plántulas.

Además, la variación del % CO y del % MO entre cada una de las muestras sometidas a los distintos tratamientos es mínima, por lo tanto, este parámetro tampoco se vio afectado por las adiciones de cobre realizadas en el ensayo.

5.3.4.- DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO (CIC):

La determinación de la CIC para cada una de las muestras de sustrato sólido considerando sus respectivas réplicas, fue efectuada 3 veces. Los valores obtenidos se indican en el apéndice 6 c) y un resumen en la tabla 12.

Los criterios utilizados para validar las mediciones de CIC fueron:

Los sets de análisis de 25 muestras contaban con 1 muestra en duplicado y 1 muestra control, denominada con la sigla QCPS. La diferencia porcentual relativa entre las muestras en duplicado debe ser inferior al 10%. Los resultados de análisis para la muestra control QCPS en cada set permanecieron dentro del 10% del promedio acumulado para esta muestra, permitiendo catalogar los resultados como satisfactorios.

La capacidad de intercambio catiónico de las muestras de sustrato sólido varió en el rango de 52,3-53,4 meq/100g, lo cual indica una alta cantidad de cationes intercambiables que el sustrato sólido puede absorber.

Los altos valores de CIC encontrados, se atribuyen a los altos contenidos de MO, principalmente a los ácidos húmicos y fúlvicos presentes en el sustrato utilizado en el ensayo. Tal efecto, es producido por la disociación de los iones H^+ de los grupos funcionales de la MO de la tierra de hoja y por un consecuente intercambio catiónico.

Por lo tanto, el mecanismo por el cual los cationes Cu^{+2} podrían reemplazar a otros iones que se encuentran en la tierra de hoja, sería la disociación de los grupos funcionales de los compuestos orgánicos presentes en el sustrato sólido, como los ácidos húmicos y fúlvicos, los cuales en solución liberan protones y atraen cationes como el cobre.

No se observa una variación notoria de los valores de CIC entre las distintas muestras, de tal modo que este parámetro no se vio afectado por el cobre adicionado en cada uno de los tratamientos del ensayo. Esto puede ser atribuido a la alta relación que existe entre la CIC y el %MO.

Considerando que se utilizó un mismo sustrato sólido en los distintos tratamientos, era de esperar un rango de variación restringido con respecto a las características fisicoquímicas generales de las distintas muestras, independiente de la concentración y del tipo de compuesto de cobre adicionado en el sustrato.

□ **ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS:**

Para la realización de un análisis estadístico basado en las diferencias producidas entre las características fisicoquímicas generales del sustrato sólido enriquecido con CuSO_4 y con CuO , solo fue posible aplicar estadística no paramétrica (Test de los Signos), ya que se utilizó un número bajo de réplicas en cada determinación. Para la aplicación de este test, se utilizó el paquete estadístico Statistica para Windows (StatSoft, 1993).

Para el tratamiento estadístico de datos, se dividieron los resultados en 2 grupos. El primero estuvo constituido por: sin tratamiento previo, control, CuSO_4 10 mg/kg y CuSO_4 100 mg/kg; el cual se comparó con el segundo grupo, en relación a cada una de las características fisicoquímicas estudiadas: sin tratamiento previo, control, CuO 10 mg/kg y CuO 100 mg/kg, tomando como hipótesis nula (H_0) que la diferencia media entre ambos grupos es cero.

Utilizando el Test de los Signos, se obtuvo los siguientes resultados:

- 1) **CIC:** $P=0,480 \Rightarrow$ acepto la hipótesis.
- 2) **%CO:** $P=0,480 \Rightarrow$ acepto la hipótesis.
- 3) **%MO:** $P=0,480 \Rightarrow$ acepto la hipótesis.
- 4) **pH en agua:** $P=0,480 \Rightarrow$ acepto la hipótesis.
- 5) **pH en CaCl_2 :** $P=0,480 \Rightarrow$ acepto la hipótesis.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se comprobó estadísticamente que no existen diferencias entre cada una de las características fisicoquímicas determinadas en el sustrato sólido enriquecido con CuSO_4 y las del sustrato enriquecido con

CuO, lo cual ratifica que la aplicación de diferentes compuestos de cobre no afectó las características fisicoquímicas generales del sustrato sólido.

5.3.5.- CONTENIDO DE COBRE TOTAL EN EL SUBSTRATO SOLIDO:

Para conocer el contenido de cobre total experimental en el sustrato sólido, luego de las adiciones realizadas en el ensayo, se llevaron a cabo las determinaciones correspondientes a cobre total.

Las concentraciones de cobre total encontradas en cada una de las muestras de tierra de hoja, según el tratamiento aplicado en el ensayo, se indican en el apéndice 7 a) y resumidamente en la tabla 13.

Tabla 13: Concentración de cobre total en las muestras de sustrato sólido según tratamiento aplicado en el ensayo.

Tratamiento	Cu total en el sustrato sólido (mg/kg)
Sin tratamiento previo	38,04
Control	37,25
CuSO ₄ 10 mg/kg	51,44
CuSO ₄ 100 mg/kg	139,8
CuO 10 mg/kg	51,01
CuO 100 mg/kg	132,3

En la tabla 13, se observa que la adición tanto de sulfato como de óxido de cobre, tuvieron un efecto similar sobre el substrato sólido. Tal efecto, es atribuible al alto grado de descomposición que experimentaron las muestras de substrato sólido a través del proceso de digestión al cual fueron sometidas. Sin embargo, se debe tener presente, que el CuO es un compuesto refractario, por lo tanto, cabe la posibilidad de obtener concentraciones de cobre total menores en aquellas muestras de substrato sólido enriquecidas con CuO, en comparación con las muestras de substrato enriquecidas con CuSO₄, lo cual no se evidencia notoriamente en el presente caso.

Los contenidos de cobre total del substrato sólido, variaron desde los 37,25 mg/kg, que corresponde al substrato sólido control, hasta los 139,8 mg/kg, que corresponde al substrato sólido enriquecido con 100 mg/kg de CuSO₄.

Los niveles de cobre presentes en el substrato sólido sin tratamiento son netamente naturales, los cuales provienen del contenido de cobre propio de los componentes de la tierra de hoja utilizada en el ensayo, como hojas, corteza de pino y otros compuestos orgánicos.

Además, es importante hacer notar que la disminución en la concentración de cobre total en el substrato sólido sin tratamiento previo con respecto al control, se debería posiblemente a la captación de cobre realizada por las plántulas durante el periodo de ensayo.

Con el fin de determinar la cantidad de cobre adicionada al substrato sólido y para conocer el nivel de error alcanzado en esta práctica, se restó la concentración de cobre total del control a cada una de las concentraciones de cobre total experimental de los tratamientos sometidos a adiciones de cobre, ya sea en forma de sulfato u óxido de cobre. Las concentraciones de cada uno de los tratamientos corregidas por el control se muestran en la tabla 14.

Tabla 14: Concentración de cobre total experimental de cada una de las muestras de sustrato sólido sometidas a tratamientos con cobre y su respectiva corrección por la concentración de cobre total del control.

Tratamiento (Conc. teórica)	Conc. Cu Total experimental (mg/kg)	Conc. Cu Total corregida (mg/kg)	Δ entre la conc. corregida y la teórica
CuSO ₄ 10 mg/kg	51,44	14,19	+4,19
CuSO ₄ 100 mg/kg	139,8	102,55	+2,55
CuO 10 mg/kg	51,01	13,76	+3,76
CuO 100 mg/kg	132,3	95,05	-4,95

De la tabla 14 se extrae que las concentraciones de cobre total corregidas de cada una de las muestras de sustrato sólido enriquecidas con cobre, son muy similares a las concentraciones teóricamente adicionadas, tanto de CuSO₄ como de CuO. Estos resultados indican una independencia de la forma química en la que se agregó el cobre.

Al analizar los datos mostrados en la tabla 14, se observa que las diferencias entre la concentración de cobre total corregida y la teórica de los tratamientos sometidos a una menor concentración de cobre (10 mg/kg), son levemente superiores a las diferencias evidenciadas por los tratamientos sometidos a mayores adiciones de cobre (100 mg/kg). Tales resultados pueden atribuirse a errores experimentales, en particular, a un error en la pesada del compuesto de cobre al momento de ser adicionado al sustrato, ya que se trabajó con cantidades muy pequeñas (del orden de los 0,008 g).

Por otro lado, es curioso que solo el sustrato sólido enriquecido con 100 mg/kg de CuO haya experimentado una leve disminución de su concentración de cobre total experimental (-4,95) en relación con la concentración teóricamente adicionada, ya que se esperaba que parte del cobre adicionado durante el ensayo se solubilizase y lixiviasse por efecto del riego realizado en el ensayo. Por lo tanto, se puede deducir que la totalidad del cobre adicionado al ensayo fue complejado rápidamente por la materia orgánica presente en la tierra de hoja, lo cual evitó la

solubilización y lixiviación del cobre. A pesar de lo anterior, todas las fluctuaciones encontradas, tanto positivas como negativas, se encuentran dentro del error experimental aleatorio.

□ **ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE REFERENCIA UTILIZADAS:**

La determinación del contenido de cobre en el presente estudio fue realizada 3 veces, donde la secuencia de análisis consistió de 12 muestras, 3 blancos, 1 duplicado, 1 muestra de referencia (High Purity Standards, Soil Loam B), y 1 muestra de control de calidad (QCPS), para cumplir con los criterios de calidad requeridos.

El contenido de cobre total promedio \pm error estándar del Material de Referencia Soil Loam B (High Purity Standards, lote 691029) especificado por el fabricante del material es de 54 ± 3 mg/kg de suelo seco. Asimismo, la concentración de cobre total determinada en este estudio para dicho material fue de $56,2 \pm 0,6$ mg/kg de suelo seco. Estos resultados indican que se logró un nivel de exactitud aceptable para el cobre, ya que la variación de $\pm 2,2$ mg/kg se encuentra dentro del rango recomendado por el fabricante del material de referencia.

Todos los blancos analizados, arrojaron valores de concentración de cobre por debajo del límite de detección de la técnica utilizada (FAAS), indicando que no hubo contaminación en la etapa de digestión y de trasvase de muestras.

Finalmente, los contenidos de cobre determinados en una muestra control, denominada con la sigla QCPS (Schumacher et al. 1995), analizada en cada set de análisis, fue igual a $726,9 \pm 4,5$ mg/kg de suelo seco. Los valores de cobre en la muestra control QCPS determinados en cada set válido, estuvieron dentro de 10% del valor promedio acumulado a lo largo del tiempo. Esto se encuentra dentro de lo recomendado por Schumacher et al. (1995).

5.3.6.- RESULTADOS DE LOS PARAMETROS DETERMINADOS POR LA PASTA DE SATURACION:

Los valores de los parámetros, tales como pH y % de saturación, determinados en la pasta de saturación (tabla 15), reflejan el comportamiento del sustrato sólido bajo condiciones de campo, es decir, bajo un suministro hídrico tal, que el sustrato sólido alcanza su saturación, para lo cual se siguió el criterio de Rhoades (1982).

Si bien estos parámetros se utilizan fundamentalmente para determinar las condiciones de los suelos agrícolas, éstos pueden servir de criterio para la determinación del cobre soluble e iónico en las muestras de sustrato sólido sometidas a los distintos tratamientos de ensayo.

Tabla 15: Valores de pH y % de saturación del sustrato sólido por pasta saturada.

Tratamiento	pH pasta saturada	% de Saturación (gr agua/gr ss)*
Sin tratamiento previo	7,31	135,1
Control	7,27	146,2
CuSO ₄ 10 mg/kg	7,26	127,7
CuSO ₄ 100 mg/kg	7,27	143,5
CuO 10mg/kg	7,23	115,7
CuO 100mg/kg	7,23	137,9

*unidad en la que se presenta el porcentaje de saturación, la cual está dada por= (gramos de agua/ gramos de sustrato seco al aire)

5.3.6.1.- pH de la pasta de saturación:

Los resultados indicados en la tabla 15, muestran que los valores de pH obtenidos mediante la pasta de saturación varían entre 7,23 y 7,31, y son similares a los pH medidos en CaCl_2 0,01M, lo cual es de gran interés puesto que asegura la factibilidad de utilizar este substrato en prácticas agrícolas, ya que la pasta de saturación es un simulacro de lo que ocurre en terreno. A estos valores de pH, se favorece la complejación de una gran cantidad de metales pesados, con la consecuente disminución del riesgo de contaminación del suelo. Sin embargo, aunque a pH neutros-alcálinos, se ve favorecida la formación de complejos, se debe tener en consideración que también se ve favorecida la formación de especies hidroxiladas de ciertos cationes, lo cual podría producir una competencia de complejantes. La formación de especies hidroxiladas depende fuertemente del catión en cuestión.

5.3.6.2.- Porcentaje de saturación:

En la tabla 15 se observa que los porcentajes de saturación de las muestras de substrato sólido varían entre un 116% y un 146%, por lo tanto, son muy superiores a los valores mostrados por los suelos normales. Estos resultados se deben a que el substrato utilizado en el ensayo es altamente orgánico, por lo tanto, necesita una gran cantidad de agua para lograr la saturación.

Por otro lado, se observa una cierta variación en los porcentajes de saturación de acuerdo al tratamiento aplicado, lo cual se debe probablemente a la alta heterogeneidad en la composición del substrato sólido utilizado en el presente estudio.

con la materia orgánica presente en la tierra de hoja. Sin embargo, nuevamente es importante considerar la posible formación de especies hidroxiladas, lo cual depende ampliamente del tipo de catión.

5.3.7.2.- Conductividad eléctrica del extracto de saturación:

Los valores de conductividad eléctrica obtenidos en este estudio, se muestran en la tabla 16.

Los resultados obtenidos en este caso, indican que las conductividades eléctricas de los extractos pertenecientes a cada una de las muestras de sustrato sólido fueron bastante altas, ya que variaron entre los 1,09 y 3,98 dS/m.

Dado los resultados obtenidos, es posible, por convención, establecer que a medida que aumenta la conductividad eléctrica, aumentan los iones en solución. Por lo tanto, de la tabla 16 se observa que el mayor valor de conductividad eléctrica lo presenta el extracto proveniente del tratamiento con CuSO_4 100 mg/kg, corroborando la afirmación anterior, puesto que el sulfato de cobre al presentar una solubilidad en agua mayor que el óxido de cobre, presenta una mayor cantidad de iones en solución y, por ende, una mayor conductividad. Asimismo, se observa que las conductividades eléctricas de los extractos provenientes de las muestras de tierra de hoja enriquecidas con 10 y 100 mg/kg de CuO , son bajas y muy similares entre sí, debido a la baja solubilidad de este compuesto.

Las conductividades eléctricas más bajas las presenta la tierra de hoja sin tratamiento previo y el control, los cuales no se sometieron a ningún tipo de carga metálica, de tal modo, no presentan una gran cantidad de iones en solución.

5.3.7.3.- Contenido de cobre soluble de las muestras de substrato sólido:

Las concentraciones de cobre soluble de cada una de las muestras de tierra de hoja, tanto enriquecidas como no enriquecidas con cobre, se muestran en apéndice 7 a) y un resumen en la tabla 17.

Al observar los valores obtenidos, se evidencia que los contenidos de cobre soluble de las muestras de substrato sólido variaron entre los 0,013-0,194 mg/kg. Estas concentraciones están estrechamente relacionadas con los contenidos de cobre total de las muestras de substrato sólido, indicando que a medida que existe una mayor concentración de cobre total, el contenido de cobre soluble aumenta. Las relaciones establecidas entre los contenidos de cobre total y soluble de las muestras de substrato sólido sometidas a ensayo son analizadas posteriormente.

Los valores encontrados, indican que probablemente una gran parte del cobre fue complejado por la materia orgánica del substrato sólido, ya que al comparar la concentración de cobre soluble con la concentración de cobre total, se observa una disminución marcada según el tratamiento aplicado.

Por lo tanto, los niveles de cobre soluble determinados en el presente ensayo indican que solo una pequeña fracción del cobre total se encuentra en forma soluble o disuelta en la solución del substrato sólido, de tal modo, la fracción fitodisponible es aún menor.

5.3.7.4.- Contenido de cobre iónico de las muestras de substrato sólido:

Las concentraciones de cobre iónico de las muestras de substrato sólido obtenidas en este estudio, se presentan en el apéndice 7 b) y resumidamente en la tabla 17. Estos valores se obtuvieron interpolando los mV leídos en un electrodo específico de cobre, en la curva mV v/s concentración de Cu^{+2} ($Y = 12,332 \ln(X) + 235,47$), donde: Y= mV leídos; X= Concentración de cobre iónico en moles/L.

La ecuación de la curva de calibración es válida en el rango de concentración de $10^{-5} - 10^{-13}$ M.

Además, se presume que la fuerza iónica aportada por los cationes presentes en el sustrato sólido utilizado en este estudio, es despreciable frente a la fuerza iónica brindada por el nitrato de sodio 0,05 M adicionado en cada una de las mediciones realizadas con el electrodo específico de cobre (solución de ajuste fuerza iónica ISA, ORION). De este modo, las condiciones para la determinación del contenido de cobre iónico de las muestras sólidas serían apropiadas.

En la tabla 17, se observa que al aumentar la concentración de cobre total, aumenta el contenido de cobre iónico de las muestras de sustrato sólido, según el tratamiento aplicado. La significación de esta relación será revisada posteriormente.

Los valores de cobre iónico encontrados en el presente estudio variaron entre $7,93E-11$ mg/kg y $2,06E-7$ mg/kg y se encuentran dentro del rango de linealidad de la curva de calibración. Además, se observa que estos valores fueron muy pequeños en comparación con el contenido de cobre total del mismo sustrato, lo cual se debería a la gran capacidad complejante del cobre que posee la materia orgánica presente en el sustrato sólido.

La determinación de la concentración de cobre iónico es de gran importancia, ya que este es el cobre que se encuentra biodisponible para las plantas, considerando que el cobre en su estado iónico (Cu^{+2}), penetra fácilmente a la planta mediante el sistema radical principalmente. Sin embargo, la concentración de cobre iónico en el suelo depende fuertemente del pH y del contenido de MO.

Normalmente los suelos, tanto agrícolas como de cualquier otro tipo, presentan contenidos de materia orgánica muy inferiores al que presenta el sustrato sólido utilizado en este ensayo, por lo tanto, cabe la posibilidad que sus contenidos de cobre iónico sean mucho más altos que los encontrados en este estudio, con el consecuente riesgo para la salud de plantas, animales y del hombre.

Existen estudios que indican que el cobre en la solución del suelo no se encuentra mayoritariamente en forma catiónica, sino más bien como complejos estables con compuestos orgánicos frecuentemente de alto peso molecular; por lo tanto, los resultados obtenidos en el presente ensayo confirman tales estudios, ya

que el contenido de cobre iónico encontrado en cada una de las muestras de substrato sólido es ínfimo.

Para una mejor evaluación de los contenidos de cobre total, cobre soluble y cobre iónico presentes en el substrato sólido sometido a los distintos tratamientos y, además, para analizar las grandes diferencias establecidas entre una y otra forma química, es útil observar la tabla 17.

Tabla 17: Especiación del cobre (Cu total, Cu soluble y Cu iónico) en el substrato sólido sometido a los distintos tratamientos.

Tratamiento	Cu total (mg/kg)	Cu soluble (mg/kg)	Cu iónico (mg/kg)
Sin tratamiento previo	38,04	0,018	2,51E-10
Control	37,25	0,013	7,93E-11
CuSO ₄ 10 mg/kg	51,44	0,068	2,95E-08
CuSO ₄ 100 mg/kg	139,8	0,194	2,06E-07
CuO 10mg/kg	51,01	0,050	1,34E-08
CuO 100mg/kg	132,3	0,081	2,66E-08

En la tabla 17, se observa que la mayor parte del cobre total presente en cada una de las muestras de substrato sólido, no se encuentra disponible para su captación por las plántulas, ya a que el contenido de cobre soluble es evidentemente menor que el contenido de cobre total. La concentración de cobre iónico es aún menor, puesto que solo considera al cobre en su forma iónica (Cu⁺²). El cobre soluble está compuesto tanto por el cobre iónico como por el cobre unido a moléculas solubles en agua y a complejos solubles.

Debido a que solo una ínfima fracción del cobre total presente en el sustrato sólido se encontró fitodisponible, no se evidenciaron efectos de fitotoxicidad en la mayor parte de las plántulas mantenidas en este sustrato sólido.

Los resultados obtenidos permiten deducir que el alto contenido de materia orgánica que posee el sustrato sólido utilizado, fue uno de los principales responsables del bajo contenido de cobre soluble y cobre iónico encontrados en las muestras, a pesar de la alta carga de cobre adicionada. Tal efecto, sería producto de la complejación del cobre por las moléculas orgánicas presentes, lo que conllevó a una baja disponibilidad de cobre para las plantas. Además, el pH de la tierra de hoja (neutro-básico) favorecería la insolubilización de estos complejos.

Ya que la unión del cobre con la materia orgánica puede ser vista como un proceso de intercambio iónico entre los protones (H^+) y los iones cobre sobre los grupos funcionales ácidos de la MO, se establece que a concentraciones relativamente altas de cobre, usualmente se promueve la formación de una gran cantidad de complejos poco solubles. De aquí, que a pesar de la aplicación de dosis relativamente altas de cobre al sustrato sólido, solo una pequeña fracción de este cobre esté fitodisponible.

5.3.8.- CONTENIDO DE COBRE EN RAICES Y VASTAGOS DE LAS PLANTULAS SOMETIDAS A ENSAYO:

Para la determinación de metales pesados tanto en raíces como en vástagos de las plántulas sometidas a ensayo, fue necesario unir las 10 réplicas de cada uno de los 5 tratamientos, debido al escaso peso que constituía cada estructura vegetal por separado. Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta determinación, deben ser analizadas bajo estas consideraciones.

Las concentraciones de cobre, único metal adicionado en el ensayo, encontradas tanto en las raíces como en vástagos de las plántulas de *Noticastrum sericeum* sometidas a los distintos tratamientos, se indican en la tabla 18.

Tabla 18: Contenido de cobre en las raíces y vástagos de plántulas de *Noticastrum sericeum* según tratamiento aplicado en el ensayo.

Tratamiento	Conc. De Cu en raíces (mg/kg)*	SD	Conc. de Cu en vástagos (mg/kg)*	SD
Control substrato líquido	3,8	0,01	1,6	0,04
CuSO ₄ 10 mg/L solución	714,0	1,32	271,0	2,47
CuSO ₄ 100 mg/L solución	8110,0	2,26	1245,0	3,87
CuO 10 mg/L solución	415,0	1,04	78,7	2,71
CuO 100 mg/L solución	2265,0	2,50	184,7	2,64
Control substrato sólido	20,4	1,14	2,3	0,05
CuSO ₄ 10 mg/kg sólido	48,3	3,27	19,9	2,47
CuSO ₄ 100 mg/kg sólido	130,4	4,58	29,7	2,15
CuO 10 mg/kg sólido	28,2	3,28	11,2	2,81
CuO 100 mg/kg sólido	46,3	2,89	20,7	2,01

*indica los mg de cobre por kg de tejido vegetal seco X 10 plántulas.

Para la realización de la determinación de cobre total en los tejidos vegetales se utilizó GFAAS como técnica analítica, debido a su mayor sensibilidad y exactitud. Además se debe considerar que se contaba con escasa muestra, por lo tanto, no fue posible utilizar otra técnica espectroscópica, debido al mayor volumen de extracto requerido.

En la tabla 18, se observa que las mayores concentraciones de cobre se presentan en las plántulas mantenidas en substrato líquido (solución de Ca(NO₃)₂ 0,5 g/L). Tales resultados se deberían a que en solución, el cobre adicionado se encuentra más biodisponible para su captación por las plantas que en el caso del

substrato sólido, resaltando nuevamente la gran capacidad complejante que presenta la materia orgánica de la tierra de hoja utilizada en este estudio.

5.3.8.1.- Contenido de cobre en raíces:

En la tabla 18, se observa que los niveles de cobre en las raíces de las plántulas mantenidas en solución son muy superiores a los encontrados en las raíces de las plántulas crecidas en substrato sólido, lo cual se debería esencialmente a que en solución, el cobre se encontró más disponible para su captación por las plantas, puesto que en este medio, no existen sustancias que complejen al metal. Además, se observan grandes variaciones en las concentraciones de cobre de estas raíces de acuerdo al tratamiento aplicado, debido a las diferentes adiciones de cobre realizadas.

En las raíces de las plántulas crecidas en substrato sólido, también se observan variaciones en las concentraciones de cobre de acuerdo al tratamiento aplicado, aunque de menor relevancia que en el caso de las plántulas mantenidas en solución.

Para realizar un análisis más acabado de los resultados obtenidos en este caso, se debe considerar que no se efectuó la determinación del contenido de cobre en cada una de las raíces y vástagos de las plántulas sometidas a ensayo, debido al bajo peso de estas estructuras. Por lo tanto, el análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio se ve limitado por la complejidad de las condiciones de trabajo a la cual se obtuvieron estos resultados, ya que la determinación del contenido de cobre en los vegetales se efectuó uniendo los tejidos vegetales de las 10 réplicas de cada tratamiento.

Las diferencias considerables en los pesos secos de cada raíz y cada vástago de las plántulas sometidas a un mismo tratamiento (tabla 10), hace difícil el conocimiento del contenido de cobre en cada una de estas estructuras vegetales por separado. Sin embargo, es factible establecer ciertas aproximaciones del contenido de cobre en cada estructura vegetal de las plántulas mantenidas en solución, en base

a las grandes variaciones de los contenidos de cobre de estas plántulas según el tratamiento aplicado. Por lo tanto, el cálculo del contenido de cobre de cada una de las raíces y de cada vástago podría proporcionar resultados representativos. En el caso de las plántulas en substrato sólido, se debe considerar que las variaciones en los contenidos de cobre de las raíces y vástagos fueron menos relevantes que en el caso de las plántulas en solución, además, los pesos de cada estructura vegetal también presentaron variabilidad según el tratamiento aplicado. Por lo tanto, establecer aproximaciones del contenido de cobre en cada raíz y en cada vástago, involucra la obtención de resultados menos representativos que en el caso de las plántulas en solución.

5.3.8.1.1.- Contenido de cobre en raíces de plántulas cultivadas en substrato líquido:

Considerando la que el cálculo de la concentración de cobre en cada una de las 10 raíces de plántulas mantenidas en cada uno de los 5 tratamientos en solución proporciona resultados representativos, se efectuó el cálculo correspondiente del contenido de cobre en cada raíz de las plántulas en solución sometidas a ensayo.

En la tabla 18, se observa que en el caso del control-líquido, los niveles de cobre en las raíces son bastante bajos, incluso podrían catalogarse como deficitarios para el desarrollo normal de la planta. Considerando que la concentración de cobre determinada en este estudio correspondió a la unión de las 10 réplicas del tratamiento, la concentración de cobre aproximada de cada raíz sería de 0,4 mg/kg, lo cual es extremadamente bajo para el desarrollo normal de las plantas.

Contrariamente, las concentraciones de cobre en las raíces de las plántulas sometidas a tratamientos con CuSO_4 10 y 100 mg/L-solución, son extremadamente altas y tóxicas para el desarrollo normal de las plantas, lo cual se comprobó con las observaciones visuales realizadas al estado de cada una de las plántulas, ya que la necrosidad de las raíces fue notoria desde los primeros días de realizado el ensayo.

Al dividir la concentración determinada por las 10 réplicas, se encontró que cada raíz de las plántulas mantenidas en solución enriquecida con 10 mg/L de CuSO_4 contenían aproximadamente 71 mg/kg. El mismo fenómeno ocurrió con las raíces de las plántulas sometidas a tratamiento con de CuSO_4 100 mg/L-solución, donde la concentración de cobre en cada una de las raíces de estas plántulas fue alrededor de 811 mg/kg.

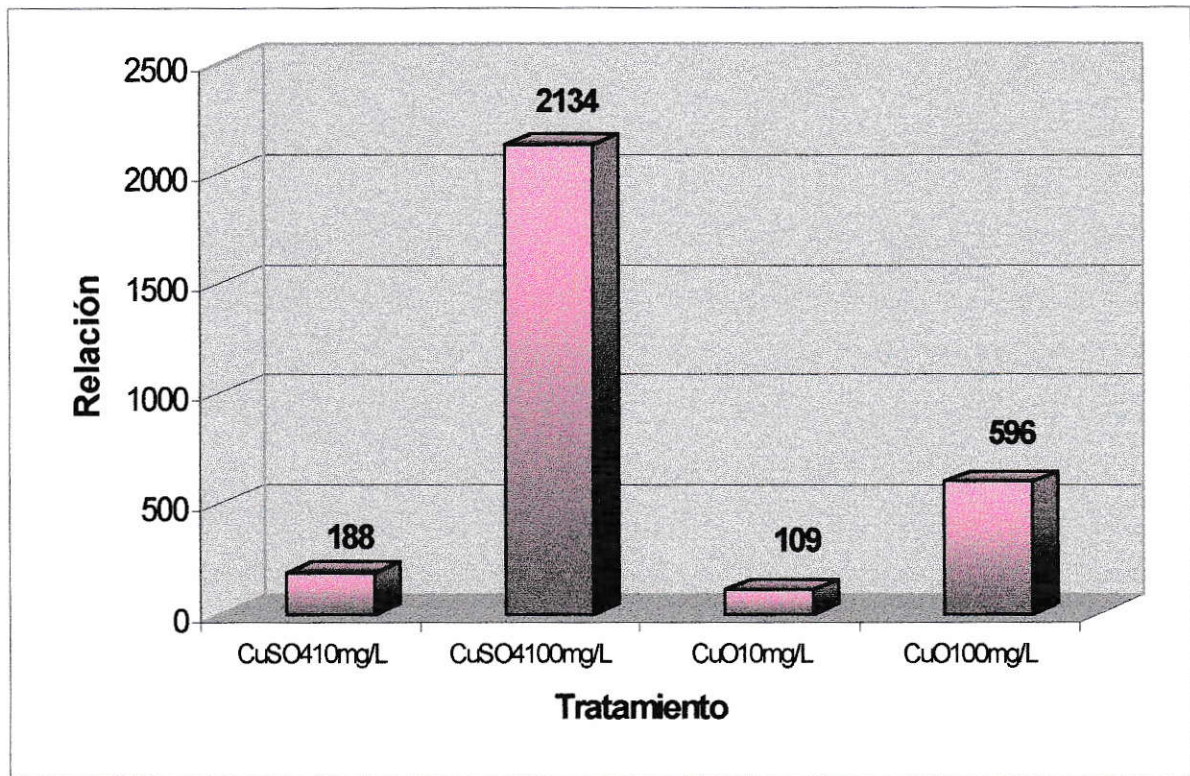
En el caso de las raíces de las plántulas mantenidas en solución enriquecida con 10 y 100 mg/L de CuO , nuevamente se encontró concentraciones altas de cobre, sin embargo, no fueron suficientes como para producir necrosis de la raíz en la totalidad de las réplicas. Cada raíz de las plántulas mantenidas en solución enriquecida con 10 mg/L de CuO , contenía 42 mg/kg de cobre aproximadamente. Con respecto a las raíces de las plántulas sometidas a adiciones de 100 mg/L de CuO , cada raíz presentó una concentración cercana a los 227 mg/kg. Los contenidos de cobre en las raíces de las plántulas sometidas a adiciones de CuO , fueron notoriamente menores que en el caso de las plántulas mantenidas en solución sulfatada. Sin embargo, se debe considerar que el CuO es un compuesto altamente insoluble en agua, por lo tanto, las concentraciones de cobre en las raíces de las plántulas sometidas a adiciones de este compuesto, fueron superiores a lo esperado. Los niveles relativamente altos de cobre en las raíces de las plántulas mantenidas en solución enriquecida con CuO , se atribuyen a la adsorción del CuO por las raíces de estas plántulas, lo cual es ratificado por los altos contenidos de cobre encontrados en las raíces en comparación con los niveles de cobre de los vástagos de estas plantas.

Por otra parte, una forma de visualizar el incremento en los niveles de cobre de las raíces de las plántulas sometidas a adiciones de cobre en comparación con los niveles de cobre determinados en las raíces de las plántulas en tratamiento control, es mediante la realización de proporciones.

Las proporciones calculadas en el caso de las plántulas cultivadas en soluciones enriquecidas con cobre (contenido de cobre en raíces de las plántulas sometidas a adiciones de cobre/contenido de cobre en raíces de las plántulas en

tratamiento control-líquido), para cada uno de los tratamientos aplicados, se indican en la figura 24.

Figura 24: Relaciones entre la concentración de cobre en las raíces de las plántulas cultivadas en soluciones enriquecidas con cobre y la concentración de cobre en las raíces de las plántulas mantenidas en control-líquido.



Los contenidos de cobre en las raíces de las plántulas mantenidas en soluciones enriquecidas con CuSO₄ y con CuO, fueron de 109 (CuO 10 mg/L) a 2134 (CuSO₄ 100 mg/L) veces mayor que el contenido de cobre en las raíces de las plántulas en tratamiento control-líquido.

Los cálculos anteriores indican que las relaciones: contenido de cobre en raíces de plántulas sometidas a adiciones de cobre/contenido de cobre en raíces de plántulas en tratamiento control-líquido, fueron superiores en aquellas plántulas mantenidas en solución sulfatada que en las plántulas mantenidas en solución

enriquecida con CuO, lo cual se debería esencialmente a la alta solubilidad del CuSO₄ en comparación con la solubilidad del CuO.

5.3.8.1.2.- Contenido de cobre en raíces de plántulas cultivadas en substrato sólido:

Pese a la baja representatividad que involucra el cálculo del contenido de cobre en cada raíz de las plántulas mantenidas en substrato sólido, se efectuó tales aproximaciones gruesas con el fin de establecer la cantidad de cobre presente en las raíces de cada una de las 10 réplicas.

En la tabla 18 se observa que los niveles de cobre en las raíces de las plántulas crecidas en control-sólido son adecuados para un desarrollo normal de la planta, encontrándose que cada raíz contenía aproximadamente 2 mg/kg de cobre, el cual debió provenir del contenido de cobre propio del substrato sólido, ya que a este tratamiento no se le adicionó cobre en ninguna forma química; sin embargo, los niveles de cobre iónico de la tierra de hoja control son bastante inferiores al contenido exhibido por las raíces, por lo cual no se descartan errores experimentales.

Los contenidos de cobre de las raíces de las plántulas crecidas en el tratamiento con CuSO₄ 10 mg/kg-sólido, son superiores a los niveles de cobre mostrados por las plántulas en tratamiento control, encontrándose que cada raíz contenía aproximadamente 5 mg/kg de cobre, lo cual constituye una concentración adecuada para el desarrollo normal de la planta. Por su parte, cada una de las raíces de las plántulas crecidas en substrato sólido enriquecido con 100 mg/kg de CuSO₄ presentó una concentración de cobre de 13 mg/kg aproximadamente, lo cual es muy superior a los niveles de cobre encontrados en las raíces de las plántulas en control-sólido debido a la adición de cobre realizada; sin embargo, estos niveles de cobre no llegaron a ser visiblemente tóxicos para las plántulas.

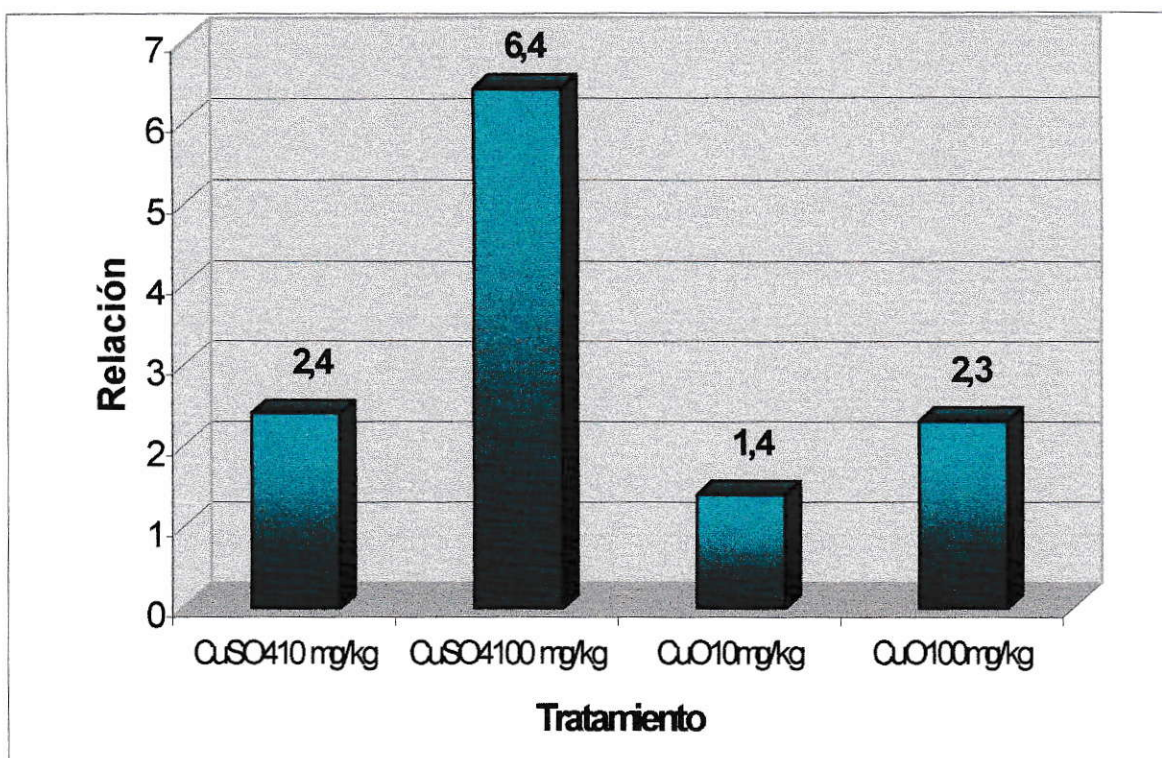
Las concentraciones de cobre de las raíces de las plántulas crecidas en substrato sólido enriquecido con 10 mg/kg de CuO, fueron muy similares a las

encontradas en las raíces de las plántulas sometidas a tratamiento control-sólido, encontrándose que cada raíz contenía alrededor de 3 mg/kg de cobre, constituyendo un nivel adecuado para el crecimiento normal de la planta. Por último, los niveles de cobre en las raíces de las plántulas crecidas en tratamiento con CuO 100 mg/kg-sólido, fueron iguales a los niveles de cobre determinados en las raíces de las plántulas mantenidas en solución enriquecida con 10 mg/kg de CuSO₄, encontrándose que cada raíz contenía alrededor de 5 mg/kg de cobre, lo que constituye un nivel adecuado para el desarrollo normal de la planta.

Considerando que la fisiología de las plantas y el tiempo de exposición tienen una influencia directa en la acumulación de metales por las plantas, los resultados indican que si bien la especie de planta utilizada en este estudio (*Noticastrum sericeum*) no es tolerante al cobre, el tiempo de exposición de 23 días, en el caso del sustrato sólido, no fue suficiente como para producir efectos fitotóxicos visibles en las raíces de estas plántulas.

Al igual que en el caso de las raíces de las plántulas cultivadas en solución, una forma útil de visualizar el incremento en los niveles de cobre de las raíces de las plántulas sometidas a adiciones de cobre en función de los niveles de cobre determinados en las raíces de las plántulas en tratamiento control, es mediante proporciones. Por lo tanto, en el caso de las plántulas cultivadas en sustrato sólido enriquecido con cobre, las relaciones: contenido de cobre en raíces de las plántulas sometidas a adiciones de cobre/ contenido de cobre en raíces de las plántulas en tratamiento control-sólido para cada uno de los tratamientos aplicados, se indican en la figura 25.

Figura 25: Relaciones entre la concentración de cobre en las raíces de las plántulas cultivadas en sustrato sólido enriquecido con cobre y la concentración de cobre en las raíces de las plántulas mantenidas en control-sólido.



Los contenidos de cobre en las raíces de las plántulas mantenidas en sustrato sólido enriquecido con CuSO₄ y con CuO, fueron de 1,4 (CuO 10 mg/mg) a 6,4 (CuSO₄ 100 mg/L) veces mayor que el contenido de cobre en las raíces de las plántulas en tratamiento control-sólido.

Estos resultados indican que nuevamente las relaciones contenido de cobre en raíces de plántulas sometidas a adiciones de cobre/contenido de cobre en raíces de plántulas en control-sólido, fueron mayores para las plántulas crecidas en sustrato sólido enriquecido con CuSO₄ que para las plántulas crecidas sustrato sólido enriquecido con CuO.

5.3.8.2.- Contenido de cobre en vástagos:

Al analizar la tabla 18, se observa que, al igual que en las raíces, los niveles de cobre de los vástagos correspondientes a las plántulas mantenidas en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L fueron muy superiores a los encontrados en los vástagos de las plántulas crecidas en substrato sólido, lo cual es un efecto de la mayor fitodisponibilidad del cobre en el medio líquido. Las variaciones en los niveles de cobre de los vástagos de las plántulas en solución, de acuerdo al tratamiento aplicado en el ensayo, se deben a la correspondiente aplicación de este elemento, encontrándose niveles de cobre extremadamente bajos en los vástagos de las plántulas sometidas al tratamiento control-líquido y valores altísimos en los vástagos de plántulas mantenidas en substrato líquido enriquecido con 100 mg/L de CuSO_4 . Al comparar los niveles de cobre de las raíces con los de los vástagos de las plántulas mantenidas en substrato líquido, se deduce que el metal superó la capacidad tampón de la raíz, traspasándose al vástago; de ahí que los niveles de cobre en vástago sean tan elevados, especialmente en aquellas plántulas sometidas a adiciones de CuSO_4 .

Con respecto a los contenidos de cobre de los vástagos de las plántulas crecidas en substrato sólido, se observa que estos se encuentran a niveles normales, por lo tanto, no se consideran tóxicos para la planta. Además, las variaciones en la concentración de cobre en los vástagos entre los distintos tratamientos aplicados, son bastante bajas en comparación con las presentadas por los vástagos de las plántulas en solución, independientemente del compuesto o cantidad agregadas; en relación a lo anterior, se excluyen los vástagos sometidos al tratamiento control-sólido, donde los niveles de cobre encontrados son notoriamente inferiores a los demás tratamientos.

5.3.8.2.1.- Contenido de cobre en vástagos de plántulas en substrato líquido:

En el caso de los vástagos de las plántulas cultivadas en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L enriquecidas con cobre, también se efectuó aproximaciones del contenido de cobre en cada una de estas estructuras vegetales sometidas a un tratamiento dado.

De este modo, en el caso del tratamiento control-líquido, se vio que las concentraciones de cobre en los vástagos son bastante bajas, incluso deficitarias para el desarrollo normal de la planta. Considerando que esta concentración de cobre corresponde a la unión de las 10 réplicas del tratamiento, el nivel de cobre por vástago sería de aproximadamente 0,2 mg/kg, lo cual es extremadamente bajo.

En relación a las concentraciones de cobre en los vástagos de los tratamientos con CuSO_4 10 y 100 mg/L-solución, se observa que son extremadamente altas, llegando a ser tóxicas para la planta, lo cual concuerda con las observaciones visuales realizadas al estado de la plántula, puesto que la marchitez de los vástagos fue notoria desde los primeros días del montaje. Cada uno de los vástagos de las plántulas sometidas a adiciones de CuSO_4 10 mg/L-solución, contenía aproximadamente 27 mg/kg de cobre, lo cual es bastante alto para un desarrollo normal de la planta. Por su parte, la concentración de cobre cada uno de los vástagos de las plántulas mantenidas en solución enriquecida con 100 mg/L de CuSO_4 , fue alrededor de 125 mg/kg, lo cual indica que en este caso se superó en demasía la capacidad tampón de la raíz, por lo tanto, una gran cantidad de cobre ingresó a los vástagos.

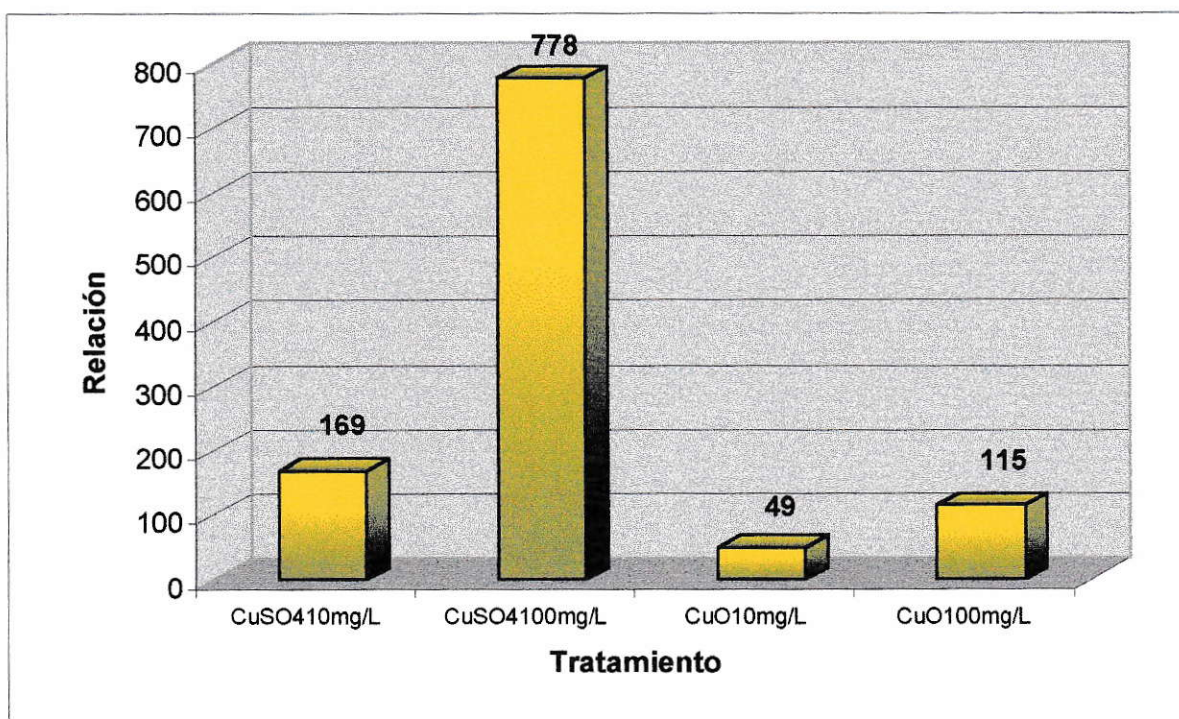
En el caso de los vástagos de las plántulas mantenidas en solución enriquecida con 10 y 100 mg/L de CuO , nuevamente se encontró concentraciones altas de cobre, sin embargo, no fueron suficientes como para producir marchitez en los vástagos de la totalidad de las réplicas. Cada vástago de las plántulas sometidas a tratamientos con 10 mg/L de CuO , contenía 8 mg/kg de cobre aproximadamente, lo que constituye una concentración elevada para una plántula en desarrollo. Por su parte, cada vástago de las plántulas mantenidas en solución enriquecida con CuO

100 mg/L, presentó una concentración cercana a los 18 mg/kg, lo que es inapropiado para un desarrollo normal de la planta.

Al igual que en el caso de las raíces, se determinó el incremento en los niveles de cobre en los vástagos de las plántulas sometidas a adiciones de cobre en relación con los niveles de cobre encontrados en los vástagos de las plántulas mantenidas en tratamiento control-líquido.

Las proporciones calculadas en el caso de las plántulas cultivadas en soluciones enriquecidas con cobre (contenido de cobre en vástagos de las plántulas sometidas a adiciones de cobre/contenido de cobre en vástagos de las plántulas en tratamiento control-líquido), para cada uno de los tratamientos aplicados, se indican en la figura 26.

Figura 26: Relaciones entre la concentración de cobre en los vástagos de las plántulas cultivadas en soluciones enriquecidas con cobre y la concentración de cobre en los vástagos de las plántulas mantenidas en control-líquido.



Los contenidos de cobre en los vástagos de las plántulas mantenidas en soluciones enriquecidas con CuSO_4 y con CuO , fueron de 49 (CuO 10 mg/L) a 778 (CuSO_4 100 mg/L) veces mayor que el contenido de cobre en los vástagos de las plántulas en tratamiento control-líquido.

Estos resultados indican que las relaciones determinadas anteriormente, fueron superiores en aquellas plántulas mantenida en solución sulfatada que en las plántulas mantenidas en solución enriquecida con CuO , debido a la mayor solubilidad del CuSO_4 en medio acuoso, lo cual permitió que una mayor cantidad de cobre ingresase a la planta a través de las raíces y posteriormente se traspasase al vástago.

5.3.8.2.2.- Contenido de cobre en vástagos de plántulas en substrato sólido:

En el presente caso, nuevamente se realizaron aproximaciones gruesas del contenido de cobre en cada uno de los vástagos de las plántulas mantenidas en substrato sólido.

Al analizar la tabla 18 se observa que los niveles de cobre en los vástagos de las plántulas crecidas en control-sólido son bajos para un desarrollo normal de la planta, encontrándose que cada vástago, contenía aproximadamente 0,2 mg/kg de cobre, lo cual puede catalogarse como deficitario.

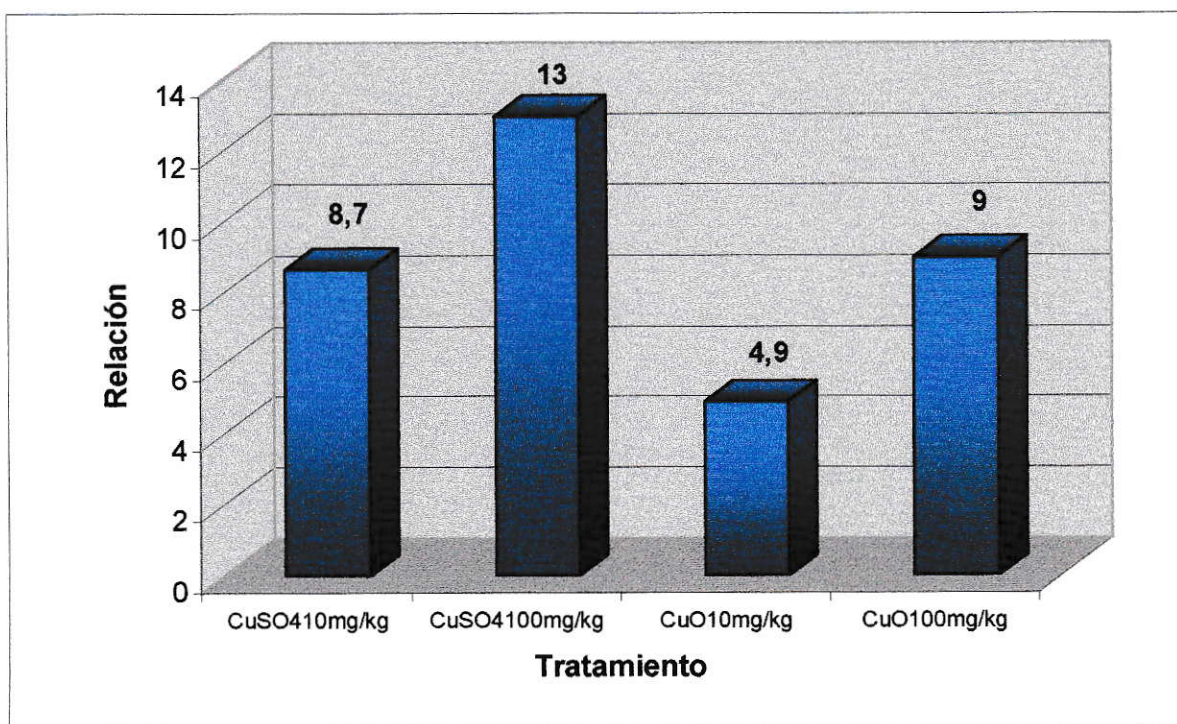
Los contenidos de cobre de los vástagos de las plántulas sometidas a tratamientos con 10 y 100 mg/kg de CuSO_4 -sólido, fueron superiores a los niveles de cobre encontrados en las raíces de las plántulas mantenidas en control-sólido, como consecuencia de la aplicación de cobre realizada. En el caso de las plántulas crecidas en substrato sólido enriquecido con 10 mg/kg de CuSO_4 , se encontró que cada vástago contenía alrededor de 2 mg/kg de cobre. Por su parte, cada uno de los vástagos de las plántulas crecidas en substrato sólido enriquecido con 100 mg/kg de CuSO_4 presentó una concentración de cobre de aproximadamente 3 mg/kg. Las

concentraciones de cobre total de los vástagos de las plántulas mantenidas en soluciones sulfatadas, fueron adecuadas para un desarrollo normal de la planta.

Las concentraciones de cobre de los vástagos de las plántulas crecidas en sustrato sólido enriquecido con CuO 10 y 100 mg/kg fueron adecuadas para el crecimiento normal de las plantas, encontrándose que cada vástago de las plántulas sometidas a tratamiento con CuO 10 mg/kg-sólido, contenía aproximadamente 1 mg/kg de cobre. Por último, los niveles de cobre de los vástagos de las plántulas sometidas a tratamiento con CuO 100 mg/kg-sólido, presentó un contenido aproximado de cobre de 2 mg/kg.

Además, se determinó las relaciones: contenido de cobre en vástagos de las plántulas sometidas a adiciones de cobre/contenido de cobre en vástagos de las plántulas en tratamiento control-sólido, para cada uno de los tratamientos aplicados, cuyos valores se indican en la figura 27.

Figura 27: Relaciones entre la concentración de cobre en los vástagos de las plántulas cultivadas en sustrato sólido enriquecido con cobre y la concentración de cobre en los vástagos de las plántulas mantenidas en control-sólido.



Como se observa en la figura 27, los contenidos de cobre en los vástagos de las plántulas mantenidas en substrato sólido enriquecido con CuSO_4 y con CuO , fueron de 4,9 (CuO 10 mg/mg) a 13 (CuSO_4 100 mg/L) veces mayor que el contenido de cobre en los vástagos de las plántulas en tratamiento control-líquido.

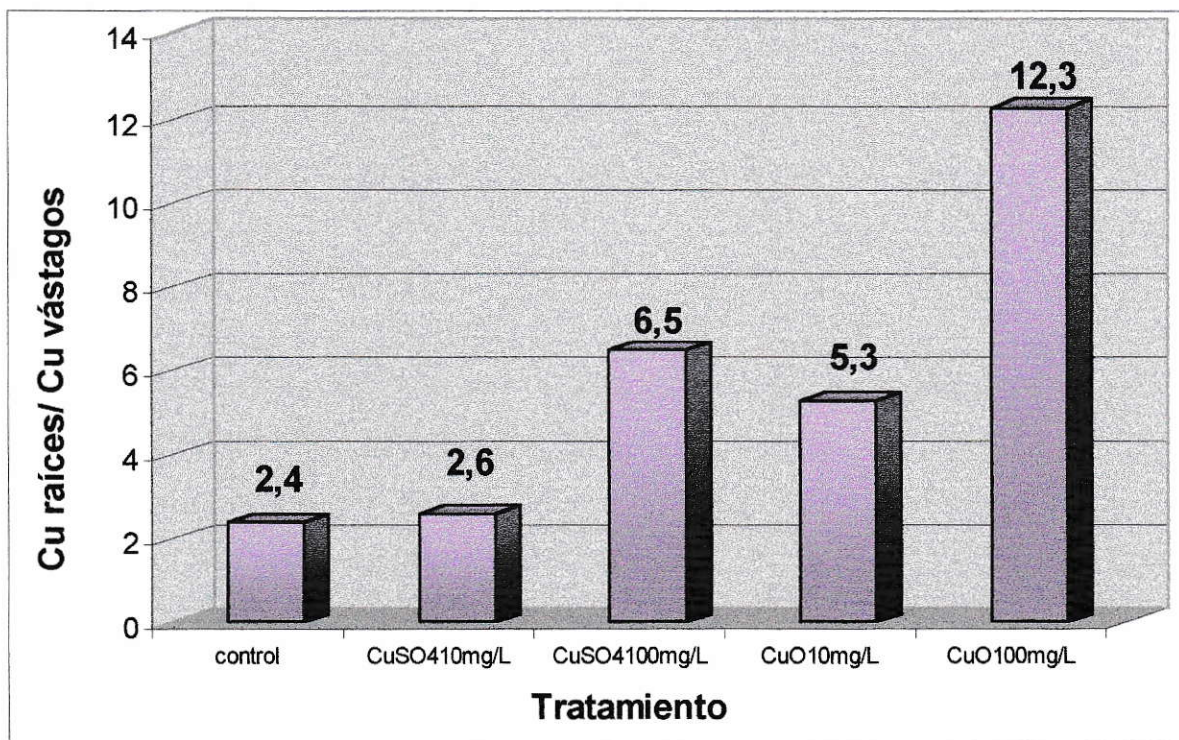
Estos resultados nuevamente indican que el incremento en el contenido de cobre de los vástagos de las plántulas crecidas en substrato sólido enriquecido con CuSO_4 en relación al contenido de cobre de los vástagos de las plántulas en control-sólido fue mayor que el incremento evidenciado en los vástagos de las plántulas mantenidas en substrato sólido enriquecido con CuO .

Además, se evidenció que las relaciones contenido de cobre en vástagos de plántulas sometidas a adiciones de cobre/contenido de cobre en vástagos de plántulas sometidas a tratamiento control, fueron mayores en aquellas plántulas mantenidas en substrato líquido que en substrato sólido, lo cual es producto de la mayor biodisponibilidad de cobre en el medio acuoso.

Para tener una idea aproximada del contenido de cobre presente en las raíces de las plántulas sometidas a ensayo en relación a los niveles de cobre determinados en los vástagos de estas mismas plántulas, se calculó las proporciones correspondientes de acuerdo a cada uno de los tratamientos aplicados, tanto en solución como en substrato sólido.

En el caso de las plántulas cultivadas en soluciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L enriquecidas con CuSO_4 y CuO , las proporciones calculadas (contenido de cobre en raíces/contenido de cobre en vástagos) para cada uno de los tratamientos aplicados, se indican en la figura 28.

Figura 28: Relaciones entre la concentración de cobre en las raíces y la concentración de cobre en los vástagos de las plántulas cultivadas en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L sometidas a distintos tratamientos de ensayo.



De este modo, se encontró que los contenidos de cobre en las raíces de las plántulas mantenidas en solución fueron de 2,4 (control-líquido) a 12,3 (CuO 100 mg/L-líquido) veces mayor que el contenido de cobre determinado en los vástagos de estas plántulas.

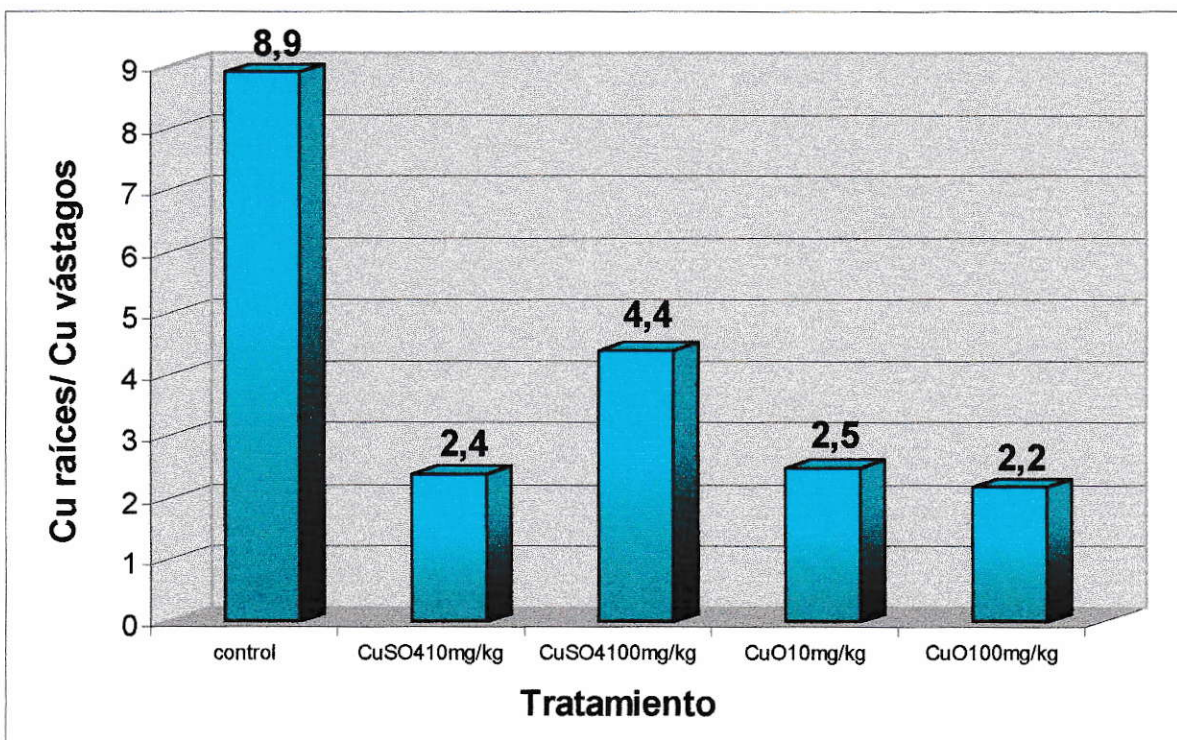
Estos valores indican una gran variabilidad en los niveles de cobre de las raíces de las plántulas mantenidas en solución en relación al contenido de cobre en sus vástagos, debido a la gran heterogeneidad en el comportamiento de los sistemas vegetales. Sin embargo, estos valores son solo una aproximación del comportamiento que experimentaron las plántulas, considerando que cada una de las 10 réplicas con que se contó en cada tratamiento, es un ente individual.

Además, se observa que la relación concentración de cobre en las raíces/ concentración de cobre en vástagos de las plántulas sometidas a 100 mg/L de CuSO_4

y CuO, es varias veces mayor que la relación concentración de cobre en raíces/ concentración de cobre en vástagos mostrada por las plántulas sometidas a los demás tratamientos. Asimismo, se observa que estas relaciones son mayores en las plántulas sometidas a adiciones de CuO que de CuSO₄, lo cual es atribuible a la menor solubilidad del óxido de cobre en agua en comparación con el sulfato de cobre, lo cual probablemente provocó que la mayor parte del cobre captado por las plántulas mantenidas en solución enriquecida con CuO, permaneciera en las raíces.

En el caso de las plántulas cultivadas en sustrato sólido enriquecido y no enriquecido con cobre, las proporciones calculadas (contenido de cobre en raíces/contenido de cobre en vástagos) para cada uno de los tratamientos aplicados, se indican en la figura 29.

Figura 29: Relaciones entre la concentración de cobre en las raíces y la concentración de cobre en los vástagos de las plántulas cultivadas en sustrato sólido sometido a los distintos tratamientos de ensayo.



En el caso de las plántulas mantenidas en substrato sólido, se encontró que los contenidos de cobre en las raíces de estas plántulas fueron de 2,2 (CuO 100 mg/kg-sólido) a 8,9 (control-sólido) veces mayor que el contenido de cobre determinado en los vástagos de las plántulas mantenidas en substrato sólido.

En el presente caso, nuevamente se presenta una cierta variabilidad en la proporción de cobre de las raíces en relación al contenido de cobre en los vástagos de las plántulas mantenidas en substrato sólido. Sin embargo, al contrario de las plántulas en solución, en las plántulas en substrato sólido no se presenta un comportamiento establecido en las proporciones determinadas, de acuerdo al compuesto o dosis adicionada. Además, se encontró que la relación contenido de cobre en raíces/contenido de cobre en vástagos de las plántulas mantenidas en tratamiento control es mayor que las relaciones determinadas para las plántulas crecidas en substrato sólido sometidas a otros tratamientos. No obstante, nuevamente se debe recalcar que estos valores son solo una aproximación.

VI.- RELACION ENTRE LOS CONTENIDOS DE COBRE DETERMINADOS EN SUBSTRATO SOLIDO Y EN TEJIDOS DE *Noticastrum sericeum*.

6.1.- ANTECEDENTES GENERALES:

Considerando que la mayor parte de los estudios realizados en las últimas décadas han determinado que los niveles de cobre total en el suelo no se relacionan con los contenidos de cobre en las plantas, sino que son los niveles de cobre iónico del suelo los relacionados con las concentraciones de cobre presentes en las plantas; es útil comprobar estadísticamente estas relaciones. Tal procedimiento es esencial para determinar las fracciones de cobre captadas por los vegetales sometidos a ensayo.

En el presente estudio, se utilizó análisis estadísticos para establecer las relaciones existentes entre las diversas fracciones de cobre determinadas. Además, estos análisis permitieron relacionar los contenidos de cobre total, soluble e iónico en el sustrato sólido enriquecido con cobre y el contenido de cobre presente en los vegetales sometidos a ensayo.

6.2.- ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS:

6.2.1.- Relación entre las distintas especies de cobre (especiación) determinadas en el sustrato sólido:

Para determinar estadísticamente las relaciones existentes entre los niveles de cobre total, cobre soluble y cobre iónico de las muestras de sustrato sólido sometidas a los distintos tratamientos de ensayo (tabla 17, página 116), se aplicó

Correlación de Pearson a los datos obtenidos. Para tal efecto, se utilizó el paquete estadístico Statistica para Windows (StatSoft, 1993).

Al analizar la correlación existente entre los niveles de cobre total, cobre soluble y cobre iónico del grupo de muestras de substrato sólido sometidas a adiciones de CuSO_4 , incluyendo tierra sin tratamiento previo, control, CuSO_4 10 mg/kg y CuSO_4 100 mg/kg, se encontró que existe relación significativa entre el contenido de cobre total de las muestras de substrato sólido enriquecidas con CuSO_4 (incluyendo previo tratamiento y control) y el contenido de cobre soluble y de cobre iónico de estas mismas muestras. Además, se observa que existe una relación significativa entre los contenidos de cobre soluble y cobre iónico de este grupo de muestras de substrato sólido sometidas a cargas de CuSO_4 (incluyendo el substrato sólido sin tratamiento previo y el control).

Los valores encontrados mediante este análisis se muestran en la tabla 19.

Tabla 19: Correlación de Pearson aplicada a los datos de Cu total, Cu soluble y Cu iónico de las muestras de substrato sólido sometidas a carga metálica con CuSO_4 .

Correlaciones			
Las correlaciones marcadas son significativas a $p < 0,05$			
N=4			
Variable	TOTAL	SOLUBLE	IONICO
TOTAL	1,00	0,99*	1,00*
SOLUBLE	0,99*	1,00	0,99*
IONICO	1,00*	0,99*	1,00

Mediante el presente análisis estadístico, se encontró que existe una relación significativa entre todas las especies de cobre (cobre total, cobre soluble y cobre iónico) determinadas en el grupo de muestras de substrato sólido sometidas a cargas de CuSO_4 .

Para una mejor visualización de los resultados obtenidos, es útil observar gráficamente las relaciones establecidas.

En la figura 30, se observa que la relación entre el contenido de Cu total y Cu soluble del grupo de muestras de substrato sólido sometidas a carga metálica con CuSO_4 , tiende a ser lineal, por lo tanto, se relacionan significativamente entre ellos.

Además, de la figura 31 se observa que la relación entre el contenido de Cu total y los niveles de Cu iónico de este mismo grupo de muestras, nuevamente tiende a la linealidad, relacionándose significativamente.

Por último, de la figura 32 se observa que la relación entre las concentraciones de Cu soluble y de Cu iónico, del grupo de muestras de substrato sólido sometidas a adiciones de CuSO_4 , incluyendo tierra sin previo tratamiento, control, CuSO_4 10 mg/kg y CuSO_4 100 mg/kg, también tiende a ser lineal, correlacionándose de modo significativo.

Los resultados obtenidos mediante el análisis estadístico anterior, indican que al aumentar la carga de cobre total en las muestras de substrato sólido sometidas a adiciones de CuSO_4 , tanto el contenido de cobre soluble como de cobre iónico también aumentan de manera proporcional y significativa. Esta información es de gran importancia a la hora de evaluar los contenidos de cobre encontrados en las plantas, ya a que las plántulas mantenidas en substrato sólido enriquecido con 100 mg/kg de CuSO_4 , presentan una mayor concentración de cobre, tanto en las raíces como en sus vástagos, que el resto de las plántulas crecidas en substrato sólido. Tal efecto, se debió a que en este tratamiento, existió una mayor proporción de cobre disponible para su captación por las plantas.

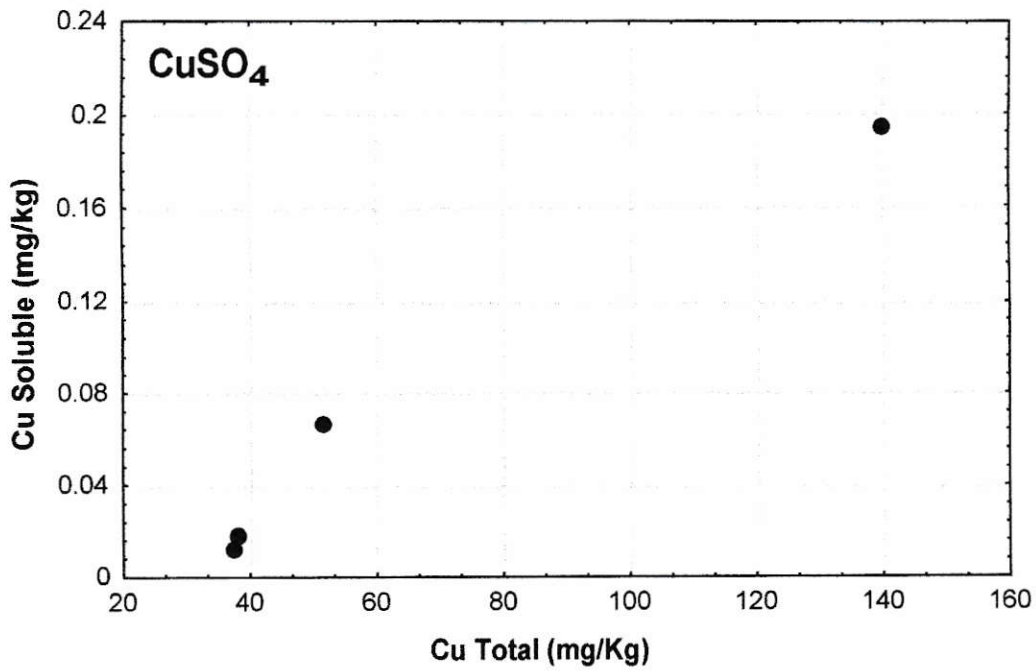


Figura 30: Relación entre el contenido de Cu Total y el contenido de Cu soluble del grupo de muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuSO_4 . Determinación realizada mediante Correlación de Pearson.

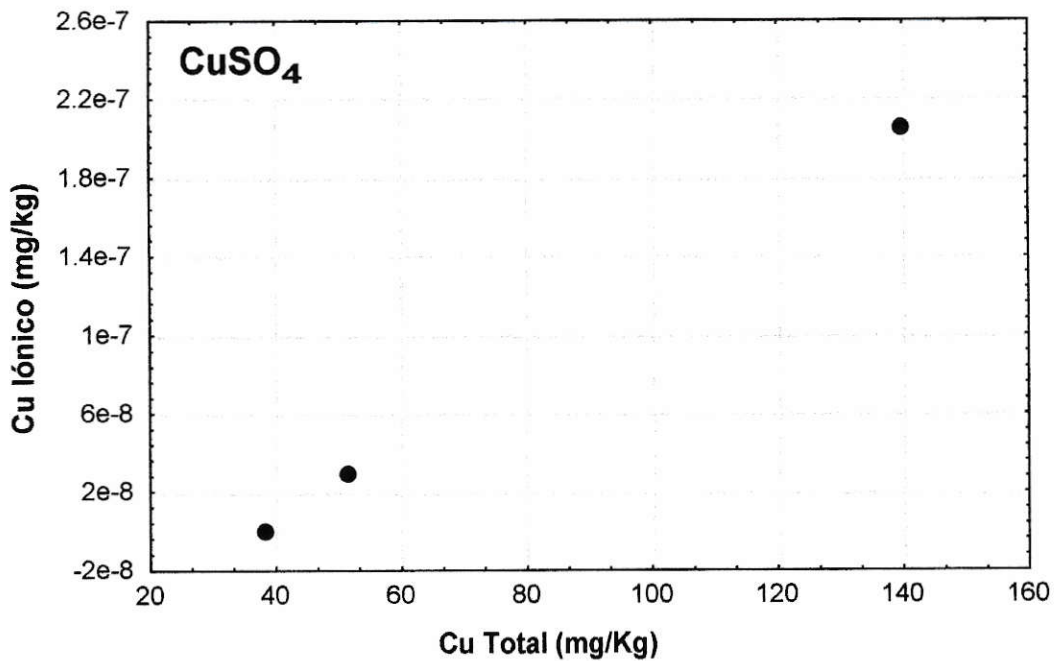


Figura 31: Relación entre el contenido de Cu Total y el contenido de Cu iónico del grupo de muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuSO_4 . Determinación realizada mediante Correlación de Pearson.

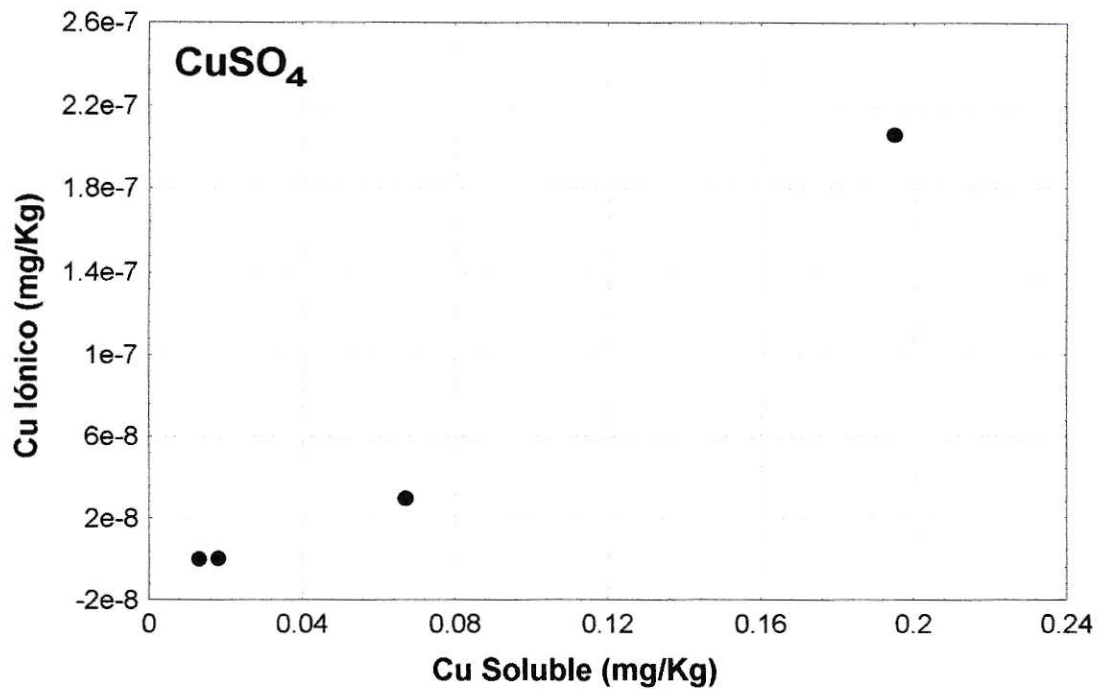


Figura 32: Relación entre el contenido de Cu soluble y el contenido de Cu iónico del grupo de muestras de substrato sólido sometido a adiciones de CuSO₄. Determinación realizada mediante Correlación de Pearson.

Al determinar la significación de las correlaciones entre los contenidos de cobre total, cobre soluble y cobre iónico, en el grupo de muestras de substrato sólido sometidas a adiciones de CuO, incluyendo tierra sin tratamiento previo, control, CuO 10 mg/kg y CuO 100 mg/kg, se encontró que, al contrario del caso anterior (grupo de muestras de substrato sólido enriquecidas con CuSO₄), en este grupo de muestras de substrato sólido, sólo existen relaciones significativas entre el contenido de cobre soluble y el contenido de cobre iónico. Los valores obtenidos en este análisis se muestran en la tabla 20.

Tabla 20: Correlación de Pearson aplicada a los datos de Cu total, Cu soluble y Cu iónico de las muestras de substrato sólido sometidas a carga metálica con CuO.

Correlaciones			
Las correlaciones marcadas son significativas a $p < 0,05$			
N=4			
Variable	TOTAL	SOLUBLE	IONICO
TOTAL	1,00	0,92	0,94
SOLUBLE	0,92	1,00	1,00*
IONICO	0,94	1,00*	1,00

La disminución de la significación en las relaciones establecidas en el grupo de muestras de substrato sólido sometidas a adiciones de CuO en comparación con las muestras de substrato sólido sometidas a adiciones de CuSO₄, podría ser un efecto de la baja solubilidad que el CuO posee en agua. Esto es evidenciado en la figura 33, donde se observa que la relación entre el contenido de Cu total y Cu soluble del grupo de muestras de substrato sólido sometidas a adiciones de CuO, tiende a ser parabólica, por lo tanto, no existe una relación significativa entre estos contenidos.

El mismo fenómeno se observa en la figura 34, donde se evidencia una relación no-lineal entre el contenido de cobre total y cobre iónico de estas muestras de substrato sólido, de tal modo, tampoco se relacionan de forma significativa. Por lo

tanto, en estos casos el cobre solubiliza hasta que se alcanza la constante de solubilidad del CuO adicionado.

Contrariamente, en la figura 35 se observa una relación lineal entre las concentraciones de cobre soluble y de cobre iónico del grupo de muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuO, incluyendo tierra sin tratamiento previo, control, CuO 10 mg/kg y CuO 100 mg/kg, correlacionándose de manera significativa entre ellos.

En este contexto, los resultados obtenidos en este último análisis estadístico, indican que a medida que aumenta el contenido de cobre soluble en el sustrato sólido sometido a adiciones de CuO, aumentan proporcionalmente los contenidos de cobre iónico de estas mismas muestras. Sin embargo, no se observa una correlación significativa entre el contenido de cobre total y las concentraciones de cobre soluble y cobre iónico de este grupo de muestras, aunque los niveles de cobre soluble y cobre iónico tienden a aumentar a medida que los niveles de cobre total aumentan. Estos resultados, permitirían establecer en primera instancia que las plántulas mantenidas en sustrato sólido enriquecido con CuO, no contienen concentraciones de cobre proporcionales a los contenidos totales de cobre encontrados en las muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuO, sino más bien a las fracciones más solubles.

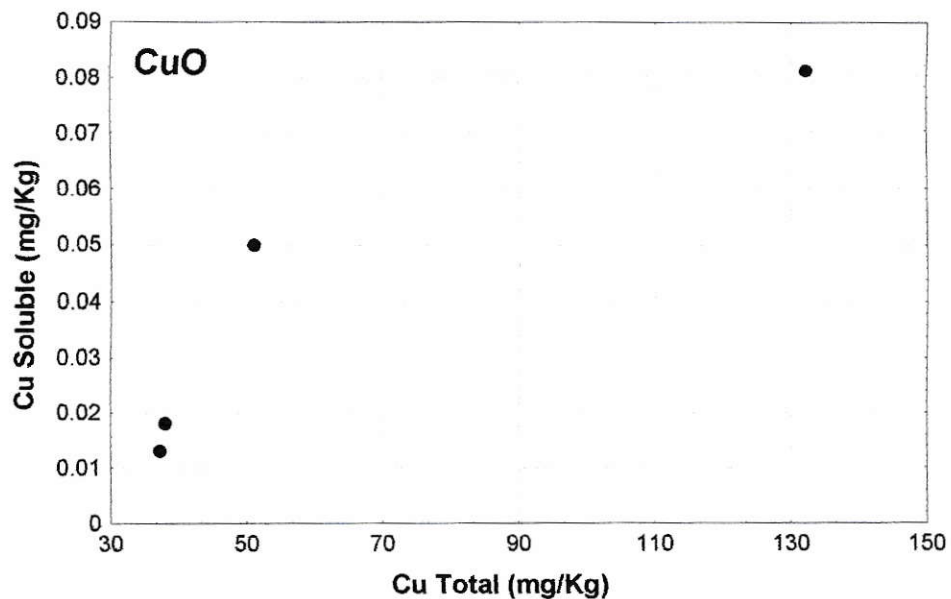


Figura 33: Relación entre el contenido de Cu Total y el contenido de Cu soluble del grupo de muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuO. Determinación realizada mediante Correlación de Pearson.

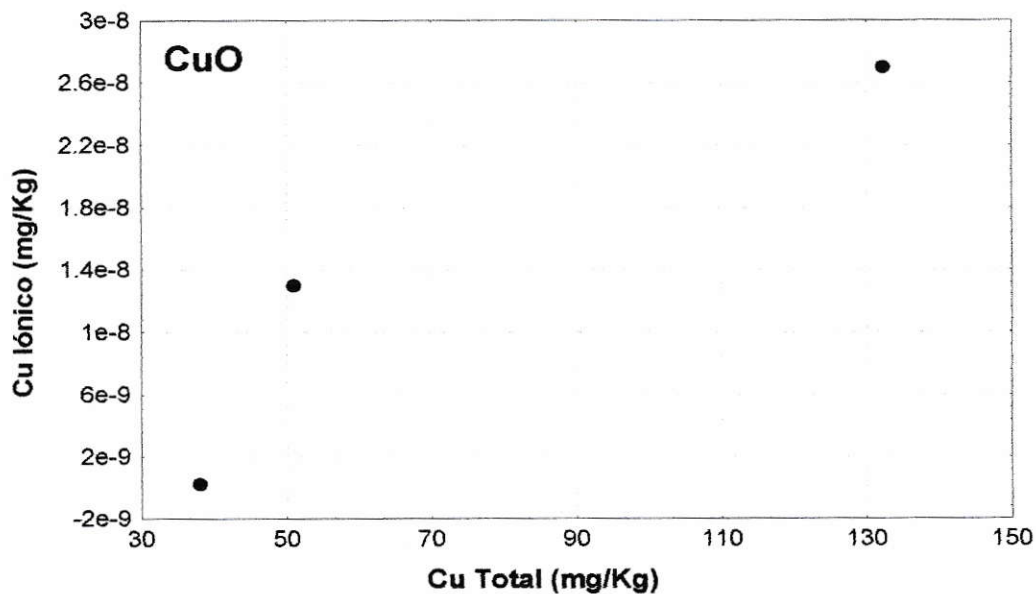


Figura 34: Relación entre el contenido de Cu Total y el contenido de Cu iónico del grupo de muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuO. Determinación realizada mediante Correlación de Pearson.

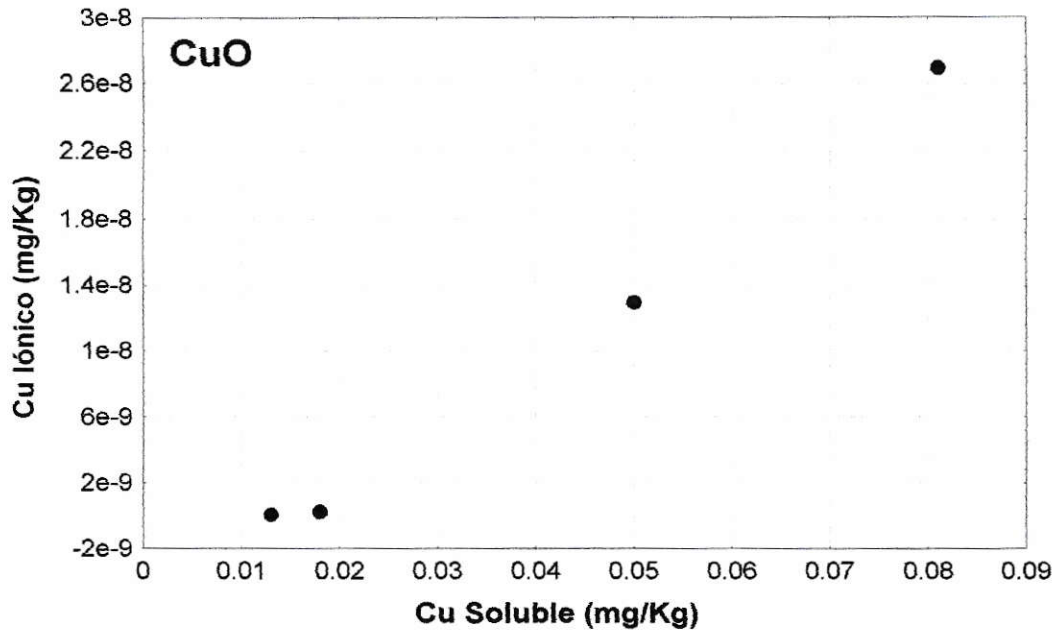


Figura 35: Relación entre el contenido de Cu soluble y el contenido de Cu iónico del grupo de muestras de substrato sólido sometido a adiciones de CuO. Determinación realizada mediante Correlación de Pearson.

6.2.2.- Relación entre los niveles de cobre total, cobre soluble y cobre iónico (especiación) del sustrato sólido y el contenido de cobre total en *Noticastrum sericeum*:

Para establecer las relaciones existentes entre los niveles de los distintos tipos de cobre determinados en el sustrato sólido y el contenido de cobre total presente en las plántulas crecidas en estos mismos sustratos (tablas 17 y 18, página 116 y 118 respectivamente), se realizó Regresiones Lineales Simples. Para tal efecto, se utilizó el paquete estadístico Statistica para Windows (StatSoft, 1993).

Para la aplicación de este análisis, se separó las muestras de sustrato sólido y vegetales en 2 grupos. El grupo 1 corresponde a las muestras de sustrato sólido y vegetales tratadas con CuSO_4 , que incluye a los tratamientos control, CuSO_4 10 mg/kg y CuSO_4 100 mg/kg. El grupo 2 corresponde a las muestras de tierra de hoja y vegetales tratadas con CuO , en las que se incluyen los tratamientos control, CuO 10 mg/kg y CuO 100 mg/kg.

Al aplicar regresión lineal simple a las muestras del grupo 1, se observó que solo existe relación significativa entre el contenido de cobre total del grupo de muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuSO_4 (incluyendo sustrato sólido sin tratamiento previo, control, CuSO_4 10 mg/kg y CuSO_4 100 mg/kg) y el contenido de cobre total de las raíces de las plántulas desarrolladas en estos mismos sustratos sólidos.

Además, se encontró una relación significativa entre el contenido de cobre iónico del grupo de muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuSO_4 y el contenido de cobre de las raíces de las plántulas mantenidas en las muestras de sustrato sólido correspondientes al grupo 1. Esto último se debe probablemente a que a medida que existe una mayor cantidad de cobre en forma iónica en el sustrato sólido, una mayor cantidad de cobre se encuentra fitodisponible, ingresando a la planta a través de las raíces. Los parámetros obtenidos mediante este análisis se muestran en la tabla 21, siendo R^2 el coeficiente de correlación y b la pendiente.

Tabla 21: Relación entre el contenido de Cu total, Cu soluble y Cu iónico de las muestras de substrato sólido sometidas a cargas metálicas con CuSO₄ y los contenidos de Cu total en las plantas, mediante regresión lineal simple.

Relación substrato-planta	Parámetros	Existe o no correlación
1. Cu total substrato sólido v/s cobre total en vástago	$R^2= 0,449$ $b= 0,670$	no existe correlación significativa
2. Cu total substrato sólido v/s cobre total en raíz	$R^2= 0,998^*$ $b= 0,990^*$	existe correlación significativa
1. Cu soluble en substrato sólido v/s cobre total en vástago	$R^2= 0,613$ $b= 0,783$	no existe correlación significativa
2. Cu soluble en substrato sólido v/s cobre total en raíz	$R^2= 0,985$ $b= 0,992$	no existe correlación significativa
1. Cu iónico en substrato sólido v/s cobre total en vástago	$R^2= 0,453$ $b= 0,673$	no existe correlación significativa
2. Cu iónico en substrato sólido v/s cobre total en raíz	$R^2= 0,999^*$ $b= 0,999^*$	existe correlación significativa

Las relaciones encontradas mediante los análisis realizados, se visualizan más claramente observando las figuras correspondientes.

En la figura 36, se observa que la relación entre el contenido de cobre total de las muestras de substrato sólido sometidas a adiciones de CuSO₄ (incluyendo tratamiento control, CuSO₄ 10 mg/kg y CuSO₄ 100 mg/kg) y el contenido de cobre total de las raíces de las plántulas mantenidas en estos mismos substratos sólidos, presenta un comportamiento lineal, relacionándose significativamente entre ellos. En cambio, el contenido de cobre total de las muestras de substrato sólido correspondientes al grupo 1 y el contenido de cobre total en los vástagos de las plántulas mantenidas en estas mismas muestras de substrato sólido, no presenta un comportamiento lineal, por lo tanto, no se relacionan de modo significativo.

En la figura 37, se observa que la relación entre el contenido de cobre soluble del grupo de muestras de substrato sólido sometidas a adiciones de CuSO_4 (grupo de muestras de substrato sólido correspondientes al grupo 1) y los niveles de cobre total encontrados en las raíces de las plántulas crecidas en estos mismos substratos sólidos, tiende a ser lineal, pero no hasta el punto de relacionarse significativamente. Por otro lado, al observar la relación que se presenta entre el contenido de cobre soluble de las muestras de substrato sólido enriquecidas con CuSO_4 y el contenido de cobre de los vástagos de las plántulas desarrolladas en las muestras de substrato sólido correspondientes grupo 1, se observa que se encuentra lejos de la linealidad, de modo que no se relacionan significativamente.

Por último, de la figura 38 se observa una relación lineal entre el contenido de cobre iónico del grupo de muestras de substrato sólido correspondientes al grupo 1 y los contenidos de cobre total de las raíces de las plántulas mantenidas en estos mismos substratos, relacionándose significativamente. Por el contrario, la relación entre el contenido de cobre iónico de las muestras de substrato sólido correspondientes al grupo 1 y el contenido de cobre total de los vástagos de las plántulas crecidas en estos mismos substratos, está lejos de la linealidad, por lo tanto, no se relacionan significativamente.

Los resultados obtenidos mediante la aplicación de regresión lineal simple a las muestras de substrato sólido y plántulas de *Noticastrum sericeum*, indicaron que, a pesar de existir una relación significativa entre los contenidos de cobre total, cobre soluble y cobre iónico en las muestras de substrato sólido sometidas a adiciones de CuSO_4 (incluyendo substrato sólido sin tratamiento previo, control, CuSO_4 10 mg/kg y CuSO_4 100 mg/kg), solo se encontró una relación significativa entre los contenidos de cobre total y cobre iónico del grupo de muestras de substrato sólido pertenecientes al grupo 1, y los contenidos de cobre total de las raíces de las plántulas mantenidas en estos mismos substratos.

En este mismo contexto, es posible establecer que al adicionar al sustrato sólido una forma química del cobre altamente soluble, como es el caso del CuSO_4 , los niveles de cobre iónico encontrados en el sustrato sólido reflejan la cantidad de cobre biodisponible para las plantas.

Se observa una mayor frecuencia en las relaciones significativas entre los niveles de cobre (ya sea total, soluble y/o iónico) de las muestras de sustrato sólido y los contenidos de cobre total en las raíces de las plántulas sometidas a ensayo. Tal efecto, es atribuible a la mayor exposición de las raíces al cobre adicionado, ya que las raíces son las estructuras vegetales directamente afectadas por el exceso de carga metálica. Por el contrario, las relaciones establecidas entre los niveles de cobre total encontrados en los vástagos y los contenidos de cobre total, cobre soluble y cobre iónico de las muestras de sustrato sólido, no muestran significancia, aunque las concentraciones de cobre en los vástagos tienden a aumentar a medida que los niveles de cobre en el sustrato sólido aumentan.

5.3.7.- RESULTADOS DE LAS PROPIEDADES DEL EXTRACTO DE SATURACION:

Los valores de pH y de conductividad eléctrica (C.E) determinados en los extractos de saturación, se presentan en la tabla 16, en tanto que el contenido de cobre soluble y cobre iónico, en la tabla 17.

Estos valores son una herramienta de gran utilidad para conocer principalmente el contenido de cobre soluble y cobre iónico presente en cada una de las muestras de sustrato sólido. Por lo tanto, además de proporcionar ciertos parámetros propios del sustrato sólido utilizado, brinda una estimación de la cantidad de cobre disponible para ser captado directamente por las plantas.

Tabla 16: Valores de pH y conductividad eléctrica por extracto de saturación.

Tratamiento	pH extracto	Conductividad eléctrica (dS/m)
Tierra sin tratamiento previo	8,47	1,09
Control	8,39	1,12
CuSO ₄ 10 mg/kg	8,26	2,32
CuSO ₄ 100 mg/kg	8,28	3,98
CuO 10 mg/kg	8,30	1,91
CuO 100 mg/kg	8,29	1,96

5.3.7.1.- pH del extracto de saturación:

Los resultados mostrados en la tabla 16, indican que el pH del extracto de saturación es alcalino, variando entre 8,26 y 8,47, por lo tanto, si este sustrato se utilizara en prácticas agrícolas, el riesgo de contaminación por metales pesados se vería reducido, ya que a estos pH los metales están casi completamente complejados

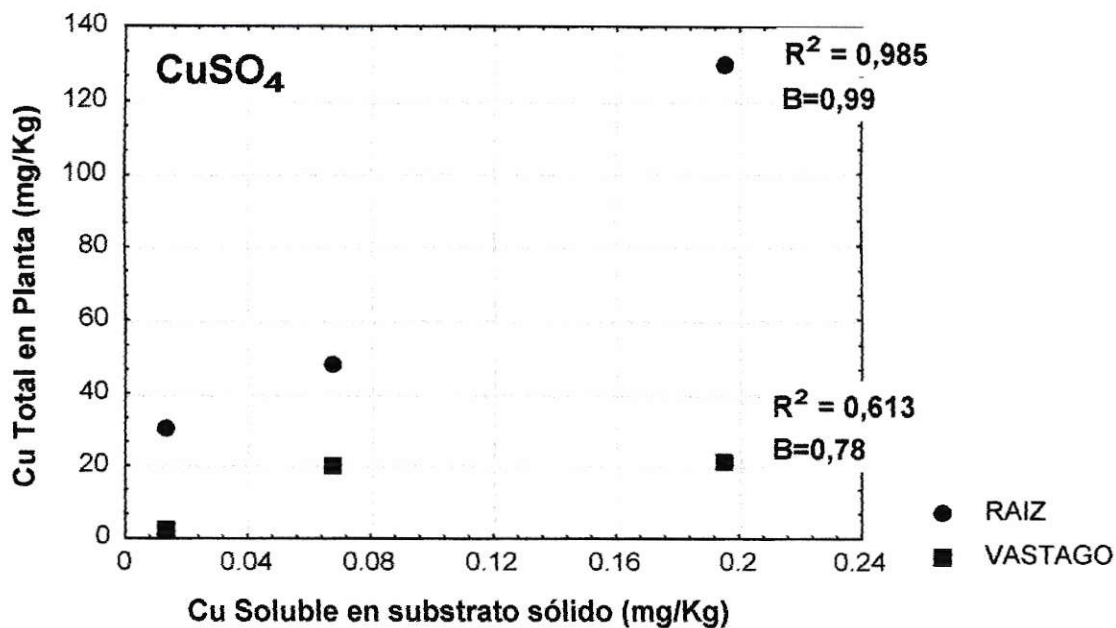


Figura 36: Relación entre el contenido de cobre total en el sustrato sólido sometido a adiciones de CuSO₄ y el contenido de cobre en las plantas. Determinación realizada mediante regresión lineal simple.

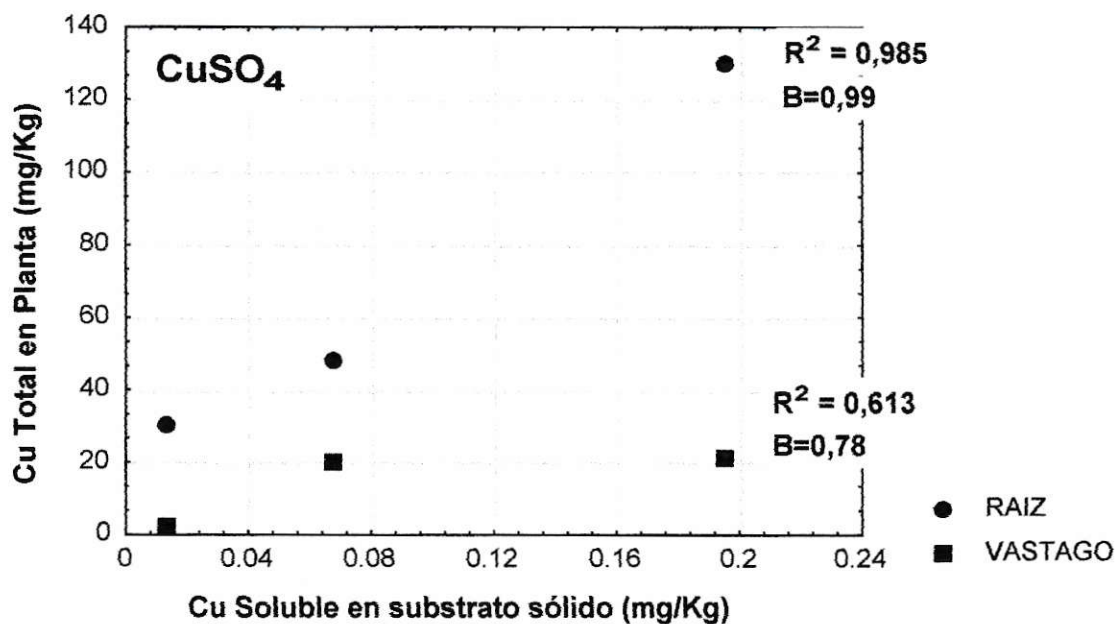


Figura 37: Relación entre el contenido de cobre soluble en el sustrato sólido sometido a adiciones de CuSO₄ y el contenido de cobre en las plantas. Determinación realizada mediante regresión lineal simple.

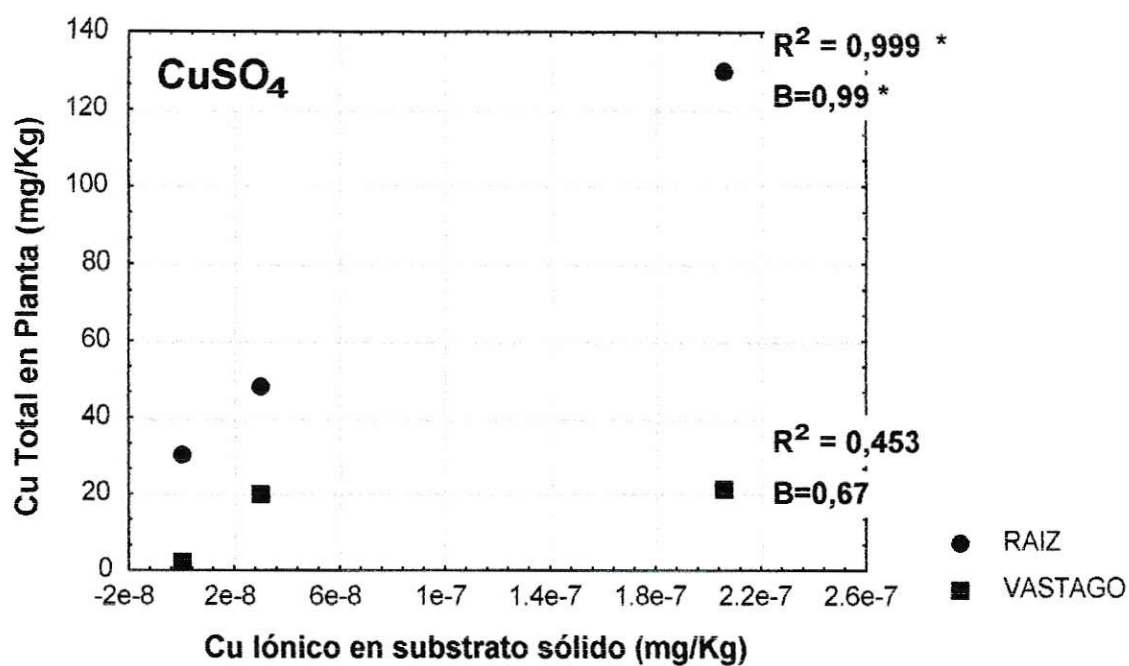


Figura 38: Relación entre el contenido de cobre iónico en el sustrato sólido sometido a adiciones de CuSO₄ y el contenido de cobre en las plantas. Determinación realizada mediante regresión lineal simple.

Al aplicar regresión lineal simple al grupo de muestras de sustrato sólido y vegetales, sometidas a adiciones de CuO (grupo 2), se encontró que solo existe relación significativa entre el contenido de cobre total del sustrato sólido sometido a adiciones de CuO (incluyendo tratamiento control, CuO 10 mg/kg y CuO 100 mg/kg) y el contenido de cobre total de las raíces de las plántulas mantenidas en estos mismos sustratos sólidos. Por lo tanto, en el caso de las muestras tratadas con CuO (grupo de muestras correspondientes al grupo 2), se relacionan significativamente menos muestras de sustrato sólido y plantas que en el caso de las muestras sometidas a adiciones de CuSO₄. Los parámetros obtenidos en el presente análisis se muestran en la tabla 22, siendo R² el coeficiente de correlación y b la pendiente.

Tabla 22: Relación entre el contenido de Cu total, Cu soluble y Cu iónico de las muestras de sustrato sólido sometidas a cargas metálicas con CuO y los contenidos de Cu total en las plantas, mediante regresión lineal simple.

Relación sustrato-planta	Parámetros	Existe o no correlación
1. Cu total sustrato sólido v/s cobre total en vástago	R ² = 0,480 b= 0,693	no existe correlación significativa
2. Cu total sustrato sólido v/s cobre total en raíz	R ² = 0,996* b= 0,998*	existe correlación significativa
1. Cu soluble en sustrato sólido v/s cobre total en vástago	R ² = 0,872 b= 0,934	no existe correlación significativa
2. Cu soluble en sustrato sólido v/s cobre total en raíz	R ² = 0,886 b= 0,931	no existe correlación significativa
1. Cu iónico en sustrato sólido v/s cobre total en vástago	R ² = 0,819 b= 0,905	no existe correlación significativa
2. Cu iónico en sustrato sólido v/s cobre total en raíz	R ² = 0,912 b= 0,955	no existe correlación significativa

Las relaciones establecidas mediante este último análisis, se visualizan claramente observando las figuras correspondientes.

En la figura 39, se observa una relación lineal entre el contenido de cobre total de las muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuO (grupo de muestras correspondientes al grupo 2) y el contenido de cobre total de las raíces de las plántulas mantenidas en estos mismos sustratos sólidos, relacionándose significativamente entre ellos. En cambio, el contenido de cobre total de las muestras de sustrato sólido pertenecientes al grupo 2 y el contenido de cobre total en los vástagos de las plántulas crecidas en estos mismos sustratos sólidos, no presenta un comportamiento lineal, por lo tanto, no se relacionan de modo significativo.

En la figura 40, se observa que la relación entre el contenido de cobre soluble de las muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuO (incluyendo tratamiento control, CuO 10 mg/kg y CuO 100 mg/kg) y los niveles de cobre total encontrados en las raíces de las plántulas mantenidas en las muestras de sustrato sólido correspondientes al grupo 2, no presenta un comportamiento lineal, sino más bien parabólico, de modo que no se relacionan significativamente. De igual modo, la relación establecida entre el contenido de cobre soluble de las muestras de sustrato sólido pertenecientes al grupo 2 y el contenido de cobre total de los vástagos de las plántulas mantenidas en estos mismos sustratos, está lejos de la linealidad, por lo tanto, no se relacionan significativamente.

Por último, de la figura 41 se observa que la relación entre el contenido de cobre iónico de las muestras de sustrato sólido correspondientes al grupo 2 y los contenidos de cobre total de las raíces de las plántulas mantenidas en estos mismos sustratos, tiende a ser lineal, sin embargo, no hasta el punto de relacionarse significativamente. Por otro lado, la relación existente entre el contenido de cobre iónico de las muestras de sustrato sólido correspondientes al grupo 2 y el contenido de cobre total de los vástagos de las plántulas mantenidas en estos sustratos sólidos, no presenta un comportamiento netamente lineal, por lo tanto, tampoco se relacionan significativamente.

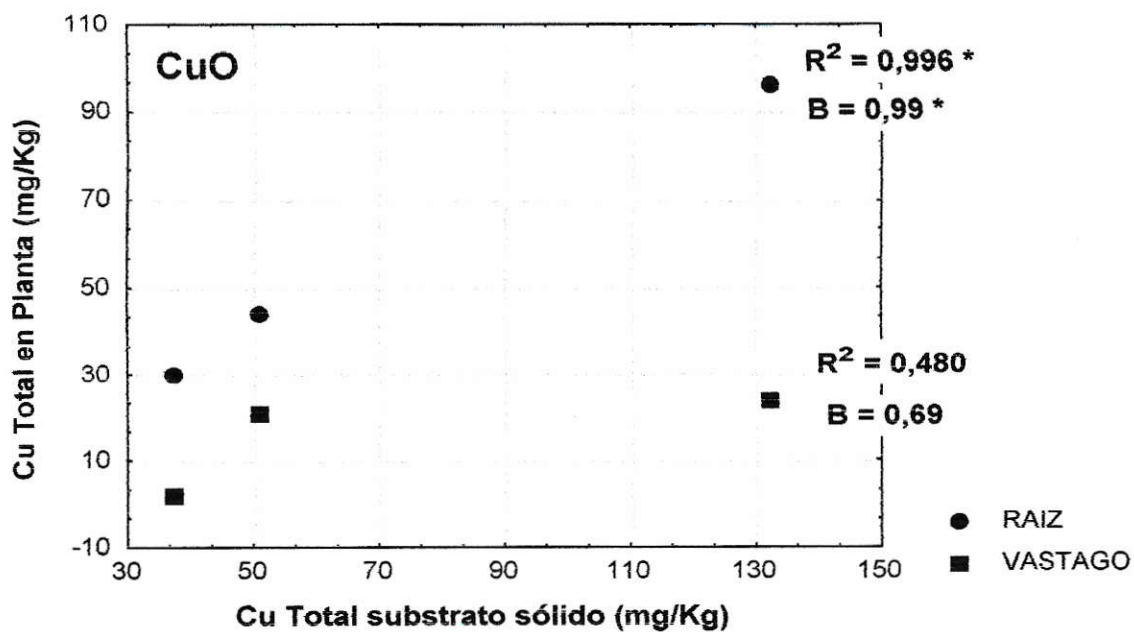


Figura 39: Relación entre el contenido de cobre total en el sustrato sólido sometido a adiciones de CuO y el contenido de cobre en las plantas. Determinación realizada mediante regresión lineal simple.

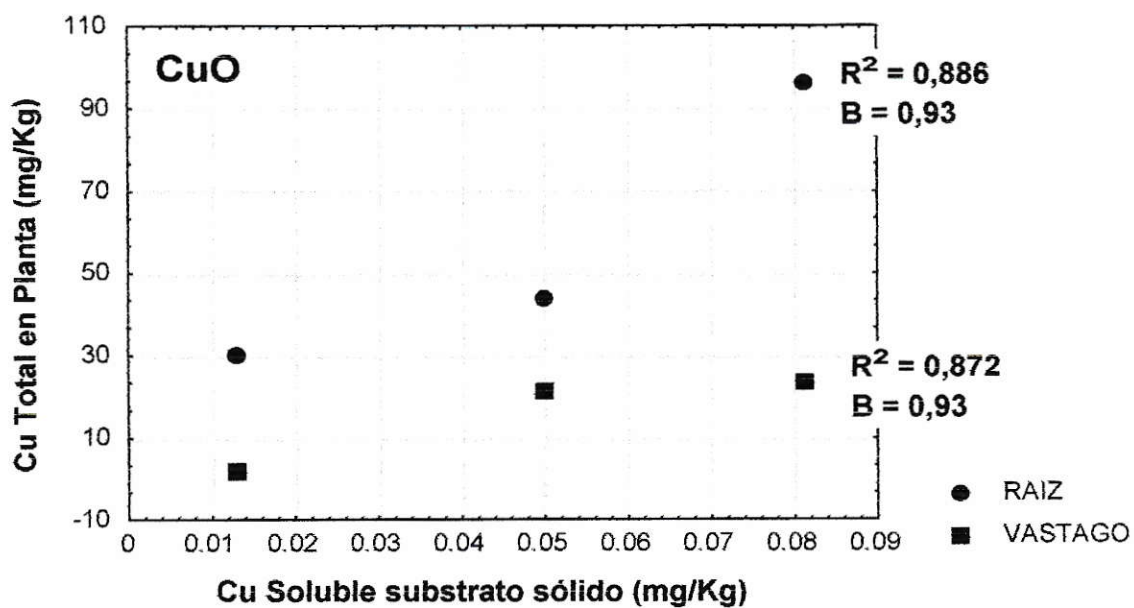


Figura 40: Relación entre el contenido de cobre soluble en el sustrato sólido sometido a adiciones de CuO y el contenido de cobre en las plantas. Determinación realizada mediante regresión lineal simple.

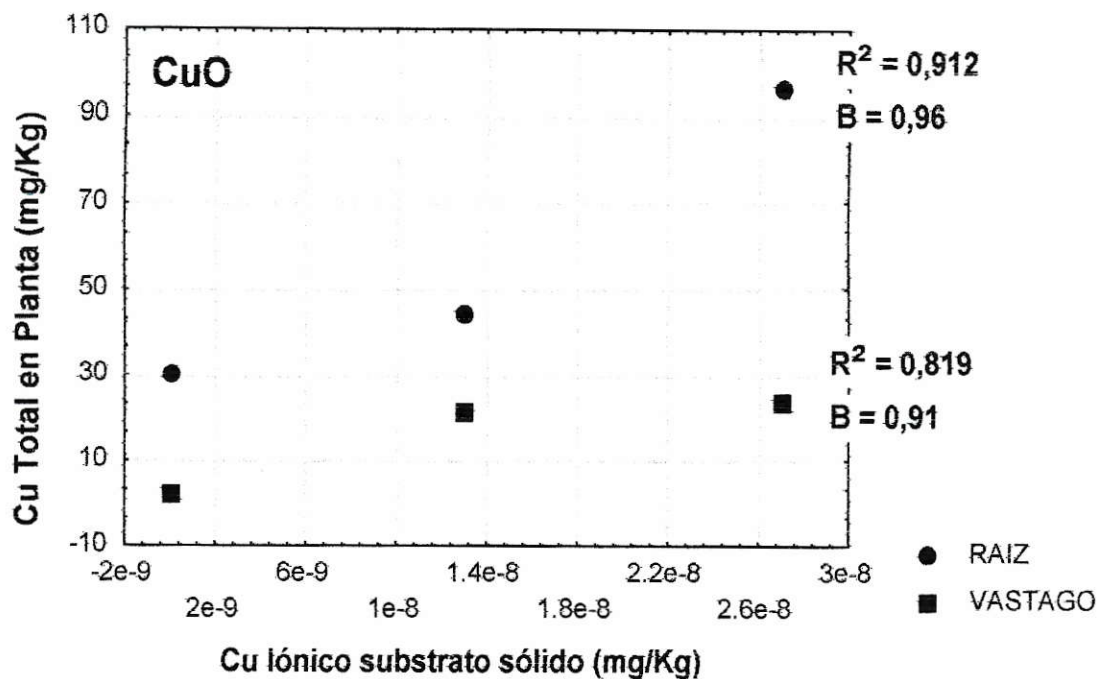


Figura 41: Relación entre el contenido de cobre iónico en el substrato sólido sometido a adiciones de CuO y el contenido de cobre en las plantas. Determinación realizada mediante regresión lineal simple.

De acuerdo a los resultados obtenidos en estos análisis, es posible aseverar que el conocimiento de la concentración de cobre total, cobre soluble y cobre iónico presentes en un sustrato determinado, no permite establecer certeramente los niveles de cobre captado por las plantas, y trasladados a los vástagos.

Además, es posible establecer que las relaciones entre los contenidos de cobre total, cobre soluble y cobre iónico de las muestras de sustrato sólido sometidas a adiciones de CuSO_4 y los contenidos de cobre en las plántulas desarrolladas en estos mismos sustratos, son mayormente significativas que en el caso de las muestras de sustrato sólido y plántulas sometidas a adiciones de CuO . Tal fenómeno se atribuye a la baja solubilidad del CuO , lo que se tradujo en un desmedro de la captación de cobre por las plántulas crecidas en sustrato sólido enriquecido con este compuesto.

En este mismo contexto, al comparar las concentraciones de cobre total, cobre soluble y cobre iónico presentes en el sustrato sólido utilizado en los distintos tratamientos, con los niveles de cobre total aproximados de cada una de las raíces y vástagos de las plántulas mantenidas en este sustrato, es posible determinar la cantidad de cobre que captó cada plántula, considerando que por cada tratamiento, se contaba con 10 réplicas (tabla 23).

Tabla 23: Concentración de Cu total, Cu soluble y Cu iónico del sustrato sólido sometido a los distintos tratamientos y los niveles de cobre encontrados en las raíces y vástagos de las plántulas crecidas en este mismo sustrato.

Tratamiento	Conc. Cu Total (mg/kg)	Conc. Cu Soluble (mg/kg)	Conc. Cu Iónico (mg/kg)	Conc. Cobre en cada raíz ¹ (mg/kg)	Conc. Cobre en cada vástago ¹ (mg/kg)
Control	37,25	0,013	7,93E-11	2,0	0,2
CuSO_4 10 mg/kg	51,44	0,068	2,95E-8	5,0	2,0
CuSO_4 100 mg/kg	139,8	0,194	2,06E-7	13,0	3,0
CuO 10 mg/kg	51,01	0,050	1,34E-8	3,0	1,0
CuO 100 mg/kg	132,3	0,081	2,66E-8	5,0	2,0

¹ concentración de cobre total presente en cada una de las réplicas realizadas. Este valor constituye solo una aproximación grosera del contenido de cobre en cada estructura vegetal.

En la tabla 23, se observa que las concentraciones de cobre captadas por las plántulas sobrepasan notoriamente los contenidos de cobre iónico del substrato sólido, que corresponde a la forma química del cobre que se encuentra fitodisponible. De tal modo, puede pensarse que el cobre captado por las plantas no sólo está constituido por el cobre iónico, sino también por otra forma química del cobre no considerada en los análisis, ya que los niveles de cobre encontrados tanto en las raíces como en los vástagos son muy superiores, incluso, a los niveles de cobre soluble encontrados, que corresponde a la otra fracción de cobre posiblemente biodisponible para las plantas.

Una explicación a las diferencias encontradas entre los niveles de cobre biodisponible en las muestras de substrato sólido y las concentraciones de cobre total determinadas en las muestras vegetales de *Noticastrum sericeum*, es la posible contaminación de los tejidos vegetales por las partículas del substrato sólido, lo que pudo haber sesgado positivamente las concentraciones de cobre total determinadas en las muestras vegetales, particularmente en las raíces. Además, debido a que el contenido de cobre total de los tejidos vegetales es mayor al contenido de cobre iónico determinado en las muestras de substrato sólido, se presume que existe un equilibrio tal en el substrato sólido, que a medida que las plántulas absorben los iones cobre, se produce una mayor solubilización de los compuestos de cobre adicionados al substrato sólido, de acuerdo a la constante de solubilidad de estos compuestos y a las características fisicoquímicas del substrato sólido utilizado en el ensayo. En este punto, es primordial considerar que en el substrato sólido se producen equilibrios químicos, los cuales son desplazados por las raíces de las plántulas al absorber uno de los productos de la solubilización.

Sin embargo, debido a que las plantas contienen cobre en las moléculas que la conforman (por ejemplo en los sitios activos de las proteínas), no se descarta la posibilidad de un aporte de cobre por parte estas, ya que el proceso de digestión por microondas al cual fueron sometidas las plántulas es muy violento, lo cual produciría una destrucción de las moléculas y una liberación del cobre.

VII.- CONCLUSIONES

Mediante el estudio realizado, se logró determinar de forma clara, rápida y sencilla, los efectos fitotóxicos producidos por el cobre sobre un tipo de planta herbácea perenne, nativa de Chile. Además, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- El presente estudio dejó de manifiesto la importancia del tipo de sustrato de crecimiento en relación al efecto fitotóxico producido por el cobre, puesto que casi la totalidad de las plántulas mantenidas en sustrato sólido no presentaron efectos de toxicidad por efecto de las adiciones de cobre realizadas, independiente de la forma química y de la concentración de cobre agregadas. Por el contrario, las plántulas cultivadas en solución se vieron bastante afectadas por las adiciones de cobre, presentando evidentes efectos fitotóxicos. De tal modo, se ratifica en parte el primer punto de la hipótesis planteada al inicio de este estudio, puesto que el cobre solo produjo efectos de fitotoxicidad en las plántulas cultivadas en sustrato líquido. Sin embargo, se ratifica totalmente el segundo punto de la hipótesis, ya que la adición de compuestos de cobre al sustrato líquido produjo mayor fitotoxicidad que la adición de estos mismos compuestos de cobre al sustrato sólido.
- Además, el estudio realizado permitió diferenciar los efectos fitotóxicos producidos por la adición de 2 formas químicas distintas del cobre (CuSO_4 y CuO) en las plántulas mantenidas en solución. Claramente, aquellas plántulas mantenidas en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L enriquecida con CuSO_4 fueron mayormente afectadas por el efecto tóxico del cobre que aquellas mantenidas en solución enriquecida con CuO . Tal efecto, es atribuible a la mayor solubilidad en agua que posee el CuSO_4 en comparación con la presentada por el CuO . Esta diferenciación en los efectos tóxicos de las plántulas ante la adición de distintas

formas químicas del cobre, sólo fue observable en las plántulas mantenidas en substrato líquido, ya que las plántulas mantenidas en tierra de hoja no presentaron síntomas visibles. Mediante estas observaciones, el tercer punto planteado como hipótesis en el presente estudio es parcialmente ratificado, dado que solo se confirma la mayor fitotoxicidad del CuSO_4 ante el CuO en el substrato líquido de crecimiento.

- Aunque no se esperaba una diferenciación tan marcada en los efectos tóxicos de las plántulas de acuerdo al substrato de crecimiento, el presente ensayo fue muy útil para comparar las respuestas de las plántulas producto de las adiciones de cobre realizadas y para confirmar la gran capacidad complejante que posee la MO. De tal modo, los resultados de este estudio enfatizan el rol de la MO y del pH en la determinación de la biodisponibilidad del cobre en el substrato sólido.
- Asimismo, el presente estudio destaca las diferencias producidas en las respuestas de las plántulas mantenidas en solución ante la adición de distintas dosis de cobre (ya sea 0, 10 o 100 mg/L). Se observó claramente que las plántulas mantenidas en solución enriquecida con 10 mg/L de cobre fueron menos afectadas morfofisiológicamente que aquellas mantenidas en solución enriquecida con 100 mg/L de cobre. Mientras mayor fue la concentración de cobre en el substrato, mayor fue la cantidad captada por las plántulas a través de la raíz y, por lo tanto, una mayor cantidad de cobre pasó al vástago debido a la traslocación realizada por la planta.
- Los altos niveles de cobre encontrados en las raíces y vástagos de las plántulas mantenidas en substrato líquido demuestran que probablemente esta fue la principal causa de la necrosidad experimentada por estas plántulas, especialmente en aquellas mantenidas en soluciones enriquecidas con CuSO_4 . La captación excesiva de cobre efectuada por las plántulas mantenidas en solución produjo efectos de fitotoxicidad global, como clorosis de hojas, disminución del

crecimiento, baja producción de hojas nuevas y finalmente necrosis. Adicionalmente, la mayor parte de las plántulas en sustrato líquido sometidas a niveles tóxicos de cobre, evidenciaron disminución en el número de ramificaciones, atrofia y engrosamiento de la raíz principal. Contrariamente, las plántulas en sustrato sólido crecieron normalmente, sin presentar efectos fitotóxicos aparentes, evidenciando vástagos y raíces fuertes y de gran tamaño.

- La presencia o ausencia de efectos de toxicidad en las plántulas sometidas a ensayo, concordaron ampliamente con la determinación de los contenidos de cobre en las raíces y vástagos de estas plántulas, ya que los niveles de cobre encontrados en las estructuras vegetales de las plántulas mantenidas en solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L enriquecida con cobre, fueron evidentemente superiores a los contenidos de cobre encontrados en las raíces y vástagos de las plántulas crecidas en sustrato sólido.
- El rango de concentración utilizado en el presente estudio, de 0 a 100 mg/kg o mg/L de cobre, fue insuficiente para observar efectos de toxicidad en las plántulas mantenidas en sustrato sólido. Sin embargo, es altamente probable que a mayores concentraciones de cobre adicionadas al sustrato sólido (las que superen la capacidad tamponante de este sustrato), se evidencien ciertos efectos fitotóxicos en las plántulas. Por el contrario, el rango de concentración escogido en el ensayo, fue suficiente para producir efectos fitotóxicos notorios y tempranos en las plántulas mantenidas en solución.
- Producto de la aplicación del proceso analítico en el presente estudio, es posible establecer que los resultados obtenidos presentan un alto nivel de confiabilidad y validez. Sin embargo, en todo análisis químico existe un error asociado, lo cual no se traduce directamente en una reducción de la calidad analítica del proceso.

VIII.- COMENTARIO FINAL

Mediante la realización del presente estudio se establece que los análisis de suelos y vegetales realizados adecuadamente, pueden proporcionar una confiable estimación de la carga de metales pesados del suelo proveniente de varias fuentes contaminantes, y también pueden reflejar variaciones inusuales en las concentraciones basales sobre las cuales la contaminación es super impuesta.

Además, la salud y subsistencia de las generaciones futuras demandan que nuestros recursos naturales sean protegidos contra el envenenamiento por metales pesados generado por la industria urbana, minería, y actividades agrícolas. Por consiguiente, los investigadores en el área de la química de suelo pueden, y podrían continuar jugando un rol importante en las investigaciones futuras, colaborando además, con el mejoramiento de las leyes nacionales de disposición y uso de materiales tóxicos, conduciendo así, a un futuro más promisorio.

Por lo tanto, es altamente recomendable seguir realizando ensayos de toxicidad de cobre y con otros metales pesados, utilizando diversas matrices ambientales de estudio y distintos compuestos metálicos.

IX.- REFERENCIAS

- Adriano, D.C (1992). Biogeochemistry of trace metals. D.C. Adriano (ed.). Pp 513. Lewis Publishers, Boca Raton. FL.
- Allen, H.; Huang, Ch.; Bailey, G. & Bowers. A. (1995). "Metal Speciation and Contamination of Soil", Lewis Publishers. CRC Press, Inc. Pp 358. USA, Boca Raton. FL.
- Alloway, B.J. (ed.) (1994a). Soil processes and behaviour of heavy metals. En: Heavy Metals in Soils. 2nd ed. Pp. 11-37. Blackie Academic & Professional, London.
- Alloway, B.J. (1994b). The origin of heavy metals in soils. In: Heavy Metals in Soils. B.J. Alloway (ed.). 2nd ed. Pp. 38-57. Blackie Academic & Professional, London.
- Antonovics, J.; Bradshaw, A.D. & Turner R.G. (1971). Heavy metal tolerance in plants. Adv. Ecol. Res., 7, 1-85.
- Baker, A.J.M. (1981). "Accumulators and Excluders. Strategies in the Response of Plants to Heavy Metals". Journal of Plant Nutrition, 3: 643-654.
- Baker, A.J.M. (1987). Metal Tolerance. New Phytol. 106: 93-11.
- Baker, A.J.M. & Walker, P.L. (1989). Physiological Responses of Plants to Heavy Metals and the Quantification of Tolerance and Toxicity. Chem. Speciation Bioavailability, 1:7-17.
- Begon, M.; Harper, J.L. & Townsend, C.R. (1990). Ecology. Individuals, populations and communities. Pp 945. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Belsberg, A.M., Lithner, G. & Tyler, G. (1981). Copper in the environment. EPA sueca, PM N° 1424. Pp 109. Suecia.
- Berqvist, U. & Sundbom, M. (1980). Copper-Health and Hazard. Universidad de Estocolmo, Instituto de Física, USIP Report 78-0.5.
- Berrow, M. & Burridge, J.C. (1977). Trace element levels in soils: Effect of sewage sludge. En: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Pp 159-183. Inorganic Pollution and Agriculture. London, HMSO.
- Berry, W.L. & Wallace, A. (1981). Toxicity: the concept and relationship to the dose response curve. J. Plant Nutrit., 3, 13-19.

- Bonner, J. & Galston, A.W. (1967). *Principios de fisiología vegetal*. Aguilar, 5ª ed. Pp 485. Madrid.
- Bourg, A.C.M. (1995). Speciation of Heavy Metals in Soils and Groundwater. En: *Heavy Metals. Problems and Solutions*. Salomons W., Förstner U. & Mader P. (Eds.). Pp 485. Springer-Verlag, Berlin. FL: 3-17. Printed in Germany.
- Bowen, H.J.M. (1979). "Environmental Chemistry of the Elements". Academic Press, London.
- Buffle, J. & Stumm, W. (1994). General Chemistry of Aquatic Systems. En: "Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems". J. Buffle and R.R. DeVitre, (eds.), Pp. 1-42. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Daubenmire, R.F. (1974). *Plants and Environment. A textbook of plant autoecology*. Pp 422. John Wiley and Sons, New York.
- Davies, B.E. (1981). *Applied soil trace elements*. B.E. Davies (ed.). Pp 482. Wiley & Sons, New York.
- Davis G.K & Mertz W. (1987). "Copper". En: *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. Mertz, W. (ed.). Pp 301-364. Academic Press, San Diego.
- Ernst, W.H.O. (1972). Ecophysiological studies on heavy metal plants in South Central Africa. *Kikria* 8, 125-145.
- Ernst, W.H.; Verkleij, J.A.C. & Schat, W. (1992). Metal tolerance in plants, *Acta Bot. Nerl.*, 41: 229-248.
- Farago, M. (1994). "Plants and the Chemical Elements". *Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity*. Margaret E. Farago. VCH. Weinheim.
- Fernández, J.C. & Henríquez, F.S. (1991). Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *The Botanical Review* 57(3): 246-273.
- Flanagan, P.W. & Van Cleve, K. (1983). Nutrient cycling in relation to decomposition and organic matter. *Can. J. For. Res.* 13: 795-817.
- Flemming, C.A. & Trevors, J.T. (1989). Copper toxicity and chemistry in the environment: A review. *Water, Air and Soil Pollution*, 44:143-158.
- Folkesson, L. (1982). Impact of acidity and other soil factors on the uptake of metals in plants. Dept. of Plant Ecology, University of Lund. Report N° 49. Suecia.

- Forbes, R.H. (1917). Certain effects under irrigation of copper compounds upon crops. Univ. California. Public. In Agric. Sci., 1: 395-494.
- Ginocchio, R. (1997). Tesis Doctoral: Aplicabilidad de los modelos de distribución espacio-temporales de la vegetación en ecosistemas terrestres sujetos a procesos de contaminación. Universidad Católica de Chile.
- González, S.P. (1991). Estrategias para la Evaluación de Impactos de Procesos Contaminantes en la Agricultura. El Conflicto Minería-Agricultura en Chile. *Simiente*, 61(1): 65-77.
- González, S (1994a). Geoquímica de elementos trazas en Chile. En: VI Simposio sobre Contaminación Ambiental "Impacto Ambiental de Metales Pesados en Chile", INIA-U. de Chile-INACAP, Santiago (21-22/04/94). Pp:199-234.
- González, S. (1994b). Capítulo 11. Estado de la contaminación de suelos en Chile. En: CONAMA. Perfil Ambiental de Chile. Santiago. Pp.: 199-234.
- Graham, R.D. (1979). Transport of copper and manganese to the xylem exudate of sunflower. *Plant, Cell Environ.* 2: 139-143.
- Groves, R.H; Beard, J.S.; Deacon, H.J.; Lambrechts, J.J.N; Rabinovitch-Vin, A.; Specht, R.L. (1983). The origins and characteristics of Mediterranean ecosystems. En: *Mineral nutrients in mediterranean ecosystems*. Day J.A. (ed.). Pp 1-17. South American National Scientific Programmes. Report N°71. CSIR, South Africa.
- Handbook of Chemistry and Physics, 61 st. Ed., (1980-1981).
- Hewitt, E.J. & Smith, T.A. (1975). *Plant Mineral Nutrition*, London: English University Press.
- Hobbie, S.E. (1992). Effects of plant species on nutrient cycling. *TREE* 7(10): 336-339.
- Holmgren, G.S.; Juve, R.L. & Geschwender, R.C. (1977). A mechanically controlled variable rate leaching device. *Soil Sci. Amer. J.* 41:1207-1208.
- Irving, H. & Williams, R.J.P.(1953). Stability of transition metal complexes. *J. Chem. Soc.* 3182-8210.
- Jenssen, W.A. & Salisbury, F.B. (1988). *Botánica*. 762p. McGraw-Hill. New York.
- Kabata-Pendias, A. & Pendias, H. (1984). *Trace Elements in Soils and Plants*, Pp 365. CRC Press. Inc. Boca Raton, Fl.

- Kabata-Pendias, A. (1995). Agricultural Problems Related to Extensive Trace Metal Contents of Soils. En: Heavy Metals, problems and solutions. Salomons, W.; Förstner, U. & Mader, P. (eds.). Pp: 3-18. Springer-Verlag, Berlin.
- Laarsen, S. (1966). The sorption, desorption and translocation of copper by plants. *Agrochemical* 10: 190-196.
- Lander, L. & Linderström, L. (1999). Copper in society and the environment. An account of the facts on fluxes, amounts and effects of copper in Sweden. 2^oed. Pp 329. Swedish Environmental Research Group (MFG).
- Larcher, W. (1980). *Physiological plant ecology*. Pp 506. Springer-Verlag, Berlin.
- Leeper, G.W. (1952). Factors affecting availability of inorganic nutrients in soil with special reference to micronutrients metals. *Annual Rev. Plant Physiol.* 3: 1-16.
- Lexmond, T.M. (1980). The effect of soil pH on copper toxicity to forage maize grown under field condition. *Neth. J. Agric. Sci.*, 28: 164-184. Referred to in Folkesson, 1982.
- Lexmond, T.M. & Vorm, P.D.J. (1981). The effect of pH on copper toxicity to hydroponically grown maize. *Neth. J. Agric. Sci.* 29:217-238.
- Lindsay, W.L. (1974). Role of chelations in micronutrient availability. En: Carson E.W. (ed.). *The plant root and its environment*. Pp 507-524. University Press of Virginia, Charlottesville.
- Lindsay (1979). "Chemical Equilibria in Soils", John Wiley and Sons.
- Manual de operación de equipo de digestión de microondas Millestone MLS 1200 Mega.
- Markert, B. & Klausmeyer, N. (1990). Variation in the elemental compositions of plants and computer aided sampling in ecosystems. *Toxicol. Environ. Chem.* 25: 200-212.
- Marschner, H. (1986). *Mineral Nutrition of higher plants*. Pp 674. Academic Press, London.
- Minnich, M.M.; McBride, M.B. & Chaney, R.L. (1987). Copper activity in soil solution: II. Relation to copper accumulation in young snapbeans. *Soil Sci. Am. J.* 51:573-578.

- Nicholas, D.J.D. (1975). The functions of trace elements in plants. In: D.J.D. Nicholas and A.R. Egan (eds.), Trace Elements in Soil-Plant-Animal Systems, pp. 181-198. Academic Press. London.
- Paetz and Crobmann (1994), in "Environmental sampling for trace analysis", B. Markert (ed.), Referred to in Folkesson, 1982.
- Rhoades, J.D. (1982). Soluble Salts. In Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. 2nd ed. A.L. Page, R.H. Miller, and D.R. Keeney (eds.) Agronomy 9:167-179.
- Richards, L.A. (eds.). (1954). Salinity Laboratory Staff. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. U.S. Dept of Agric. Handb. 60, U.S. Govt. Print Office, Washington DC.
- Rowell, D. (1994) "Soil Science: Methods and Applications", Longman group UK Limited, 1994.
- Sandmann, G. & Böger, P. (1983). The enzymatological function of heavy metals and their role in electron transfer processes of plants. En: Encyclopaedia of plant physiology, New Series. Vol. 15^a. Läuchi, A. & Bielecki, R.L. (eds.). Pp. 563-596. Springer-Verlag, Berlin-New York.
- Schlesinger, W.H. (1991). Biogeochemistry. An analysis of global change. Academic Press, San Diego. Pp. 443.
- Schnitzer, M. & Skinner, S.I.M. (1996). Organo-metallic interactions in soils: 5. Stability constants of Cu⁺², Fe⁺², and Zn⁺²- fulvic acid. Soil Sci. 102:361-365.
- Schumacher, B.; Neary, A.; Palmer, C.; Maynard, D.; Pastorek, L.; Morrison, Y. & Marsh, M. (1995). "Laboratory Methods for Soil and Foliar Analysis in long-term Environmental Monitoring Programs", documento EPA 600/R-95/077.
- Shorrocks, V.M. & Alloway, B.J. (1985). Copper in plant, animal and human nutrition. Copper Development Association, Report TN 35. Orchard House.
- Sparks, D.L. (1995). "Environmental soil chemistry". Department of Plant and Soil Sciences. Academic Press. Pp 267. Univ. Of Delaware, Newark, Delaware.
- StatSoft (1993). Statistica for Windows, version 4.5, USA.
- Steel, G.D. & Torrie, J.H. (1985). Bioestadística. Principios y procedimientos. McGraw-Hill, Pp. 622. Colombia.

- Stevenson, F.J. (1982). "Humus Chemistry". Pp 485. John Wiley and Sons, New York.
- Stevenson, F.J. & Ardakani, M.S. (1972). Organic matter reactions involving micronutrients in soils. En: Micronutrients in agriculture. J.J. Mortvedt et al. (eds.). Pp. 79-114. Soil Sci. Soc. Am., Madison, WI.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (1991). Plant physiology. The Benjamin-Cummings Publishing Company, Inc. Pp 559. New York.
- Treshow, M. (1970). Environment and plant response. Pp 422. McGraw-Hill Book Company. New York.
- USDA (1996) "Soil Survey Laboratory Methods Manual", Soil Survey Investigations Report N° 42, version 3.0, National Soil Survey Center, Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture, January 1996.
- USEPA (1995), "Test methods for evaluating solid waste: physical/chemical methods", Office of Solid Waste, EPA 530/ SW-846, (3rd edition).
- Vitousek, P.M. & Walker, L.R. (1987). Colonisation, succession and resource availability: Ecosystem-level interactions. Gray, A.J.; Crawley, M.J. & Edwards, P.J. (eds.). Pp 207-340. Blackwell Scientific Publications. New York.
- Wallace, A. & Berry, W.L. (1979). Trace Element in the Environment. Effects and potential toxicity of those associated with coal. En: Ecology and Coal Resource Development. Wali M.K. (ed.). Pp 95-114. Pergamon Press, New York.
- Walley, K.A.; Khan, M.S.I. & Bradshaw, A.D. (1974). The Potential for Evolution of Heavy Metal Tolerance in Plants. *Heredity* 32: 309-319.
- Webber, J. (1981). Effect of Heavy Metal Pollution on Plants, En: Vol. 2, Metals in the Environment. Lepp, N.W. (ed.). Applied Science, London.
- Woolhouse, H.W. (1983). Toxicity and tolerance in the response of plant to metals. En: Encyclopaedia of plant physiology, New Series. Vol. 12C. Lange O.L. et al. (eds.). Pp 246-300. Springer-Verlag, Berlin-New York.

APENDICE 1

*LUGAR DEL ENSAYO DE FITOTOXICIDAD CON COBRE Y SUS
CARACTERISTICAS*

LUGAR DEL ENSAYO

En el ensayo realizado se consideró esencialmente 7 etapas, las cuales se mencionan a continuación:

La etapa 1 consistió en la siembra de las semillas de *Noticastrum sericeum* en cápsulas de Petri y en la obtención de plántulas de *Noticastrum sericeum* (4 días en la cámara de crecimiento).

La etapa 2 se basó en la preparación de las soluciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5g/L enriquecidas con cobre, enriquecimiento del sustrato sólido (tierra de hoja) con cobre, acondicionamiento del sustrato sólido mediante repetidas adiciones de agua destilada, homogeneización manual y secado al aire del sustrato. Se debe considerar que las concentraciones adicionadas corresponden a niveles teóricos de cobre.

La etapa 3 consistió en el montaje del ensayo, lo que involucró la transferencia de las plántulas desde las cápsulas de Petri a vasos plásticos de 90 ml (una plántula por vaso), los que contenían uno de los 2 tipos de sustratos (solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L o tierra de hoja comercial), y una de las dosis experimentales de cobre.

La etapa 4 se basó en la mantención del ensayo, relacionado con el cambio de las soluciones líquidas cada 2 días y riego del sustrato sólido con agua desionizada cada 2 días.

La etapa 5 consistió en la cosecha de las plántulas.

La etapa 6 se basó en la evaluación cualitativa y cuantitativa de las respuestas morfofisiológicas de las plántulas y en el análisis de los resultados.

Por último, la etapa 7 consistió en el análisis fisicoquímico de las muestras de tierra de hoja y el análisis químico de las plántulas utilizadas en el ensayo.

Cada una de las etapas 1 a 6 del ensayo, se realizó en distintas dependencias del Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile:

- Etapa 1:** La siembra de las semillas en cápsulas de Petri se realizó en una sala de trabajo apta para tal procedimiento. La germinación de las semillas se realizó en una cámara de crecimiento, con condiciones controladas de luz, fotoperiodo y temperatura.
- Etapa 2:** Toda la preparación de soluciones y acondicionamiento de la tierra de hoja se realizó en la sala de trabajo.
- Etapa 3:** El montaje del ensayo se realizó en la sala de trabajo, para luego trasladar los potes de estudio a un invernadero.
- Etapa 4:** Toda la mantención del ensayo se realizó en un invernadero acondicionado para el crecimiento adecuado de las plántulas.
- Etapa 5:** La cosecha de las plántulas se realizó en la sala de trabajo.
- Etapa 6:** El análisis y evaluación del ensayo se realizó en variadas dependencias de la Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Etapa 7:** Los análisis químico de vegetales y fisicoquímico del sustrato sólido se realizaron en laboratorios del Centro de Investigaciones Mineras y Metalúrgicas (CIMM) (Apéndice 3).

CARACTERISTICAS DEL LUGAR DEL ENSAYO

- La sala de trabajo en donde se realizó la siembra de las semillas, el montaje del ensayo y la cosecha de las plántulas, es una sala de 5X7 metros, la cual cuenta con extensos mezones que facilitaron los procedimientos anteriormente mencionados. Además, se destaca la excelente iluminación y ventilación que este lugar posee.
- La cámara de crecimiento utilizada para la germinación de las semillas, es una habitación de 4x4 metros, la cual se caracteriza por la existencia de luz artificial intensa, emanada de tubos fluorescentes de 18 WTB, y con una regulación de fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 h de oscuridad, lo cual facilitó el proceso de germinación y/o crecimiento de los vegetales de estudio.
- El invernadero donde se mantuvo el ensayo, es una habitación de 10X10 metros, la cual posee amplios ventanales, y cuenta con un sistema de automatización de la temperatura, humedad y del fotoperiodo. Este lugar se caracteriza por proporcionar un fotoperiodo de 12 horas de luz (principalmente natural, complementada con luz artificial emanada de tubos fluorescentes que proporcionan radiación fotosintética de 15W y 35 lux) y 12 horas de oscuridad; además, cuenta con sistema de aire acondicionado automatizado para regular la temperatura, con un humidificador (A fhoenix manufacturing. Hidro-cooling) para controlar la humedad relativa y con un ventilador para homogeneizar el aire interior, en cuanto a su temperatura y humedad.
Asimismo, el invernadero cuenta, con mezones de 1 metro de altura aproximadamente, en donde se situaron los 50 potes con substrato sólido y los 50 potes con substrato líquido, en forma aleatoria.
- Por último, la totalidad de los análisis de datos realizados, se efectuaron en dependencias de la PUC, las cuales poseen los instrumentos necesarios para la medición de los parámetros respuesta considerados y, además, para la evaluación estadística de los datos.

APENDICE 2

*INSTRUMENTOS, MATERIALES Y REACTIVOS UTILIZADOS EN EL ENSAYO DE
FITOTOXICIDAD CON COBRE*

INSTRUMENTOS Y APARATOS

- Purificador de agua (desionizador por osmosis reversa). Option 3. USF elga.
- Termómetro de lectura instantánea y medidor de humedad. Thermo-hygro clock. Arquimed.
- Termómetros de alcohol de lectura mínima y de lectura máxima. Diplex Staniless.
- Ventilador doméstico. TMT.
- Radiador fotosintético de 15 W y 35 lux. Poot Lichtenergie PL-90.
- Sistema de aire acondicionado automático. Johnson controls.
- Humidificador. A fhoenix manufacturing. Hidro-cooling. Comfo-matic. Frigidaire.
- Balanza analítica. Sartorius, Cientec.

MATERIALES UTILIZADOS

- 3 cápsulas de Petri, cover Kimax USA, de 10 cm de diámetro.
- Papel absorbente.
- Tierra de hoja comercial. Terra Green.
- Semillas de *Noticastrum sericeum*, extraídas previamente desde la zona de Ventanas (V Región de Chile).
- 100 vasos de polietileno (plástico) de 90 ml de capacidad. Plásticos Warda.
- Pinzas metálicas de laboratorio, Egth solinger Stahl.
- Recipientes plásticos de lavado de 5L de capacidad, British Plastics PTY. Ltd.
- Matraz de aforo de 5 L. Pyrex.
- 5 matraces de aforo de 1L. Pyrex.
- Probeta de 250 ml. Pyrex.
- Tamiz metálico para la obtención de un tamaño de partícula <5mm.
- Bolsas plásticas con sello superior. Clic.
- Regla metálica de acero inoxidable.
- Sobres de papel blanco para guardar las muestras vegetales.
- Paraplast.

REACTIVOS UTILIZADOS

- Agua desionizada a pH 4,77 y C.E de 8,4 $\mu\text{S}/\text{cm}$.
- Nitrato de calcio (II). Calidad pro-análisis. Riedel-de Haën: Se preparó una solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 g/L, agregando 2,5 g del reactivo a un matraz de aforo de 5 L aforando con agua desionizada a pH 4,77.
- Sulfato de cobre (II) anhidro. Calidad pro-análisis. Riedel-de Haën: El reactivo se agregó en forma sólida a la tierra de hoja (metodología 4.2.2) y se preparó soluciones cuyo procedimiento se indicó anteriormente (metodología 4.2.3).
- Oxido de cobre (II) anhidro. Calidad pro-análisis. Riedel-de Haën. El reactivo se agregó en forma sólida a la tierra de hoja (metodología 4.2.2) y se preparó soluciones cuyo procedimiento se indicó anteriormente (metodología 4.2.3).
- Solución de HCl 0,01N. Se preparó una solución de HCl 1N a partir de un tritrisol marca Merck 1.09970 en un matraz de aforo de 1L y se aforó con agua desionizada a pH 4,77. De la solución de HCl 1N, se adicionó 10 ml a un matraz de aforo de 1L y se completó volumen con agua destilada a pH 4,77.
- Acido etilendiaminotetraacético ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sal disódica (P.M: 372,24g/mol) (EDTA), pro análisis, Merck. Se preparó una solución de EDTA 0,05M, disolviendo 18,6 g de EDTA en un matraz de aforo de 1L y se adicionó agua desionizada a pH 4,77 hasta completar el volumen.
- Solución de ácido nítrico al 5%. Se agregó 250 ml de HNO_3 al 70% para análisis marca Winkler, en un matraz de aforo de 5 L y se completó el volumen con agua desionizada a pH 4,77.

APENDICE 3

LUGAR DE LOS ANALISIS QUIMICO Y FISICOQUIMICO REALIZADOS A LAS MUESTRAS VEGETALES Y DE TIERRA DE HOJA Y SUS CARACTERISTICAS

LUGAR DE LOS ANALISIS

Los análisis químico y fisicoquímico se realizaron en dependencias de la Casa Matriz del Centro de Investigaciones Mineras y Metalúrgicas (CIMM).

La preparación de las muestras de tierra de hoja y de tejidos vegetales, además de la determinación de parámetros del sustrato sólido como: pH, determinación de la capacidad de intercambio catiónico, contenido de carbono orgánico, obtención del extracto de saturación, determinación del contenido de cobre iónico, etc. se realizaron en el Laboratorio de Suelos del CIMM.

Las determinaciones de cobre de las muestras de tierra de hoja y vegetales, y de cobre soluble del sustrato sólido, se realizaron en la sala de Espectroscopia del mismo Centro.

CARACTERISTICAS DE LOS LABORATORIOS DE ANALISIS

Tanto el Laboratorio de Suelos como la sala de Espectroscopia del CIMM cuentan con todas las condiciones necesarias para las determinaciones realizadas.

El Laboratorio de Suelos es una sala de 10X7 metros, se ubica en el segundo piso del edificio del CIMM y se caracteriza por contar con una excelente iluminación y aireación, mesones amplios para una manipulación correcta de las muestras, campana de extracción de gases en funcionamiento óptimo, sistema de almacenaje y preservación de muestras, implementos de seguridad adecuados al trabajo realizado e implementos de laboratorio de acuerdo a la normativa EPA. Este laboratorio cuenta, además, con equipos de última generación, como el equipo digestor de microondas, titulador automático, etc.

La sala de Espectroscopia es una sala de 5X5 metros, se ubica en el tercer piso del edificio del CIMM y se caracteriza por contar con un equipo de última generación en Espectroscopia de Absorción Atómica de llama y horno de grafito (con autosampler), iluminación adecuada al manejo del equipo, sistema de extracción de gases necesario para el funcionamiento del equipo, sistemas de refrigeración de muestras y campana de preparación de muestras debidamente iluminada.

APENDICE 4

*DESCRIPCION DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA-LLAMA
(FAAS) Y DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA-HORNO DE
GRAFITO (GFAAS)*

ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA-LLAMA (FAAS)

La espectrometría de absorción atómica llama se basa en la generación de átomos libres, los cuales pueden absorber o emitir radiación debido a la transición definida de los electrones de valencia del orbital externo del átomo.

La identificación específica de un elemento es factible en el rango de longitud de onda de 200-850 nm aproximadamente. Los límites de detección están en el orden de los 1-100 ng/ml, los cuales varían según el equipo utilizado.

Las interferencias químicas pueden ser superadas por calibración de la matriz, corrección del ruido de fondo y adición de compuestos que aumentan la eficiencia de atomización. Sin embargo, el rango de concentración es limitado, ya que sobre ciertos niveles, la relación entre la absorbancia y concentración pueden perder la linealidad.

ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA-HORNO DE GRAFITO (GFAAS)

La espectroscopia de absorción atómica con horno de grafito es el método espectrométrico comprobadamente más sensible para una gran cantidad de elementos. Los límites de detección son del orden de los sub-ng/ml.

Los errores en la determinación pueden reducirse por tratamientos del grafito como: revestimiento con pirografito u óxidos metálicos, por uso de tubos de carbono vítreo, y por operación del equipo a temperatura controlada y constante durante la atomización.

Una de las grandes ventajas de GFAAS es el análisis directo de las muestras sólidas sin previa descomposición. Por lo tanto, las muestras sólidas pueden ser introducidas directamente o como una solución. Sin embargo, la desventaja de esta técnica es el mayor tiempo requerido en la determinación en comparación a otras técnicas espectroscópicas.

APENDICE 5

*METODOLOGIAS DE ANALISIS QUIMICO Y FISICOQUIMICO DE MUESTRAS
VEGETALES Y DE SUBSTRATO SOLIDO*

APENDICE 5 a)

PROTOCOLO DE LAVADO: MATERIAL FUNGIBLE, PLASTICOS Y RECIPIENTES DE TEFLON

1. Materiales e instrumentos:

- Campana de flujo laminar clase 100. Labconco.
- Pancha calefactora, P Selecta. Recisplac.
- Equipo digestor de microondas Millestone MLS 1200, con sistema de evaporación de ácidos FAM 40.
- Rotor de digestión MDR 100/6/100/110.
- Rotor de evaporación de ácidos, FAM 40.
- Sistema de enfriamiento MDR.
- Vasos de digestión de teflón de 100 ml, TFM.
- Vasos de precipitado de 1L, Pyrex.
- Matraces de aforo de 1L, KIMAX.
- Baguetas de vidrio. Kimax (6x250mm).
- Dispensador manual, Merck, Dispensette, 2-10 ml, para HNO₃ Suprapur.
- Dispensador manual, Merck, Dispensette, 2-10 ml, para HCl Suprapur.

2. Reactivos:

- Detergente líquido (extra neutro). Winza-145.
- Agua destilada desionizada a pH 5,6.
- HCl 1:1. Se agregó aproximadamente 400 ml de HCl al 37% para análisis, marca Winkler Ltda. (densidad: 1,19 g/ml) y 400 ml de agua destilada desionizada a pH 5,6 a un vaso de precipitado de 1L, mezclando suavemente con una bagueta.
- HNO₃ 1:1. Se agregó aproximadamente 400 ml de HNO₃ al 70% para análisis, marca Winkler Ltda. (densidad: 1,42 Kg/L) y 400 ml de agua destilada desionizada a pH 5,6 a un vaso de precipitado de 1L, mezclando suavemente con una bagueta.
- HNO₃ 10%. Se agregó 100 ml de HNO₃ al 70% para análisis, marca Winkler Ltda. (densidad: 1,42 Kg/L) a un matraz de aforo de 1L y se aforó con agua destilada desionizada a pH 5,6.
- HCl 10%. Se agregó 100 ml de HCl al 37% para análisis, marca Winkler Ltda. (densidad: 1,19 g/ml) a un matraz de aforo de 1L y se completó el volumen con agua destilada desionizada a pH 5,6.
- HCl conc. Suprapur 65% (P.M: 36,46 g/mol; densidad 1,19 kg/L), Merck.
- HNO₃ conc. Suprapur 65% (P.M: 65,01 g/mol; densidad: 1,42 kg/L), Merck.

3. Procedimiento:

Todo el material utilizado en la determinación de cobre y extracto de saturación se lavó con solución de detergente extra neutro y se enjuagó con agua potable. Luego, se lavó con HNO_3 1:1 y se enjuagó con agua potable. Posteriormente, se lavó con HCl 1:1 y se enjuagó con agua potable y con abundante agua destilada desionizada a pH 5,6. Se dejó secar el material limpio bajo campana de flujo laminar clase 100 (Labconco), se embolsó el material fungible limpio dentro de recipientes plásticos con tapa hermética y se guardó en un lugar limpio y fresco.

El material utilizado en otras metodologías, como en la determinación del contenido de carbón orgánico y CIC, se lavó con solución de detergente extra neutro y se enjuagó con agua potable. Luego, se lavó con HNO_3 10% y se enjuagó con agua potable. Posteriormente, se lavó con HCl 10% y se enjuagó con agua potable y con abundante agua destilada desionizada a pH 5,6.

El material utilizado en la digestión y evaporación por microondas se dejó remojar durante media hora en HNO_3 1:1 caliente (a no más de 80°C , sobre plancha calefactora) y se enjuagó con agua potable. Luego, se dejó remojar durante otra media hora en HCl 1:1 caliente (a no más de 80°C , sobre plancha calefactora) y se enjuagó con agua potable y con abundante agua destilada desionizada a pH 5,6. El material limpio se dejó secar bajo campana de flujo laminar clase 100 (Labconco) y se embolsó dentro de recipientes plásticos con tapa hermética. Se guardó en un lugar fresco y limpio.

El rotor del sistema de evaporación siguió el mismo procedimiento de lavado anterior, pero con la mezcla de ácidos en frío.

Para el lavado de vasos de digestión por microondas, se agregó a cada vaso 5 ml de HCl concentrado y se colocaron en el horno microondas utilizando el siguiente programa:

Programa de lavado: Tiempo (min.) 15
 Potencia (Watt) 500
 Ventilación (min.) 10

Programa de evaporación: Tiempo (min.) 15
 Potencia (Watt) 500
 Ventilación (min.) 10

Posteriormente, se enjuagó cada vaso con agua destilada desionizada a pH 5,6. Luego, se les agregó 5 ml de HNO_3 concentrado y se colocaron nuevamente en el horno microondas utilizando el siguiente programa:

Programa de lavado: Tiempo (min.) 15
 Potencia (Watt) 500
 Ventilación (min.) 10

Programa de evaporación: Tiempo (min.) 15
Potencia (Watt) 500
Ventilación (min.) 10

Por último, cada vaso de teflón se enjuagó con bastante agua destilada desionizada a pH 5,6 y se secó el material limpio en un ambiente purificado, a temperatura ambiente (campana de flujo laminar).

APENDICE 5 b)

PREPARACION DE LABORATORIO DE MUESTRAS DE SUELO O SU EQUIVALENTE PARA ANALISIS FISICOQUIMICO

1. Instrumentos y aparatos:

- Secador de muestras, con circulación de aire y termostato. Marca N&G&Z.
- Molino recíproco con vaso de molienda de ágata de 250 ml y 12 bolas. Retsch, modelo S100.
- Balanza Acculab V-6000, capacidad 6000 g y exactitud de 1 g.
- Estufa de secado de muestras SL (Shel Lab), modelo: 1370 FX.

2. Materiales:

- Bandejas de plástico, 44x35cm, Plastigom.
- Rodillo de madera.
- Tamiz N° 10, con orificios de 2 mm, plástico Nalgene.
- Envases de polietileno de alta densidad para la mantención de las muestras, Zephyr M.R.
- Pipeta Pasteur.

3. Reactivos:

- Agua destilada desionizada a pH 5,6.
- HCl 1 N. Para la preparación de esta solución, se adicionó un tritrisol de HCl 1N, marca Merck 1.09970 a un matraz de aforo de 1L y se aforó con agua destilada desionizada a pH 5,6.

4. Preparación de las muestras:

Inicialmente, las muestras de tierra de hoja fueron registradas en el libro de registro de muestras de suelo del laboratorio. Posteriormente, se pesó una bandeja de plástico de 44x35 cm (lavada y seca) y se registró el peso en el libro de registro del laboratorio. Se esparció la muestra en la bandeja, disgregando la muestra con la mano protegida por guantes de látex, con el fin de disminuir el tamaño de las partículas, y efectuar un secado más parejo y rápido. Luego, se pesó la bandeja con la muestra, se registró el peso en el libro y se colocó la bandeja en el interior de una cabina de secado con tiraje forzado de aire, diseñada para operar a una temperatura no superior a los 30°C. Se procedió a moler manualmente la muestra antes de que esta estuviese seca, lo cual facilitó enormemente el trabajo de molienda. Se dejó secar las muestras hasta peso constante.

Se pesó la bandeja con la muestra seca al aire y se registró el peso en el libro de registro. La determinación de los pesos de cada una de las muestras se realizó al momento de llegada de la muestra y posterior a su secado al aire hasta peso constante, para así proceder a calcular el % de humedad de cada una de las muestras de substrato sólido, en función del peso de la muestra seca al aire.

Luego, las muestras fueron trituradas manualmente, para esto, se cubrió la muestra con un plástico y se pasó el rodillo de madera sobre ella, con el fin de moler los terrones. Posteriormente, se tamizó la muestra utilizando un tamiz de polietileno N° 10 (USDA, 1996). Esto corresponde a la fracción de substrato sólido con tamaño de partícula < 2 mm de diámetro.

Se pesó la fracción > 2 mm y se registró el peso en el libro de registro. Luego, se pesó la fracción < 2 mm y se registró el peso. Esta fracción fue retenida para análisis. La fracción >2 mm fue descartada.

Se esparció la fracción < 2 mm en la bandeja y se procedió a mezclarla en forma homogénea, con movimientos desde las esquinas al centro y luego se procedió a redistribuir la muestra, se realizó esto por lo menos 4 veces. Posteriormente, se distribuyó la muestra de substrato sólido lo mas pareja posible en la bandeja y se procedió a separar el substrato en cuatro porciones iguales (cuadrante), combinando dos porciones en forma diagonal, la cual se guardó como muestra. Se registró el peso en el envase plástico en el que se guardó la muestra y en el libro de registro del laboratorio.

Se combinó las otras dos porciones restantes y se guardó como muestra testigo, registrando el peso en el envase plástico y en el libro de registro.

Los datos que se anotaron en la etiqueta del envase plástico y en el libro de registro del laboratorio, fueron los siguientes:

- Número de muestra
- Fecha de preparación
- Peso de muestra
- Ubicación dentro del mueble
- Preparada por:

Unos 10 gramos de substrato sólido con tamaño de partícula < 2mm fueron molidos utilizando un molino de bolas (molino recíproco) durante 3 minutos a 580 rpm, hasta conseguir un tamaño de partícula $\leq 250 \mu\text{m}$.

Las muestras de substrato sólido fueron mantenidas a temperatura ambiente al interior de potes de polietileno de alta densidad. Las muestras de substrato con ambos tamaños de partículas (<2mm y <250 μm) fueron utilizadas en los distintos análisis, por lo tanto, todos los datos sobre su preparación fueron registrados en el libro de registros del laboratorio y en la etiqueta del envase.

Simultáneamente, se tomó 10 g de substrato sólido con tamaño de partícula < 2mm y se llevó a la estufa a 105°C por 24 horas, con el fin de eliminar cualquier indicio de humedad remanente y, de este modo, calcular el factor de humedad correspondiente a cada una de las muestras.

Se chequeó visualmente la presencia de carbonatos en las muestras de substrato sólido, para lo cual se colocó 1 g de muestra con tamaño de partícula < 2mm en un vidrio de reloj, se agregó agua destilada y se agitó suavemente con el fin de remover el aire atrapado; se agregó gotas de HCl 1N al substrato, se observó la cantidad de efervescencia producida y se registró la observación en el libro de registro, según las siguientes categorías:

- ◆ Ninguna (0)
- ◆ Trazas (T). Las burbujas aparecen en pocos puntos. Generalmente estas burbujas aparecen inmediatamente después de la adición de HCl 1N.
- ◆ Débil (W). Aparecen burbujas pequeñas y posiblemente unas pocas burbujas grandes.
- ◆ Mediana (M). Se evidencian burbujas más grandes que en una reacción débil. A menudo la reacción es violenta al principio y luego disminuye a una reacción que produce muchas burbujas pequeñas.
- ◆ Fuerte (S). La muestra efervece violentamente. Muchas burbujas grandes aparecen.

5. Cálculos:

(a) El % de Humedad se calculó a partir de la fórmula:

$$\% \text{Humedad} = \frac{(\text{Peso substrato húmedo}) - (\text{Peso substrato seco})}{(\text{Peso substrato seco})} * 100$$

(b) El factor de humedad de las muestras se calculó a partir de:

$$f.h = \frac{\text{masa substrato húmedo (seco al aire)}}{\text{masa substrato seco a } 105^{\circ}\text{C.}}$$

6. Referencias:

- USDA (1996) "Soil Survey Laboratory Methods Manual", Soil Survey Investigations Report N° 42, version 3.0, National Soil Survey Center, Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture, January 1996

APENDICE 5 c)

DETERMINACION DE pH DE SUELOS O EQUIVALENTES EN AGUA Y EN SOLUCION DE CaCl₂

1. Instrumentos y aparatos:

- pH-metro WTW Multiline P4, Universal-Meter.
- Electrodo combinado de pH de vidrio y calomelano, WTW Sentik 97T, con sensor de temperatura incorporado.
- Balanza electrónica, Precisa, Modelo 125A, sensibilidad 0,0001g.
- Dispensador manual, Eppendorf, Varispenser Plus, 5-25ml, para Cloruro de Calcio.
- Dispensador manual, Eppendorf, Varispenser Plus, 5-50ml, para agua destilada.
- Cronómetro.

2. Materiales:

- Cuchara de medición, 20g de capacidad.
- Vasos de polipropileno de 100 ml, Plasti-Brand.
- Baguetas de vidrio, Kimax (6x250mm).
- Vasos precipitados de 250ml. Pyrex.
- Matraces de aforo de 1L, KIMAX.
- Matraces de aforo de 100 ml, KIMAX.

3. Reactivos:

- Agua destilada desionizada a pH 5,6.
- Buffers de pH para calibración del electrodo.
 - pH 4,00: Se preparó a partir de un tritrisol 1.09884 (ácido hidrociorhídrico-citrato), marca Merck, para 500 ml de solución buffer en agua DDI a pH 5,6.
 - pH 7,00: Se preparó a partir de un tritrisol 1.09887 (fosfato), marca Merck, para 500 ml de solución buffer en agua DDI a pH 5,6.
 - pH 9,00: Se preparó a partir de un tritrisol 1.09889 (ácido bórico/potasio), marca Merck, para 500 ml de solución buffer en agua DDI a pH 5,6
- Cloruro de calcio (CaCl_2), 0,01M. Se disolvió 1,47 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (P.M: 147,02 g/mol), pro análisis, marca Merck, en agua destilada desionizada a pH 5,6 y se diluyó a 1L en un matraz de aforo.
- Solución de relleno de electrodo de pH, Ross. Reference Electrode Filling Solution. 81-00-07. KCl 3M.
- Solución de KCl 3M. Para la preparación de esta solución, se agregó 22,37 g de KCl (P.M: 74,55 g/mol), pro análisis, marca Winkler Ltda. a un matraz de aforo de 100 ml, aforando con agua destilada desionizada a pH 5,6.

4. Procedimiento:

Se pesó 5 g de muestra de substrato seco al aire en la balanza electrónica, con ayuda de la cuchara de medición. Luego, se colocó la muestra en un vaso de polipropileno de 100 ml y se agregó 25 ml de agua destilada desionizada a pH 5,6, agitando frecuentemente.

Se colocó el vaso de polipropileno dentro de un vaso precipitado de 250 ml, se dejó reposar durante 1h, agitando cada 15 minutos.

Se calibró el pH-metro usando buffer 7,00 y 4,00. Se usó buffer de pH 9,00 para chequear linealidad.

Para leer el pH de la muestra, se colocó el electrodo combinado de vidrio y calomelano en la solución sobrenadante (el bulbo del electrodo debió quedar sobre el sedimento de substrato). Se agitó con una bagueta por 30 segundos y después de 1 minuto se leyó el pH y se registró en el libro de registro del laboratorio. El electrodo fue lavado con abundante agua destilada para extraer cualquier tipo de partícula que pudo quedar adherida a él y se secó suavemente con papel absorbente.

Independientemente, se pesó 5 g de muestra de substrato seco al aire en un vaso de polipropileno de 100 ml y se agregó 25 ml de solución de CaCl_2 0,01M y se agitó. Luego, se colocó el vaso de polipropileno dentro de un vaso precipitado de 250 ml, se dejó reposar durante 1h, agitando cada 15 minutos.

Después de 1min se leyó el pH y se registró en el libro de registro, se sacó la muestra. Nuevamente se lavó el electrodo con agua y se secó suavemente.

Se colocó la próxima muestra. Una vez que se leyó todas las muestras, se dejó el electrodo (previamente lavado y secado) inmerso en solución de KCl 3M.

5. Control de calidad:

Para la determinación del pH del suelo o su equivalente en ambas soluciones (agua y cloruro de calcio), por cada set de 13 muestras se determinó el pH de una muestra en duplicado (DUP). Este procedimiento permitió evaluar la precisión interna del set de análisis. El límite de aceptación en términos de diferencia absoluta es de 0,1 unidades de pH (Schumacher et al, 1995).

Una muestra interna del laboratorio (denominada QCPS) se analizó por cada set, la cual se empleó para la determinación de exactitud y precisión entre sets de análisis. La exactitud del QCPS debió estar dentro de $\pm 0,1$ unidades de pH del promedio calculado a lo largo de los análisis. La precisión entre sets se determinó a través del cálculo de la desviación estándar acumulada a lo largo de los análisis. Los valores debieron estar dentro del rango: promedio $\pm 3 \times$ desviación estándar (Schumacher et al, 1995).

Una muestra de chequeo de calibración, denominada QCCS, (buffer de pH 4,00 de origen distinto al usado en la etapa de calibración del pH-metro), se analizó al inicio, cada 5 muestras y al término del set de análisis. El valor de pH del QCCS debió estar dentro del rango: $4 \pm 0,05$ unidades de pH (Schumacher et al, 1995).

El formato de un set de análisis fue: QCCS, muestras 1 a 5, QCCS, muestras 6 a 10, QCCS, muestras 11 a 13, DUP, QCPS, QCCS.

6. Calibración del medidor de pH

- ◆ Se conectó el electrodo de pH al medidor.
- ◆ Se presionó la tecla "CAL" para iniciar la secuencia de calibración. En la pantalla apareció CAL por 2 segundos. Luego apareció el último rango de calibración. Se seleccionó la opción de calibración "7-4" utilizando las teclas. Se presionó la tecla "yes" para aceptar el ingreso.
- ◆ En la pantalla aparece pH 7 por 2 segundos. Se colocó el electrodo en el buffer de pH 7. La lectura apareció en la pantalla y fue actualizada a medida que la calibración continuó. Cuando se encendió la luz READY, indicando la estabilidad del electrodo, se presionó la tecla "yes" para aceptar el valor.
- ◆ En la pantalla apareció pH 4. Se insertó el electrodo en el buffer de pH 4,01. La lectura apareció en la pantalla y fue actualizada a medida que la calibración continuó. Cuando se encendió la luz READY, indicando la estabilidad del electrodo, se presionó la tecla "yes" para aceptar el valor.
- ◆ En la pantalla apareció en forma consecutiva el SLP seguido de la pendiente calculada. El medidor cambió automáticamente al modo MEASURE. El indicador del rango de calibración realizado ("7" y "4") permaneció encendido hasta que se realizó otra calibración.
- ◆ Se retiró el electrodo del segundo buffer y se enjuagó con agua desionizada. Se colocó el electrodo en la muestra. La luz READY se encendió para indicar la estabilidad del electrodo y se registro directamente el pH del campo principal de la pantalla y la temperatura del campo superior de la pantalla del medidor.

7. Referencias

- Schumacher, B., A. Neary, C. Palmer, D. Maynard, L. Pastorek, Y. Morrison, and M. Marsh, "Laboratory Methods for Soil and Foliar Analysis in long-term Environmental Monitoring Programs", documento EPA 600/R-95/077, 1995.

APENDICE 5 d)

DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CARBONO ORGANICO EN SUELOS O EQUIVALENTES, MEDIANTE EL METODO DE COMBUSTION HUMEDA DE WALKLEY-BLACK

Titulación automática

1. Instrumentos y aparatos:

- Balanza electrónica, Precisa, Modelo 125A, sensibilidad 0,0001g.
- Dispensador para $K_2Cr_2O_7$, Eppendorf, Varispenser Plus, 5-25 ml, capaz de ajustar volumen a $20,0 \pm 0,5$ ml, 0,5% imprecisión.
- Dispensador para H_2SO_4 conc., Eppendorf, Varispenser Plus, 5-25 ml, capaz de ajustar volumen a $40,0 \pm 0,5$ ml, 0,5% imprecisión.
- Agitador Recíproco (Shaker), Heidolph, Promax 2020
- Titulador automático, Orion, Modelo 950, & Impresora Orion modelo 950 (para impresión de resultados).
- Electrodo de platino, Hanna, 5779601-DL.

2. Materiales:

- Vasos de titulación de vidrio borosilicato, Pyrex, 250 ml.
- Probetas de vidrio de 250 ml. Brand, Silver Brand, Germany (a $20^\circ C \pm 1,5$ ml).
- Matraz volumétrico de 1L, Pyrex.

3. Reactivos:

- Agua destilada desionizada a pH 5,6.
- Dicromato de potasio 1N, estándar primario. Se disolvió 49,035g de $K_2Cr_2O_7$ (P.M: 294,19 g/mol) pro análisis, marca Merck, seco en estufa a 105° C, en un matraz volumétrico de 1L con agua destilada desionizada a pH 5,6.
- Acido sulfúrico concentrado, 95-97% (P.M: 98,08 g/mol, densidad: 1,84 kg/L) pro análisis, Merck.
- Sulfato ferroso 1N, en medio ácido. En un matraz volumétrico de 1 Litro se disolvió 278,0 gramos de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (P.M: 278,02 g/mol) pro análisis, marca Merck, en agua destilada desionizada a pH 5,6. Se adicionó 15 ml de ácido sulfúrico concentrado y se llevó a 1 Litro con agua destilada desionizada.
- Solución de relleno de electrodo de platino. Reference Electrode Filling Solution Series. Optium Result ORION N° 900063.
- Solución de calibración de electrodo de platino. Redox Solution. Hanna Instrument. HI 7020. 200-275 mV a 25°C.

4. Procedimiento:

4.1.- Digestión del carbono orgánico

Se pesó 0,15 g de substrato seco al aire (ya que se utilizó un substrato altamente orgánico) en un vaso de titulación, utilizando la balanza electrónica. Si la muestra contiene < 3% de carbono orgánico, se debe usar mayor cantidad de muestra. La siguiente tabla sirve como guía para el peso de muestra a utilizar. Dado que en el presente caso la cantidad de muestra fue < 0,5g se usó el substrato sólido con tamaño de partícula <250 μm . Si la cantidad de muestra es > 0,5g se usa suelo tamizado a malla 10 (< 2mm).

Con dispensador se agregó 20,00 ml de solución de $K_2Cr_2O_7$ al vaso de titulación y se mezcló agitando el recipiente. Luego, con dispensador se agregó 40 ml de H_2SO_4 concentrado y se mezcló agitando el recipiente. Se ajustó la cantidad adicionada de $K_2Cr_2O_7$ a la cantidad de H_2SO_4 para mantener una relación de volumen igual a 1:2.

Posteriormente, se colocó el vaso con la mezcla substrato- $K_2Cr_2O_7$ - H_2SO_4 en un agitador reciproco, agitando durante 1 minuto.

Si la mezcla substrato-dicromato-ácido adquiere un color de tonalidad azul-verde es señal de que todo el dicromato fue reducido. En este caso, se agrega más dicromato y ácido, manteniendo la razón $K_2Cr_2O_7/H_2SO_4$ igual a 1:2 (v/v). Se recomienda referirse a la tabla siguiente para las razones en volumen de dicromato/ácido adecuadas.

Luego, se colocó el vaso con la mezcla en una superficie resistente al calor por 30 min. y se agregó 180 ml de agua destilada desionizada al vaso para interrumpir la reacción.

Guía para peso de muestra y proporción volumétrica dicromato/ácido en Digestión de Carbono orgánico:

CO (%)	Muestra (g)	K ₂ Cr ₂ O ₇ (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)
0 - 3	1,000	10,00	20
3 - 6	0,500	10,00	20
3 - 6	1,000	20,00	40
6 - 12	0,500	20,00	40
12 - 24	0,250	20,00	40
24 - 50	0,100	30,00	60

4.2.- Titulación del exceso de dicromato

El equipo de titulación automática se programó para adicionar un volumen del titulante (FeSO₄) conforme a la variación del potencial de la solución titulada (excedente de K₂Cr₂O₇). El punto final de cada titulación se determinó por la técnica de la 1ª derivada. Los programas de titulación se encuentran almacenados en la memoria del equipo de titulación automática, donde existen 2 programas de titulación, uno para la titulación de los blancos y otro para la titulación del excedente de dicromato al término de la oxidación.

Se utilizó el programa número 5 para titular los blancos (ver titulación de blancos). Se preparó 8 blancos, correspondientes a 20,00 ml de K₂Cr₂O₇ 1N más 40 ml de H₂SO₄ concentrado, sin sustrato. Se tituló 7 blancos de reactivo, al comienzo de cada set y un blanco al término de este, para determinar la normalidad exacta del sulfato ferroso. El gasto del sulfato ferroso en la titulación de cada blanco se usó para calcular su normalidad (promedio).

Posteriormente, se llenó el frasco dispensador del equipo de titulación con sulfato ferroso 1 N antes de empezar la titulación.

Se preparó el conjunto de muestras a ser titulado en el orden especificado por el requerimiento de control de calidad. Luego, se seleccionó el método de titulación número 6, previamente editado y almacenado en la memoria del equipo (ver titulación de muestras) y se presionó la tecla "yes" del titulador. Por último, se anotó los datos requeridos en el libro de registro. SE RECOMIENDA ANOTAR LOS RESULTADOS AL TERMINO DE CADA TITULACION EN EL LIBRO DE REGISTRO.

Al término de la titulación se anexó los resultados impresos al libro de registro.

5. Cálculos:

5.1.- Determinación de la Normalidad del $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

$$\underline{N}_{\text{FeSO}_4} = \sum (V_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} / V_{\text{FeSO}_4}) / n$$

- $\underline{N}_{\text{FeSO}_4}$ = Normalidad de FeSO_4 (promedio)
 $V_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}$ = Volumen de dicromato titulado como blanco (ml)
 n = Número de blancos
 V_{FeSO_4} = Gasto de FeSO_4 (ml).

5.2.- Determinación del volumen de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ reducido

$$VR_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} = V_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} - (V_{\text{FeSO}_4} \times \underline{N}_{\text{FeSO}_4})$$

- $VR_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}$ = Volumen de dicromato reducido (ml)
 $V_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}$ = Volumen de dicromato usado en la oxidación (ml)
 V_{FeSO_4} = Gasto de FeSO_4 (ml)
 $\underline{N}_{\text{FeSO}_4}$ = Normalidad del sulfato ferroso (determinado a través de la titulación de los blancos).

5.3.- Cálculo del % de Carbón Orgánico Total

$$\% \text{COT} = \frac{VR_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7} \times 0,395}{M_m}$$

- $\% \text{COT}$ = % de Carbón Orgánico Total
 $VR_{\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}$ = Volumen de dicromato de potasio reducido (ml)
 M_m = Masa de muestra utilizada (g)

El factor 0,395 considera que el ataque con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, bajo las condiciones de este procedimiento, oxida hasta un 76% del contenido total de carbón orgánico.

5.4.- Cálculo del % de Materia Orgánica Total

$$\% \text{MOT} = \% \text{COT} \times 1,724$$

- $\% \text{MOT}$ = % de Materia Orgánica Total a partir del % COT
1,724 = Factor de Van Bemmelen.

6. Control de Calidad:

La precisión de este método se evaluó a través de la determinación del contenido de carbón orgánico total (%COT) de una muestra en duplicado. La diferencia porcentual relativa (RPD) del % COT debió ser $\leq 10\%$. Se analizó un duplicado por cada set de 18 muestras.

$$RPD = \frac{(\%COT_1 - \%COT_2) \times 2}{(\%COT_1 + \%COT_2)}$$

La exactitud de este procedimiento fue evaluada por el análisis de una muestra control (QCPS - en inglés Quality Control Preparation Sample). El valor del %COT determinado para la muestra control en cada set debió estar dentro del rango $\pm 10\%$ del valor de su promedio acumulado.

Se analizó un total de 8 blancos. El gasto del sulfato ferroso en la titulación de cada blanco se usó para calcular su normalidad promedio.

Set de análisis: 7 blancos, muestras 1 a 10, QCPS, Dup. muestra 5, blanco.

El electrodo de platino debió chequearse antes de empezar el análisis, para verificar que cumple con las especificaciones requeridas.

7. Equipo de Titulación automática ORION ATI, modelo 950 Ross FastQC

7.1.- Pasos de programación para titulación de muestras.

- ◆ Se presiona la tecla "Write Method"
- ◆ En la pantalla aparece el mensaje "Edit Method?". Se presiona "yes" para editar (modificar) un método que ya se encuentre almacenado o se puede presionar "no" si desea escribir un nuevo método.
- ◆ En la pantalla está el mensaje "x edit method?". Entre el número del método almacenado que desea ejecutar y se presiona "yes".
- ◆ En la pantalla está el mensaje "preset endpoint?". Se presiona la tecla "no".
- ◆ En la pantalla aparece "first derivative?". Se presiona la tecla "yes".
- ◆ En la pantalla aparece "Unit X?". Se presiona la tecla "yes" si ese es el número del método que Ud. eligió. Si no, se puede presionar la tecla "no" hasta que el número correcto aparezca en pantalla. Se presiona el número correspondiente y se presiona la tecla "yes".
- ◆ En la pantalla aparece "x.xxx reaction ratio". Se ingresa el valor de la razón de reacción y se presiona la tecla "yes".
- ◆ En la pantalla aparece "xxx.xx". Se ingresa el valor del peso molecular de la especie que se está analizando, y se presiona la tecla "yes".
- ◆ En la pantalla aparece "blank required?". Se presiona la tecla "yes" si el valor de un blanco va a ser utilizado. Si no, se puede presionar la tecla "no".

- ◆ En la pantalla aparece "x.xxx blank value MMOL". Se ingresa el valor del blanco en mmol y se presiona la tecla "yes".
- ◆ En la pantalla aparece "x sec timed readings". Se ingresa valores de 0 a 225 segundos y se presiona la tecla "yes".
- ◆ En la pantalla aparece "1 electrode No.". Se ingresa el número del electrodo correspondiente (1 o 2) y se presiona la tecla "yes".
- ◆ En la pantalla aparece "xx.xx ml sample vol.?". Se ingresa el volumen de la muestra que está siendo titulada y se presiona la tecla "yes". La unidad de volumen es ml.
- ◆ En la pantalla aparece "x.xxxx M titrant conc.". Se ingresa el valor de concentración de la solución de trabajo (titulante) en molaridad y se presiona la tecla "yes".
- ◆ En la pantalla aparece "1 dispenser No.?". Se presiona 1 o 2, conforme el dispensador que esté utilizando, y se presiona la tecla "yes".
- ◆ En la pantalla aparece "increments by", se espera un minuto.
- ◆ En la pantalla aparece "1 const 1-ml 2-mV". Se presiona la tecla 1 para adicionar el titulante en incrementos constantes de volumen o la tecla 2 para adicionar el titulante en incrementos constantes de milivoltaje.
- ◆ En la pantalla aparece "xxx.xx mV (o xx.xx mL) constant Incr". Se ingresa el valor del incremento constante y se presiona la tecla "yes".
- ◆ En la pantalla aparece "xx.xx mL predose volume". Se ingresa el valor del volumen de predosis requerido o la tecla 0 (cero) para el caso en que no se agregue predosis, y presionar la tecla "yes".
- ◆ En la pantalla aparece "xx.xx mL". En el caso en que sea necesario agregar un reactivo auxiliar a la muestra antes de la titulación, ingresar el volumen de este en mililitros, o caso contrario presionar la tecla 0. Nota: si solo un dispensador está conectado al equipo, este valor debe ser 0 (cero) o el mensaje "dispenser error (E-80)" aparecerá en pantalla durante el análisis.
- ◆ En la pantalla aparece "xx.xx mL max totl titrant". Se ingresa el valor máximo de titulante a ser adicionado a la muestra (en el caso en que no se encuentre un punto final).
- ◆ En la pantalla aparece "1 number of endpts". Se ingresa 1 o 2 puntos finales, y se presiona la tecla "yes".
- ◆ En la pantalla aparece "save method?". Se presiona la tecla "yes".
- ◆ En la pantalla aparece "X save as method". Se presiona el número del método y se presiona la tecla "yes".

7.2.- Programa de titulación

7.2.1.- Titulación de blancos

Método # 5

- Primera derivada
- Electrodo 1
- Razón de reacción: 1,0
- Lectura a cada 60 seg.
- Volumen de muestra 10 ml
- Concentración de titulante 1,0 M
- Dispensador No.1
- Incremento 10 mV
- Predosis 6,000 mL
- Máximo titulante 15,0 mL
- Puntos finales esperados: 1

7.2.2.- Titulación de muestras

Método #6

- Primera derivada
- Electrodo 1
- Razón de reacción: 1,0
- Lectura a cada 60 seg.
- Volumen de muestra 10 ml
- Concentración de titulante 1,0 M
- Dispensador No.1
- Incremento 10 mV
- Predosis 6,000 ml
- Máximo titulante 15,0 ml
- Puntos finales esperados: 1

8. Referencias:

- Schumacher, B., A. Neary, C. Palmer, D. Maynard, L. Pastorek, Y. Morrison, and M. Marsh (1995). "Laboratory Methods for Soil and Foliar Analysis in long-term Environmental Monitoring Programs", documento EPA 600/R-95/077.
- USDA (1996). "Soil Survey Laboratory Methods Manual", Soil Survey Investigations Report N° 42, versión 3.0, National Soil Survey Center, Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture.

APENDICE 5 e)

DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE INTERCAMBIO CATIONICO DEL SUELO O EQUIVALENTES

1. Instrumentos y aparatos:

- Agitador recíproco (Shaker), Heidolph, Promax 2020.
- Balanza electrónica, Precisa, Modelo 125A, sensibilidad 0,0001g.
- Destilador de nitrógeno, marca Velp UDK 125^a.
- Titulador automático, ORION modelo 950, con impresora ORION modelo 900^a y torreta de agitación ORION.
- Electrodo combinado de vidrio y calomelano de pH, VWR. Sentik 97T, con sensor de temperatura incorporado.

2. Materiales:

- Matraces volumétricos Erlenmeyer, capacidad 250 ml, clase A, KIMAX.
- Embudos Büchner, polipropileno, 12,5 cm de diámetro, Nalgene.
- Matraces kitasato, capacidad 1L, Pyrex.
- Tubos de destilación, Velp.
- Vasos precipitados de 250 ml, Kimax.
- Papel filtro Whatman N°42 en círculos de 110 mm N° 1442-110 y 90 mm de diámetro N° 1442-090.
- Pipetas totales de $5 \pm 0,01$ ml. KIMAX, Kimble USA.
- Pipetas totales de $10 \pm 0,02$ ml. KIMAX, Kimble USA.
- Micropipeta 5-50 μ L, Transferpette, Merck.
- 2 probetas de vidrio de 50 mL, Pyrex N° 3075.
- 2 probetas de vidrio de 250 ml. Brand, Silver Brand, Germany (a $20^{\circ}\text{C} \pm 1,5$ mL).
- Pipeta Pasteur.
- Matraz de aforo de 2L, KIMAX.
- Matraces de aforo de 1L, KIMAX.

3. Reactivos:

- Acetato de amonio (NH_4OAc), 1N, pH 7,0: se mezcló 136 ml de amoniaco en solución (P.M: 18,04 g/mol) al 25%, pro análisis, Merck y 114 ml de ácido acético (CH_3COOH) al 99,5% (P.M: 60,05 g/mol, densidad: 1,05 kg/L), pro análisis, marca Merck por cada 2 litros de solución deseada. Se enfrió y se completó el volumen con agua destilada desionizada a pH 5,6, y se ajustó a pH 7,0 con ácido acético o amoniaco. Opcionalmente se puede preparar a partir de la sal NH_4OAc .

- Agua destilada desionizada a pH 5,6.
- Etanol absoluto al 95% (P.M: 46,07 g/mol, densidad: 0,79 kg/L), pro análisis, marca Merck.
- HCl 2N. Esta solución se preparó a partir de un tritrisol 1.00899, marca Merck; el cual se adicionó a un matraz de aforo de 1L, completando volumen con agua destilada desionizada a pH 5,6.
- Cloruro de sodio, acidificado al 10%: se disolvió 100g de NaCl (P.M: 58,44 g/mol) pro análisis, marca Winkler Ltda., libre de amonio, en 750 ml de agua caliente; se adicionó 25 ml de ácido clorhídrico 2N y se aforó a 1L.
- Hidróxido de sodio (NaOH) 1N. Se pesó 40 g de NaOH en lentejas (P.M: 40,00 g/mol) pro análisis, marca Winkler Ltda., en un baso de precipitado de 1L y se adicionó agua destilada desionizada hasta completar volumen.
- Acido bórico (H_3BO_3) al 2%. Para la preparación de esta solución, se disolvió 40 g de H_3BO_3 (P.M: 61,83 g/mol) pro análisis, marca Analytic, en 2L de agua destilada desionizada a pH 5,6, en un matraz de aforo de 2L.
- Acido sulfúrico (H_2SO_4) 0,01N. Esta solución se preparó a partir de un tritrisol 1.00879 de H_2SO_4 1N, marca Merck. De la solución de H_2SO_4 1N se tomó 0,01 ml con una micropipeta y se llevó a 1L con agua destilada desionizada a pH 5,6.
- Indicador: se disolvió 0,1g de metil rojo y 0,1g de verde de bromo cresol en 250 ml de etanol.

4. Procedimiento:

Se pesó 20 g de substrato sólido seco al aire con tamaño de partícula <2 mm en un matraz erlemeyer de 250 ml y se agregó 50 ml de solución de NH_4OAc . Se tapó el matraz y se agitó por 20 minutos a 125 rpm en el agitador recíproco. Se dejó reposar durante la noche y se transfirió el contenido del matraz a un embudo Büchner con papeles filtro Whatman N°42. Se colocó 2 papeles filtro, para evitar pérdida de muestra.

Posteriormente, se filtró la mezcla usando succión suave y se procedió a lavar la torta con 200 ml de NH_4OAc , agregando pequeñas cantidades, de modo que el lavado no requirió menos de 1 hora. Luego, a la torta se agregó 100 ml etanol, en pequeñas cantidades. El filtrado obtenido fue descartado.

4.1.- Desplazamiento del amonio absorbido

Se lavó el substrato presente en el embudo Büchner (torta) con 240 ml de NaCl al 10% acidificado con HCl, usando pequeñas cantidades, drenando completamente después de cada adición. Luego, se transfirió el filtrado a un matraz volumétrico de 250 ml y se ajustó el volumen con agua destilada desionizada a pH 5,6.

4.2.- Determinación del amonio desplazado

Se pipeteó una alícuota de 5 ml del líquido aforado y se introdujo a un tubo de destilación micro-Kjeldahl. Se colocó el tubo de destilación en el aparato de destilación, agregando lentamente 20 ml de NaOH 1N a través del sistema de válvulas del equipo de destilación. Se procedió a destilar la solución. Se recibió el destilado en un matraz erlenmeyer de 250 ml que contenía 10 ml de H₃BO₃ al 2% y 10 gotas de mezcla indicadora.

Se destiló por aproximadamente 5 min., hasta que el H₃BO₃ se tornó verde (aproximadamente 150 ml), se retiró el matraz y se lavó el tubo condensador.

Por último, se tituló el amonio presente en el líquido destilado con H₂SO₄ 0,01N, contenido en el dispensador del equipo de titulación, a un punto final rojo (pH 4,6), utilizando un blanco para comparar.

5. Cálculos:

$$\text{CIC (meq/100g)} = (A/B) * N * (C/D) * 100$$

A: Volumen de H₂SO₄ gastado en titular.

B: Peso muestra (g).

N: Normalidad del ácido sulfúrico.

C: Volumen de lavado o volumen final (ml).

D: Volumen alícuota usada en titulación (ml).

6. Control de calidad:

La precisión de este método se evaluó a través de la determinación de la CIC de una muestra en duplicado. La diferencia porcentual relativa (RPD) de la CIC debió ser igual al 10%. Se analizó un blanco cada 10 muestras.

La exactitud de este procedimiento se evaluó con una muestra control. El valor de la CIC determinada en la muestra control debió estar dentro del rango $\pm 10\%$ del valor de su promedio acumulado.

La muestra control también pudo ser empleada para evaluar la precisión entre sets de análisis. El valor obtenido para la CIC, debió estar dentro del rango del promedio ± 3 veces su desviación estándar.

Set de análisis: Blanco, muestras 1 a 10, Dup. muestra 5, blanco, muestras 11 a 20, QCPS, blanco.

En la etapa de destilación y titulación, se incluyó un estándar de concentración conocida para conocer el porcentaje de recuperación.

Además, se consideró dentro de todas las etapas del procedimiento el debido chequeo de los equipos involucrados: Chequeo de calibración de balanza, calibración del dispensador del titulador automático, calibración del electrodo de pH y determinación de la normalidad del ácido utilizado en la titulación.

7. Referencias

- USDA (1996) "Soil Survey Laboratory Methods manual", Soil Survey Investigations Report N°42, version 3.0, National Soil Survey Center, Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture, January 1996.

APENDICE 5 f)

DETERMINACION DEL CONTENIDO DE COBRE TOTAL EN MUESTRAS DE SUELO O SU EQUIVALENTE

Procedimiento de Digestión Acida Total del suelo o equivalente en Horno Microondas.

1. Instrumentos y aparatos:

- Equipo digestor de microondas Millestone MLS 1200, con sistema de evaporación de ácidos FAM 40.
- Rotor de digestión MDR 100/6/100/110
- Rotor de evaporación de ácidos, FAM 40.
- Sistema de enfriamiento MDR.
- Espectroscopio de Absorción Atómica con llama y horno grafito con autosempler. Perkin Elmer, Aanalisisist 300.
- Balanza electrónica, Precisa, Modelo 125A, sensibilidad 0,0001g.

2. Materiales:

- Matraces volumétricos de 25 ml, Kimax clase A.
- Tubos de ensayo de 30 ml de capacidad. Pyrex.
- Envases de polipropileno de 125 ml, para mantener las muestras. Plasti-Brand.
- Vasos de digestión de teflón de 100 ml, TFM.
- Dispensador de HNO₃ conc., Eppendorf, Varispenser Plus, 5-25 ml, capaz de ajustar volumen a $20,0 \pm 0,5$ ml, 0,5% imprecisión.
- Dispensador para H₂O₂ al 30%, Eppendorf, Varispenser Plus, 1-5 ml, capaz de ajustar volumen a $5,0 \pm 0,02$ ml, 0,5% imprecisión.
- Pipeta total de $5 \pm 0,01$ ml. KIMAX, Kimble USA.
- Propipeta.

3. Reactivos:

- Acido nítrico Suprapur al 65% (P.M: 65,01 g/mol, densidad: 1,40 kg/L). Merck.
- Acido fluorhídrico 40%, p.a (densidad: 1,13 kg/L). Reidel- de Haën.
- Peróxido de Hidrogeno 30% p/p, p.a. Perhidrol (P.M: 34,01 g/mol, densidad: 1,11 kg/L). Merck.
- Agua destilada desionizada a pH 5,6.
- Muestra de referencia (High Purity Standards, Soil Loam B).
- Muestra de control de calidad (QCPS), fabricada en el laboratorio.

4. Procedimiento:

Se pesó 0,25 g de muestra de substrato sólido con tamaño de partícula <250 μm , directo en el vaso de teflón del microondas, utilizando la balanza electrónica. Se hizo lo mismo con el material de referencia y muestra control de laboratorio. Posteriormente, se colocó el vaso dentro de la carcasa numerada.

Bajo campana, se agregó a la muestra 9 ml de HNO_3 concentrado con dispensador, con pipeta total provista con propipeta se agregó 5 ml de HF y con dispensador 2 ml de H_2O_2 . Se contó con un blanco cada 5 muestras, el cual se compuso solo de los reactivos en los volúmenes mencionados anteriormente. Luego, se colocó la tapa al vaso de teflón conteniendo la muestra con la mezcla de reactivos y se puso el vaso cerrado en el rotor de microondas. Se selló el sistema de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se digirió las muestras de acuerdo al siguiente programa de digestión:
Con Sistema ATC 300:

	Tiempo (min.)	Potencia (Watt)	Temperatura (°C)
Etapa 1	10	850	180
Etapa 2	40	850	180

Sin sistema ATC:

	Tiempo (min.)	Potencia (Watt)
Etapa 1	6	250
Etapa 2	6	400
Etapa 3	6	650
Etapa 4	6	250

Una vez terminada la digestión, se mantuvo un período de ventilación de 10 min. y luego se sacó el rotor del equipo de microondas para colocarlo en el sistema de enfriamiento durante 10 min. Se destapó los vasos bajo campana, y se colocaron en el rotor de evaporación del sistema microondas.

Para evaporar las muestras se siguió el siguiente programa:

	Tiempo (min.)	Potencia (Watt)
Etapa 1	10	800

Las muestras al evaporarse debieron llegar al estado de sirupo. Luego, se agregó 5 ml de HNO₃ conc. y se volvieron a evaporar con el siguiente programa:

	Tiempo (min.)	Potencia (Watt)
Etapa 1	5	800

Posteriormente, se trasvasó las muestras evaporadas a un matraz de aforo de 25 ml, lavando el vaso de teflón con agua destilada desionizada a pH 5,6, agregando el lavado al matraz. Se agregó agua destilada desionizada al matraz hasta completar volumen.

Se agitó el matraz con el extracto y se trasvasó parte de esta a un tubo de ensayo para enviarla a análisis y la otra parte de la muestra a un envase de plástico, la cual se guardó en refrigerador como contramuestra.

A las muestras se les determinó cobre total por Espectroscopia de Absorción Atómica-llama (longitud de onda: 324,8 nm).

5. Control de calidad:

El set de análisis contempló el análisis de una muestra de referencia (Loam B, SRM de NIST), como control de la exactitud dentro del set y de precisión entre sets.

Para evaluar la precisión dentro del set, se analizó una muestra en duplicado.

Para chequear interferencias debida a los reactivos, se debió incorporar blancos de reactivos.

Para evaluar la precisión entre sets se analizó una muestra control preparada en el laboratorio (QCPS).

Además, para chequear interferencias debido a la matriz se debió hacer adición de estándar a muestras y blancos. Este es un procedimiento válido de confirmación de resultados.

El set de análisis fue el siguiente:

Blanco, muestras 1 a 4, Dup. muestra 1, blanco, muestras 5 a 8, QCPS, blanco, muestras 9 a 12, SRM.

6. Cálculos:

Contenido de cobre total (mg/kg) = (mg/L de cobre total* dilución* VM)/PM

VM = volumen de muestra

PM = peso de muestra

7. Referencias:

- USEPA (1995), "Test methods for evaluating solid waste: physical/chemical methods", Office of Solid Waste, EPA 530/ SW-846, September 1995, (3rd edition).

APENDICE 5 g)

OBTENCION DE EXTRACTO DE SATURACION DE SUELOS O EQUIVALENTES.

1. Instrumentos y aparatos:

- Balanza analítica, Precisa 125A \pm 0,0001 g sensibilidad.
- Balanza precisión Acculab 6000.
- Estufa, controlada termostáticamente, 110 ± 5 °C. Marca Memmert .
- Sistema central de extracción de vacío del CIMM.
- Sistema de microfiltración de 47 mm de diámetro.
- pH-metro WTW Multiline P4, Universal-Meter.
- Electrodo combinado de pH de vidrio y calomelano, WTW Sentik 97T, con sensor de temperatura incorporado.

2. Materiales:

- Cápsulas de aluminio, para secado de muestras.
- Espátulas de acero inoxidable con mango madera.
- Termómetro, 0° a 200 °C, Dplex Satailess.
- Envases de plástico de 1000 ml de capacidad con tapa. Zephyr M.R.
- Embudo Büchner de 12,5 cm de diámetro. Nalgene.
- Matraces kitasato de 500 ml. Marca Schott.
- Papel filtro Whatman N°42 de 110 y 90 mm de diámetro.
- Filtros de membrana Millipore, 0,45 μ m y 47 mm de diámetro.
- Desecador de polipropileno Bel-art, de 27 cm de diámetro, con conexión a vacío.

3. Reactivos:

- Agua destilada desionizada (DDI) a pH 5,6.
- Buffers de pH para calibración del electrodo.
 - pH 4,00: Se preparó a partir de un tritrisol 1.09884 (ácido hidrociorhídrico-citrato), marca Merck, para 500 ml de solución buffer en agua DDI a pH 5,6.
 - pH 7,00: Se preparó a partir de un tritrisol 1.09887 (fosfato), marca Merck, para 500 ml de solución buffer en agua DDI a pH 5,6.
 - pH 9,00: Se preparó a partir de un tritrisol 1.09889 (ácido bórico/potasio), marca Merck, para 500 ml de solución buffer en agua DDI a pH 5,6.
- Solución de relleno del electrodo de pH, Ross. Reference Electrode Filling Solution. 81-00-07. KCl 3M.
- Solución de KCl 3M. Para la preparación de esta solución, se agregó 22,37 g de KCl (P.M: 74,55 g/mol), pro análisis, marca Winkler Ltda. a un matraz de aforo de 100 ml, aforando con agua destilada desionizada a pH 5,6.

4. Procedimiento:

4.1.- Preparación de la pasta de sustrato sólido saturada

Se colocó 200 g de sustrato seco al aire de tamaño de partícula < 2 mm en un envase de plástico de 1000 ml. Este tamaño de muestra fue conveniente para manipularlo dentro del envase y obtener suficiente extracto. Posteriormente, se agregó suficiente agua DDI para llevar la muestra cercana a la saturación y se mezcló con la espátula con un máximo de agitación, para obtener un punto definitivo de saturación. Si la pasta estaba muy húmeda se debió agregar mas sustrato seco. Ocasionalmente se golpeó el envase en el mesón para consolidar la mezcla sustrato-agua. Al punto de saturación, la pasta reflejó la luz, fluyó suavemente cuando se inclinó el envase y escurrió libre y limpiamente de la espátula. Se tapó el envase y se dejó reposar la muestra durante la noche. Al día siguiente, se rechequeó el criterio de saturación, es decir, el agua no debió colectarse en la superficie del sustrato, la pasta no debió endurecerse y no debió perder su reflejo después de reposar.

Cuando la pasta no cumplió con el criterio de saturación, se necesitó remezclar la pasta con más sustrato o más agua, se dejó reposar por 4 h y luego se rechequeó el criterio de saturación.

4.2.- Determinación del pH de la pasta de saturación

Se calibró pH metro con buffer de pH 7,00 y pH 4,00. Se usó el buffer de pH 9,00 para verificar la linealidad. Después de calibrar, se lavó cuidadosamente el electrodo combinado vidrio-calomelano con agua destilada. Se secó el electrodo, suavemente con toalla absorbente, sin restregar para evitar la acumulación de carga estática en el electrodo.

Se insertó suavemente el electrodo de vidrio-calomelano dentro de la pasta saturada hasta que la solución de KCl del electrodo se encontró por debajo de la superficie de la pasta saturada. Se esperó la estabilización de la lectura de pH y se anotó el pH en el libro de registro del laboratorio. Luego, se retiró el electrodo de la pasta y se lavó con abundante agua destilada con el fin de remover todas las partículas adheridas al electrodo y se dejó sumergido en una solución de KCl 3M. Se repitió el mismo procedimiento con las muestras siguientes.

4.3.- Determinación del porcentaje de saturación

Se taró una cápsula de humedad con tapa. Se identificó cada cápsula con el número de la muestra. Luego, se colocó 20 a 40 g de pasta saturada en la cápsula, se tapó la cápsula, se pesó la cápsula más muestra y se registró el peso lo más cercano a 0,01 g. Posteriormente, se removió la tapa, se colocó la cápsula en una estufa a 105°C, y se dejó durante la noche (24 h).

Se recomienda un período de secado de 24 h o más. No es correcto colocar muestras húmedas en la estufa con otras que se están secando, a menos que estas muestras hayan estado en la estufa a lo menos 12 a 16 h. No es recomendable sobrecargar la estufa de secado con muestras.

Se sacó las cápsulas de la estufa y se tapó inmediatamente. Se dejó las cápsulas enfriar en la desecadora por 1 h. Luego, se pesó la muestra de pasta seca en estufa y se registró el peso. Antes de calcular el PS, se restó los pesos de tara de los pesos de pasta saturada y del peso de la muestra seca en estufa.

4.4.- Extracto de Saturación

Para este procedimiento, se preparó el embudo Büchner que recibe la pasta saturada colocando un papel filtro de 90 mm de diámetro en el centro del embudo seguido por un papel filtro de 110 mm de diámetro. Se humedeció ligeramente los papeles filtro para asegurar que permanecieran en el centro del embudo. Posteriormente, se colocó el embudo en un matraz kitasato, conectado al sistema de vacío y se colocó la pasta saturada en el embudo de extracción cuidadosamente. Se golpeó suavemente el embudo para remover el aire atrapado en la pasta.

Cuando todos los embudos estaban listos para extraer, se conectó el sistema de vacío y se procedió a extraer suficiente extracto.

Por último, se filtró el extracto de saturación para prevenir el desarrollo de microorganismos, lo cual se realizó a través de un sistema de microfiltración.

5. Cálculos:

$$PS = \frac{(Wt_{SP} - Wt_{OD})}{(Wt_{OD})} \times 100$$

donde:

PS= porcentaje de saturación en gramos de agua/100 gramos de sustrato seco.

Wt_{SP} = peso de pasta saturada

Wt_{OD} = peso sustrato seco en estufa

6. Referencias:

- Rhoades, J.D (1982). Soluble Salts. In A.L. Page, R.H. Miller, and D.R. Keeney (eds.) Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. 2nd ed. Agronomy 9:167-179.
- Richards (eds.). Salinity Laboratory Staff (1954). Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. U.S. Dept of Agric. Handb. 60, U.S. Govt. Print Office, Washington DC.
- Holmgren, George G.S., R.L. Juve, and R.C. Geschwender (1977). A mechanically controlled variable rate leaching device. Soil Sci. Amer. J. 41:1207-1208.

APENDICE 5 h)

PROPIEDADES DEL EXTRACTO DE SATURACION: pH, CONDUCTIVIDAD ELECTRICA Y Cu SOLUBLE

1. Instrumentos y aparatos:

- Conductivimetro y celda de conductividad, Hanna Instrument. Multi-range. Modelo: HI9033.
- pH-metro WTW Multiline P4, Universal-Meter.
- Electrodo combinado de pH de vidrio y calomelano, WTW Sentik 97T, con sensor de temperatura incorporado.
- Espectroscopio de Absorción Atómica-llama (FLAAS). Perkin Elmer, Aanalist 300.

2. Materiales:

- Matraz de aforo de 1L, KIMAX.
- Matraz de aforo de 100 ml, KIMAX.

3. Reactivos:

- Agua destilada desionizada a pH 5,6.
- Cloruro de potasio (KCl), 0,010 N. Se disolvió 0,745 g de KCl (P.M: 74,55 g/mol) pro análisis, marca Winkler Ltda, en agua destilada desionizada y se llevó a un volumen de 1 L. Conductividad de $1,412 \text{ mmhos cm}^{-1}$ a 25° C .
- Buffers de pH para calibración del electrodo.
 - pH 4,00: Se preparó a partir de un tritrisol 1.09884 (ácido hidrociorhídrico-citrato), marca Merck, para 500 ml de solución buffer en agua DDI a pH 5,6.
 - pH 7,00: Se preparó a partir de un tritrisol 1.09887 (fosfato), marca Merck, para 500 ml de solución buffer en agua DDI a pH 5,6.
 - pH 9,00: Se preparó a partir de un tritrisol 1.09889 (ácido bórico/potasio), marca Merck, para 500 ml de solución buffer en agua DDI a pH 5,6.
- Acido nítrico al 0,2%. Se agregó 0,2 ml de HNO_3 suprapur al 65%, Merck, a un matraz de aforo de 100 ml y se completó el volumen con agua destilada desionizada a pH 5,6.
- Solución de relleno de electrodo de pH, Ross. Reference Electrode Filling Solution. 81-00-07. KCl 3M.
- Solución de KCl 3M. Para la preparación de esta solución, se agregó 22,37 g de KCl (P.M: 74,55 g/mol), pro análisis, marca Winkler Ltda. a un matraz de aforo de 100 ml, aforando con agua destilada desionizada a pH 5,6.

4. Procedimiento general:

4.1.- Lavado de materiales

Se recomienda seguir protocolo de material fungible y plásticos.

4.2.- Conductividad eléctrica (CE)

Se calibró el conductivimetro y celda usando KCl 0,010 N y se ajustó la lectura digital a 1,412.

Posteriormente, se lavó la celda con agua destilada desionizada a pH 5,6 y se verificó que la lectura fuese cero.

Se leyó la conductividad del extracto de saturación de cada muestra, insertando el conductivimetro totalmente en la solución, se esperó que la lectura se estabilizara y se registró la CE en el libro de registro del laboratorio.

Se lavó la celda de conductividad con agua destilada desionizada y se secó suavemente con papel absorbente.

4.3.- Lectura de pH

Para la lectura de pH de los extractos de saturación, se calibró el pH-metro, usando buffer pH 4 y pH 7. Luego, se lavó el electrodo combinado con agua destilada desionizada a pH 5,6 y se leyó el pH del extracto de saturación. Se registró la lectura una vez estabilizada en el libro de registro del laboratorio. Finalmente se lavó el electrodo con agua destilada desionizada a pH 5,6 y se dejó sumergido en una solución de KCl 3M.

4.4.- Determinación de cobre soluble por Absorción Atómica de Llama

Se colocó el recipiente con el extracto bajo la sonda de aspiración del equipo de Absorción Atómica-llama y se leyó el contenido de Cu soluble por FLAAS. Se registró las lecturas obtenidas en el libro de registro del laboratorio.

5. Cálculos:

Para CE y pH no se requieren cálculos.

El contenido de Cu soluble se obtiene a partir de:

$$\text{Contenido del analito (mg/kg)} = \frac{\text{Lectura del analito} * \text{PS}}{100}$$

Lectura del analito = mg de Cu/L.

PS = porcentaje de saturación

6. Control de calidad:

Se consideraron los parámetros de control de calidad provenientes del extracto de saturación, además, se consideró los QCCS propios de pH, CE y de la curva de calibración del equipo de absorción atómica.

7. Referencias:

- USDA (1996) "Soil Survey Laboratory Methods Manual", Soil Survey Investigations Report N° 42, version 3.0, National Soil Survey Center, Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture, January 1996
- Rowell, D. (1994) "Soil Science: Methods and Applications", Longman group UK Limited, 1994.
- Sparks, D.L. (1995). "Environmental soil chemistry". Academic Press.

APENDICE 5 i)

DETERMINACION DE COBRE IONICO DEL EXTRACTO DE SATURACION MEDIANTE ELECTRODO ESPECIFICO DE COBRE

1. Instrumentos y aparatos:

- Electrodo específico de cobre, ORION 9029A.
- Electrodo combinado de pH de vidrio y calomelano, VWR.
- Titulador automático, ORION Model 950, con sistema de agitación incorporado.
- Termostato, Haake Modelo C1, regulable a 20°C.
- Celda de circulación de agua con doble pared, con capacidad de 50 ml.
- Huinchas pulidoras, ORION.

2. Materiales:

- Matraces volumétricos de 50 ml. KIMAX.
- Probetas de vidrio de 50 ml. Pyrex N° 3075.
- Pipeta total de $5 \pm 0,01$ ml. KIMAX. Kimble USA.
- Pipeta total de $1 \pm 0,006$ ml. KIMAX. Kimble USA.
- Micropipeta de 100-1000 μ l. Transferpette. Merck.
- Filtro de membrana de 0,22 μ m.
- Matraz de aforo de 1L, KIMAX.

3. Reactivos:

- Solución patrón de Cobre, Cupric Standard 942906. ORION Applications Solution. Nitrato de cobre $0,01000 \pm 0,0005$ moles/L.
- Solución de relleno del electrodo específico de cobre, Referencia electrode filling solution series. Option Result ORION N° 942906.
- Agua destilada desionizada a pH 5,6.
- Etilendiamina pro análisis (Etilendiamina dihidroclorhídrico al 98%), P.M: 133,02 g/mol. Aldrich Chemical Company, Inc.
- Solución de etilendiamina (EN) 0,02M: Se mezcló 2,66 g de EN al 98% con 1 litro de agua destilada desionizada a pH 5,6 en un matraz de aforo.
- Acido nítrico 0,1 N. A partir de una solución de HNO₃ 1N, la cual se preparó a partir de un tritrisol, Merck., se tomó 0,1 ml y se llevó a 1L en un matraz de aforo.
- Hidróxido de sodio 0,1 N. Se pesó 4 g de NaOH en lentejas (P.M: 40,00 g/mol), marca Winkler Ltda., en un matraz de aforo de 1L y se adicionó agua destilada desionizada a pH 5,6 hasta completar volumen.
- Solución de ajuste de fuerza iónica, ISA, ORION.

- H_2SO_4 0,025M. Esta solución se preparó de una solución de H_2SO_4 1M, la cual se preparó a partir de un tritrisol, Merck. De la solución de ácido 1N, se tomó 2,5 ml y se adicionaron a un matraz de aforo de 100 ml, completando volumen con agua destilada desionizada a pH 5,6.

4. Procedimiento:

4.1.- Chequeo del electrodo específico de cobre

Para este procedimiento, se colocó 50 ml de agua destilada desionizada a pH 5,6 y 1 ml de ISA en la celda de medición y se hizo circular agua a 20°C en esta celda. Posteriormente, se colocó el electrodo de pH y el específico de cobre en la solución, agitando en forma moderada. Se registró la temperatura, el pH y la lectura en mV del electrodo específico de cobre en el libro de registro del laboratorio.

Luego, se agregó con micropipeta 0,5 ml del estándar de cobre de 1000 mg de Cu/L o del estándar de 0,1M de Cu y se registró la temperatura, el pH y la lectura en mV del electrodo específico de cobre en el libro de registro.

A continuación, se agregó con pipeta total 5 ml del estándar de cobre de 1000 mg de Cu/L o del estándar de 0,1M de Cu y se registró la temperatura, el pH y la lectura en mV del electrodo específico de cobre.

Se procedió a calcular la diferencia entre las lecturas en mV provenientes de los pasos anteriores, cuya diferencia debe estar entre 25 y 30.

4.2.- Calibración del electrodo específico de cobre

Se preparó las soluciones de calibración de acuerdo a la siguiente pauta:

ml de EN 0,02M	ml de estándar de Cobre 0,01M	pH	ml de ISA
0,2	50	6,08	0,2
0,4	50	6,50	0,2
0,6	50	6,59	0,2
0,8	50	6,80	0,2
0,8	50	7,01	0,2
1,6	50	7,10	0,2
1,6	50	7,60	0,2

Una vez preparadas las soluciones de calibración, se colocó cada una de ellas en la celda de medición y se registró para cada una de las soluciones la temperatura, el pH y la lectura en mV del electrodo específico de cobre en el libro de registro del laboratorio.

Posteriormente, se ingresó todos los parámetros en el computador y se obtuvo la curva: **mV versus concentración de Cu^{+2}** .

Después de realizada las lecturas, se lavó el electrodo específico de cobre, se pulió con huincha pulidora y se dejó en solución de H_2SO_4 0,025M hasta que alcanzó un potencial de -15 mV.

4.3.- Preparación de las muestras

Se filtró las muestras provenientes del extracto de saturación a través de un filtro de membrana de 0,22 μm , para eliminar las posibles partículas en suspensión. Luego, se colocó 20 ml de muestra filtrada en la celda de medición y se agregó 0,2 ml de ISA.

Se procedió a colocar el electrodo de pH y el electrodo específico de cobre en la solución y se agitó en forma moderada. Se registró la temperatura, el pH y la lectura en mV del electrodo específico de cobre en el libro de registro.

Para obtener la concentración de cobre iónico, se interpoló la lectura en mV en la ecuación de la recta del gráfico mV versus concentración de Cu^{+2} .

Después de cada una de las lecturas, se lavó el electrodo específico de cobre, se pulió con huincha pulidora y se dejó en solución de H_2SO_4 0,025M hasta que alcanzó un potencial de -15 mV.

La curva de calibración y la lectura de los mV en cada muestra de sustrato sólido, se efectuó bajo las siguientes condiciones:

- Buffer: etilendiamina 0,02 M.
- Solución de ajuste fuerza iónica: ISA 5 M, ORION.
- Fuerza iónica: 0,05 M de Nitrato de Sodio.
- Temperatura: 20°C.
- Tiempo de estabilización: 15 a 30 minutos por lectura.
- Interferentes: iones Cl^- , Fe^{+3} , Al^{+3} , Hg^+ , Ag^+ , Br^- .
- Efectos: pH, temperatura y complejación de cobre.

5. Cálculos:

$$\text{mg de } Cu^{+2}/\text{kg} = \text{conc. molar de } Cu^{+2} \times 63500 \times PS / 100$$

donde:

conc. molar de cobre = moles/litro de cobre obtenidos a partir de la curva mV v/s concentración de cobre.

63500 = peso molecular del cobre en mg/moles.

PS = porcentaje de saturación de la muestra en g de agua/g de sustrato seco.

6. Control de calidad:

Se utilizó los mismos parámetros de control provenientes del extracto de saturación.

7. Referencias:

- USDA (1996) "Soil Survey Laboratory Methods Manual", Soil Survey Investigations Report N° 42, version 3.0, National Soil Survey Center, Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture, January 1996.

APENDICE 5 j)

PREPARACION DE MUESTRAS VEGETALES

1. Instrumentos y aparatos:

- Estufa de secado con aire forzado, ShellaB 1370 FX.
- Desecador de polipropileno Bel-art, de 27 cm de diámetro, con conexión a vacío.

2. Materiales:

- Envases plásticos de 100 ml de capacidad (potes). Zephyr M.R.

3. Procedimiento:

Luego que las muestras vegetales (plántulas de *Noticastrum sericeum*) llegaron al laboratorio, estas fueron registradas en el libro de registro del Laboratorio de Suelos del CIMM. Debido a que estas muestras habían sido lavadas previamente según metodología EPA, no fue necesario realizar este procedimiento nuevamente.

3.1.- Procedimiento general

Se secó las muestras ya lavadas en estufa con aire forzado a 50°C por 48 horas o hasta peso constante y se registró el peso de la muestra seca en el libro de registro del laboratorio.

Dado que la cantidad de muestra con la que se contaba era muy pequeña, no fue necesario realizar la molienda de estas, pero si fue necesario unir las 10 réplicas de cada tratamiento para obtener así, una muestra más representativa de cada tratamiento.

Por lo tanto, se unió las 10 réplicas correspondientes a cada uno de los 5 tratamientos y se trasvasó el material a un envase plástico. Se registró los datos en la etiqueta del envase y en el libro de registro: N° de muestra de laboratorio, peso de muestra, fecha de preparación, preparada por.

Las muestras se guardaron en desecadora, para evitar que absorbieran humedad ambiente.

4. Referencias:

- USEPA (1995), "Test methods for evaluating solid waste: physical/chemical methods", Office of Solid Waste, EPA 530/ SW-846, September 1995, (3rd edition)

APENDICE 5 k)

DETERMINACION DE COBRE TOTAL EN MUESTRAS VEGETALES MEDIANTE DIGESTION EN MICROONDAS

1. Instrumentos y aparatos:

- Equipo digestor de microondas Milestone MLS 1200, con sistema de evaporación de ácidos FAM 40.
- Rotor de digestión MDR 100/6/100/110.
- Rotor de evaporación de ácidos, FAM 40.
- Sistema de enfriamiento MDR.
- Espectroscopio de Absorción Atómica con llama y horno grafito con autosempler. Perkin Elmer, Aanalysis 300.
- Balanza analítica, Precisa Modelo 125A, sensibilidad 0,0001g.
- Dispensador de HNO₃ conc., Eppendorf, Varispenser Plus, 5-25 ml, capaz de ajustar volumen a $20,0 \pm 0,5$ ml, 0,5% imprecisión.
- Dispensador para H₂O₂ al 30%, Eppendorf, Varispenser Plus, 1-5 ml, capaz de ajustar volumen a $5,0 \pm 0,02$ ml, 0,5% imprecisión.

2. Materiales:

- Vasos de digestión de teflón de 100 ml de capacidad, TFM.
- Matraces volumétricos de 10 ml, Kimax, clase A.
- Tubos de ensayo de 30 ml de capacidad, Kimax.

- Envases de polipropileno de 125 ml.

3. Reactivos:

- Agua destilada desionizada a pH 5,6.
- Acido nítrico 65% (P.M: 65,01 g/mol, densidad: 1,40 kg/L), p.a, suprapur, Merck.
- Acido nítrico 2%. Se agregó 20 mL de ácido nítrico suprapur al 65%, Merck a un matraz de aforo de 1L y se completó volumen con agua DDI a pH 5,6.
- Peróxido de Hidrogeno 30% p/p, suprapur. Perhidrol (P.M: 34,01 g/mol, densidad: 1,11 kg/L), Merck.

4. Procedimiento:

Las muestras de raíces y vástagos fueron trituradas manualmente, evitando la pérdida de muestra. Posteriormente, se pesó en el vaso de teflón del microondas, 0,001-0,039 g de muestra vegetal (el peso varió según disponibilidad de muestra), se hizo lo mismo con el material de referencia y muestra control.

Luego, se colocó el vaso dentro de la carcaza numerada y bajo campana, se agregó con dispensador 6 ml de ácido nítrico y con dispensador 1 ml de peróxido de hidrógeno. Se contó con un blanco cada 5 muestras, el cual estuvo constituido solo por los reactivos en los volúmenes mencionados. Se tapó y colocó cada uno de los vasos cerrados dentro del rotor de digestión de microondas. Se selló el sistema de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se colocó en la unidad de digestión del equipo de microondas.

Se digirió las muestras de acuerdo al siguiente programa de digestión recomendado por el fabricante:

	Tiempo (min.)	Potencia (Watts)
Etapa 1	2	250
Etapa 2	2	0
Etapa 3	6	250
Etapa 4	5	400
Etapa 5	5	600

Ventilación: 10 min.

Rotorctrl: on

Twist: on.

Se sacó el rotor del equipo de microondas y se colocó en el sistema de enfriamiento durante 10 min.

Luego, se destaparon los vasos bajo campana y se colocaron en el rotor de evaporación del sistema microondas.

Para evaporar las muestras se siguió el siguiente programa:

	Tiempo (min.)	Potencia (Watts)
Etapa 1	10	800

Se trasvasó las muestras evaporadas a un matraz de aforo de 10 ml, lavando muy bien el vaso de teflón con agua destilada desionizada, para incluir el lavado dentro del matraz. Posteriormente, se agregó al matraz 1 ml de ácido nítrico al 2% y se aforó con agua destilada desionizada a pH 5,6.

Se mezcló el líquido del interior del matraz y se trasvasó la muestra a un envase de plástico para un posterior análisis de cobre por EAA-HG (long. de onda: 324,8 nm).

5. Control de calidad:

El set de análisis contempló el análisis de una muestra de referencia (Loam B, SRM de NIST), como control de la exactitud dentro del set y de precisión entre sets.

Para evaluar la precisión dentro del set, se analizó una muestra en duplicado.

Para chequear interferencias debida a los reactivos, se incorporó blancos de reactivos.

Para evaluar la precisión entre sets se analizó una muestra control preparada en el laboratorio (QCPS).

Además, para chequear interferencias debido a la matriz se debió hacer adición de estándar a muestras y blancos. Este es un procedimiento válido de confirmación de resultados.

El set de análisis fue el siguiente:

Blanco, muestras 1 a 4, Dup. muestra 1, blanco, muestras 5 a 8, QCPS, blanco, muestras 9 a 12, SRM.

6. Cálculos:

$$\text{Contenido del analito (mg/kg)} = (A - B) * V * D / P$$

donde:

A= Concentración del analito en ug/L.

B= concentración del blanco en ug/L.

V= volumen final (ml).

D= dilución de la muestra.

P= peso de muestra (mg).

7. Referencias:

- Manual de operación de equipo de digestión de microondas Milestone MLS 1200 Mega.
- USEPA SW-846, Cap. 1, 1994.

APENDICE 6

*TABLAS DE DATOS DE ANALISIS FISICOQUIMICO DE MUESTRAS DE
SUBSTRATO SOLIDO: pH, %CO-%MO, CIC.*

APENDICE 6 a)

Valores de pH en agua y en CaCl₂ 0,01M de las muestras de substrato sólido sometidas a los distintos tratamientos de ensayo.

Tratamiento	Peso muestra (g)	Temperatura (°C)	pH en agua	Promedio pH en agua	pH en CaCl ₂ 0,01M	Promedio pH en CaCl ₂
tierra sin tratamiento previo	5,063	20,9	7,86	7,87	7,24	7,25
	5,045	20,8	7,87		7,26	
control	5,048	20,8	7,75	7,75	7,17	7,13
	5,031	20,8	7,74		7,09	
CuSO ₄ 10 mg/kg	5,037	20,8	7,75	7,77	7,19	7,21
	5,045	20,8	7,78		7,23	
CuSO ₄ 100 mg/kg	5,047	20,8	7,81	7,79	7,26	7,24
	5,048	21,0	7,77		7,21	
CuO 10 mg/kg	5,048	20,9	7,74	7,80	7,19	7,20
	5,038	20,8	7,85		7,21	
CuO 100 mg/kg	5,056	20,8	7,74	7,74	7,21	7,20
	5,047	20,8	7,73		7,19	
PROMEDIO SD				7,79 0,047		7,21 0,042

APENDICE 6 b)

Porcentaje de carbón orgánico y de materia orgánica de las muestras de sustrato sólido sometidas a los distintos tratamientos de ensayo.

	Volumen $K_2Cr_2O_7$ (mL)	Volumen $FeSO_4$ (mL)	Normalidad $FeSO_4$
Blanco1	10	10,34	0,961 N
Blanco2	10	10,31	
Blanco3	10	10,25	
Blanco4	10	10,72	

Tratamiento	Peso mtra. (g)	Vol. $K_2Cr_2O_7$ (mL)	Volumen $FeSO_4$ (mL)	Volumen $K_2Cr_2O_7$ reducido (mL)	% CO	%CO Prom.	%MO	% MO Promedio
tierra sin previo tratamiento	0,1531	20	8,21	12,11	31,24	31,24	53,86	53,85
	0,1529	20	8,23	12,09	31,23		53,84	
control	0,1511	20	8,18	12,14	31,74	31,62	54,72	54,52
	0,1521	20	8,19	12,13	31,50		54,31	
CuSO ₄ 10 mg/kg	0,1511	20	8,21	12,11	31,66	31,61	54,58	54,50
	0,1518	20	8,19	12,13	31,56		54,41	
CuSO ₄ 100 mg/kg	0,1512	20	8,13	12,19	31,85	31,78	54,91	54,79
	0,1521	20	8,11	12,21	31,71		54,67	
CuO 10 mg/kg	0,1514	20	8,16	12,16	31,73	31,63	54,70	54,53
	0,1511	20	8,26	12,06	31,53		54,36	
CuO 100 mg/kg	0,1511	20	8,17	12,15	31,76	31,72	54,75	54,68
	0,1513	20	8,19	12,13	31,67		54,60	
PROMEDIO						31,60%		54,48%
SD						0,189		0,328

APENDICE 6 c)

Valores de CIC de las muestras de sustrato sólido sometidas a los distintos tratamientos de ensayo.

Tratamiento	Peso Mta. (g)	Vol. final (mL)	Vol. Destil. (mL)	Gasto H ₂ SO ₄ 0,01N (mL)	CIC (meq/100g)	CIC promedio (meq/100g)
tierra sin previo tratamiento	20,0524	250	5	20,99	52,34	52,30
	20,0842	250	5	20,98	52,26	
control	20,1085	250	5	21,32	54,01	53,18
	20,0691	250	5	21,41	54,34	
CuSO ₄ 10 mg/kg	20,0556	250	5	21,19	53,83	52,81
	20,0985	250	5	21,22	53,79	
CuSO ₄ 100 mg/kg	20,0599	250	5	20,93	53,17	52,93
	20,0606	250	5	21,54	54,69	
CuO 10 mg/kg	20,0680	250	5	21,63	54,89	53,19
	20,0888	250	5	21,09	53,49	
CuO 100 mg/kg	20,0618	250	5	21,42	54,39	53,35
	20,0665	250	5	21,39	54,30	
PROMEDIO						52,96
SD						0,377

APENDICE 7

*TABLAS DE DATOS DE COBRE TOTAL, COBRE SOLUBLE Y COBRE IONICO EN
SUBSTRATO SOLIDO*

APENDICE 7 a)

Concentración de Cobre Total en las muestras de sustrato sólido sometidas a los distintos tratamientos de ensayo.

Tratamiento	Peso Mtra. (mg)	Conc. muestra (mg/kg)	Conc. Promedio (mg/kg)	Lectura equipo (mg/L)	Lectura Promedio (mg/L)
tierra sin previo tratamiento	252,8	38,16 ± 0,875	38,04 ± 0,909	0,386 ± 0,005	0,39 ± 0,007
	252,8	37,92 ± 0,942		0,383 ± 0,009	
control	250,3	38,14 ± 0,613	37,25 ± 0,683	0,382 ± 0,003	0,37 ± 0,004
	251,1	36,35 ± 0,752		0,365 ± 0,004	
CuSO ₄ 10 mg/kg	254,8	49,25 ± 0,459	51,44 ± 0,501	0,502 ± 0,002	0,52 ± 0,003
	253,6	53,63 ± 0,542		0,544 ± 0,003	
CuSO ₄ 100 mg/kg	251,8	138,6 ± 0,879	139,8 ± 0,667	1,396 ± 0,005	1,41 ± 0,004
	251,7	141,0 ± 0,454		1,420 ± 0,002	
CuO 10 mg/kg	251,4	48,61 ± 0,252	51,01 ± 0,397	0,489 ± 0,001	0,51 ± 0,002
	252,4	53,41 ± 0,541		0,539 ± 0,003	
CuO 100 mg/kg	252,8	129,1 ± 0,856	132,3 ± 0,737	1,305 ± 0,005	1,34 ± 0,004
	252,9	135,4 ± 0,617		1,370 ± 0,003	

APENDICE 7 b)

Contenido de cobre soluble en las muestras de sustrato sólido sometidas a los distintos tratamientos de ensayo.

Tratamiento	Cu soluble en sustrato sólido				
	Lectura equipo (mg/L)	Lectura promedio (mg/L)	% de Saturación (g agua/100g ss)	Conc. Cu soluble (mg/kg)	Concentración promedio (mg/kg)
tierra sin previo tratamiento	0,013 ± 0,001 0,013 ± 0,002	0,013 ± 0,002	135,12	0,0176 0,0176	0,0176
control	0,008 ± 0,001 0,010 ± 0,001	0,009 ± 0,001	146,23	0,0117 0,0146	0,0132
CuSO ₄ 10 mg/kg	0,055 ± 0,001 0,051 ± 0,002	0,053 ± 0,002	127,71	0,0702 0,0651	0,0677
CuSO ₄ 100 mg/kg	0,135 ± 0,005 0,136 ± 0,002	0,136 ± 0,004	143,45	0,1937 0,1951	0,1944
CuO 10 mg/kg	0,042 ± 0,002 0,044 ± 0,005	0,043 ± 0,004	115,72	0,0486 0,0509	0,0498
CuO 100 mg/kg	0,059 ± 0,001 0,059 ± 0,001	0,059 ± 0,001	137,92	0,0813 0,0813	0,0813

APENDICE 7 c)

Concentración de cobre iónico de las muestras de substrato sólido sometidas a los distintos tratamientos de ensayo.

Tratamiento	Cu iónico (mV)	Cu iónico (M)x10 ⁻¹³	Cu ionico (mg/L)x10 ⁻⁸	Cu ionico (mg/kg)x10 ⁻⁸
tierra sin previo tratamiento	-182,5	0,0293	0,0186	0,0251
control	-197,5	0,0085	0,0054	0,0079
CuSO ₄ 10 mg/kg	-120,5	4,7564	3,0225	2,9500
CuSO ₄ 100 mg/kg	-101,5	22,639	14,386	20,600
CuO 10 mg/kg	-132,2	1,8198	1,1564	1,3400
CuO 100 mg/kg	-121,8	4,2748	2,7165	2,6600