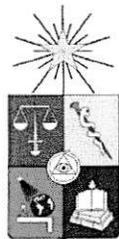


UCh-FC  
Q. Ambiental  
L 865  
C L



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“DETERMINACIÓN DE LA MOVILIDAD DE Cu, Mn Y Zn EN SUELOS Y SU DISPONIBILIDAD PARA LA ABSORCIÓN POR *LACTUCA SATIVA* L. EN ZONAS CERCANAS A RELAVES MINEROS.”**

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

**Químico Ambiental**

**Rodrigo Lorca Torrejón**

Director de Seminario de Título: Dra. Yasna Tapia Fernandez  
Profesor Patrocinante: Dra. Cecilia Labbé D.

Octubre 2015  
Santiago – Chile

**ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE**



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el candidato:

### RODRIGO LORCA TORREJÓN

“DETERMINACIÓN DE LA MOVILIDAD DE Cu, Mn y Zn EN SUELOS Y SU DISPONIBILIDAD PARA LA ABSORCIÓN POR *LACTUCA SATIVA* L. EN ZONAS CERCANAS A RELAVES MINEROS”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

#### COMISIÓN DE EVALUACIÓN

*Dra. Yasna Tapia Fernandez*  
**Director Seminario de Título**

*Dra. Cecilia Labbé D.*  
**Profesora Patrocinante**

*M.Cs Sylvia Copaja C.*  
**Presidente**

*Dra. María Cecilia Rojas G.*  
**Corrector**

Santiago de Chile, Octubre de 2015.

## DEDICATORIA

A mi madre, que siempre me entregó el amor necesario para seguir adelante.

A mi padre, por la confianza y el cariño que siempre ha puesto en mí.

A mis hermanos Pato, Guille y Andrés; y a mi Tía Ana, por su infinito amor y apoyo,  
incondicional.

A ti, Tamara, por ser mi compañera de vida y enseñarme lo hermoso que es amar.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a la Profesora Yasna Tapia, por haberme dado la oportunidad de participar en el proyecto con la comunidad de Huechún. Por sus enseñanzas, conocimientos y por la confianza que siempre deposito en mi. A Naty, porque hicimos un gran trabajo en equipo y por su aporte en este seminario. A la señora Marisol y a la señora Consuelo, por hacer tan grato el ambiente de trabajo. A todas las personas que conocí en el laboratorio de Química de Agua y de Suelos. Muchas Gracias.

A la profesora Cecilia Labbé, por su disponibilidad para discutir los temas y entregarme el ánimo necesario para seguir adelante.

A mi familia y amigos.

## INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
<b>1.1 Antecedentes Generales.</b>	<b>1</b>
1.1.1 Elementos traza metálicos: Definición y origen en los suelos	1
1.1.2 Elementos traza metálicos y su comportamiento en el suelo	2
<b>1.2 Antecedentes Específicos</b>	<b>3</b>
1.2.1 Relaves mineros y su impacto en suelos agrícolas	3
1.2.2 Absorción y acumulación de metales en tejidos vegetales	4
1.2.3 Factor de Bioacumulación de metales.	4
1.2.4 Biodisponibilidad de metales en el suelo	4
1.2.5 Extracción secuencial de metales en suelos.	5
1.2.5.1 Fracción intercambiable.	6
1.2.5.2 Fracción asociada a los carbonatos.	6
1.2.5.3 Fracción reducible.	6
1.2.5.4 Fracción oxidable.	7
1.2.5.5 Fracción Residual:	8
1.2.6 Factores que afectan la disponibilidad de metales traza en el suelo	8
1.2.6.1 Efecto del pH del suelo.	8
1.2.6.2 Efecto del contenido de Materia Orgánica.	10
1.2.6.2.1 Formación de complejos órgano-metálicos	11
1.2.6.3 Efecto de los minerales de arcilla.	12
1.2.6.4 Efecto de la presencia de óxidos de aluminio, hierro y manganeso en el suelo.	13
1.2.6.5 Suelos con Carbonatos.	14

1.2.6.6	Efecto del potencial redox del suelo.	15
1.2.7	Efecto de agentes quelantes en la biodisponibilidad de metales.	15
1.2.7.1	Ácido cítrico como agente quelante	16
1.2.8	Propuesta del Seminario	¡Error! Marcador no definido.
<b>1.3</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>17</b>
<b>1.4</b>	<b>Objetivos</b>	<b>17</b>
1.4.1	Objetivo general	17
1.4.2	Objetivos Específicos	17
<b>II.</b>	<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Obtención y tratamiento de muestras</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Reactivos y materiales.</b>	<b>20</b>
2.2.1	Equipos y materiales	20
2.2.2	Reactivos	21
<b>2.3</b>	<b>Análisis de Suelos.</b>	<b>22</b>
2.3.1	Determinación de pH	23
2.3.2	Conductividad eléctrica	23
2.3.3	Contenido de materia orgánica	24
2.3.4	Textura del suelo	24
2.3.5	Determinación de Nitrógeno disponible	25
2.3.6	Determinación de fósforo disponible	25
2.3.7	Determinación de potasio disponible	26
2.3.8	Determinación de concentración total de Cu, Mn y Zn en suelos	26
<b>2.4</b>	<b>Extracción secuencial de metales del suelo</b>	<b>26</b>
2.4.1	Fracción soluble intercambiable	27
2.4.2	Fracción asociada a los carbonatos	27
2.4.3	Fracción asociada a los óxidos de hierro y manganeso:	27
2.4.4	Fracción asociada a la materia orgánica:	27

2.4.5	Fracción residual: _____	28
<b>2.5</b>	<b>Análisis de muestras vegetales _____</b>	<b>28</b>
2.5.1	Cultivo y tratamiento de lechugas _____	28
2.5.2	Preparación de la muestra para análisis: _____	29
2.5.3	Determinación de concentración total de Cu, Mn y Zn en hoja y raíz _____	29
<b>2.6</b>	<b>Curvas de Calibración para la determinación de metales por EAA _</b>	<b>30</b>
<b>2.7</b>	<b>Análisis estadístico _____</b>	<b>31</b>
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Caracterización de los suelos. _____</b>	<b>32</b>
<b>3.2</b>	<b>Efectos de las características del suelo en el crecimiento de hojas y raíces de <i>L. sativa</i> _____</b>	<b>36</b>
<b>3.3</b>	<b>Concentración total de Cu, Mn y Zn. _____</b>	<b>37</b>
<b>3.4</b>	<b>Extracción Secuencial de metales. _____</b>	<b>39</b>
3.4.1	Extracción secuencial de Cu _____	39
3.4.2	Extracción secuencial de Mn _____	41
3.4.3	Extracción secuencial de Zn _____	43
<b>3.5</b>	<b>Biodisponibilidad de Cu, Mn y Zn en los suelos. _____</b>	<b>45</b>
<b>3.6</b>	<b>Concentraciones de Cu, Mn y Zn en raíces y hojas de lechugas antes y después del tratamiento con ácido cítrico _____</b>	<b>46</b>
3.6.1	Cobre en lechugas. _____	46
3.6.2	Manganeso en lechugas. _____	47
3.6.3	Zinc en lechugas. _____	48
<b>3.7</b>	<b>Contenido de Cu, Mn y Zn en hojas de <i>Lactuca sativa</i> _____</b>	<b>49</b>
<b>3.8</b>	<b>Factor de bioacumulación de Cu, Mn y Zn _____</b>	<b>51</b>

3.9 Toxicidad potencial de cultivos.	52
IV. CONCLUSIONES	53
11. BIBLIOGRAFÍA	56
12. ANEXO	61

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Constante de estabilidad (Log K) de los quelatos del ácido cítrico (Barton L., 2006).	16
<b>Tabla 2:</b> Curvas de calibración para Cu, Mn y Zn.	30
<b>Tabla 3:</b> Textura, pH, conductividad eléctrica (dS m <sup>-1</sup> 25°C), contenido de materia orgánica oxidable (%), nitrógeno disponible, potasio disponible y fósforo disponible (mgkg <sup>-1</sup> ) en tres suelos agrícolas (Nogales, Ciruelos y Barbecho).	32
<b>Tabla 4:</b> Secuencial de Cu (mg kg <sup>-1</sup> de suelo) en suelos correspondientes a Nogales, Ciruelos y Barbecho	61
<b>Tabla 5:</b> Extracción secuencial de Mn (mg kg <sup>-1</sup> de suelo) en suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho	61
<b>Tabla 6:</b> Fraccionamiento químico de Zn (mg kg <sup>-1</sup> de suelo) en suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho	61
<b>Tabla 7:</b> Contenido de Cu, Mn y Zn (mg kg <sup>-1</sup> m.s) en hoja y raíz de <i>Lactuca Sativa</i> cultivada en suelo Nogales sin tratamiento (T0) y con tratamiento de ácido cítrico 4 g/L (T1)	62
<b>Tabla 8:</b> Contenido de Cu, Mn y Zn (mg kg <sup>-1</sup> m.s) en hoja y raíz de <i>Lactuca Sativa</i> cultivada en suelo Ciruelos sin tratamiento (T0) y con tratamiento de ácido cítrico 4 g/L (T1)	62
<b>Tabla 9:</b> Concentración de Cu, Mn y Zn (mg kg <sup>-1</sup> m.s) en hoja y raíz de <i>Lactuca Sativa</i> cultivada en suelo Ciruelos sin tratamiento (T0) y con tratamiento de ácido cítrico 4 g/L (T1)	63
<b>Tabla 10:</b> Factor de Bioacumulación para la lechuga en los distintos suelos	63
<b>Tabla 11:</b> Contenido de Cu, Mn y Zn en hoja (mg kg <sup>-1</sup> m.s.) de <i>Lactuca Sativa</i> cultivada en los distintos suelos sin tratamiento (T0) y con tratamiento de ácido cítrico 4 g/L (T1)	63

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Efecto del pH en la adsorción de diferentes iones metálicos después de 2 horas de reacción.	9
<b>Figura 2:</b> Representación esquemática de un cristal de arcilla de silicato. (Micela).	13
<b>Figura 3:</b> Localidad de Huechún y cercanía con el Tranque de relaves.	19
<b>Figura 4 :</b> Ensayo de aplicación de ácido cítrico en plantas de lechuga cultivadas en macetas con los suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho.	29
<b>Figura 5:</b> Curva de calibración para Cu, Mn y Zn	30
<b>Figura 6:</b> Porcentajes de arena, limo y arcilla para los suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho.	33
<b>Figura 7:</b> Valores de pH, conductividad eléctrica ( $\text{dS m}^{-1}$ ) y contenido de materia presente en los suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho. *Máximos y mínimos recomendados por INIA.	34
<b>Figura 8:</b> Contenido de N, P y K disponible ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho, además de los niveles recomendados.	35
<b>Figura 9:</b> Masa seca (g) de las hojas y raíces de las lechugas cultivadas en suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho.	37
<b>Figura 10:</b> Concentración total de Cu, Mn y Zn en suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho y valores típicos para suelos no contaminados*.	38
<b>Figura 11:</b> Extracción secuencial de Cu para suelo Nogales, Ciruelo y Barbecho.	40
<b>Figura 12:</b> Extracción secuencial de Cu (%) para suelo Nogales, Ciruelo y Barbecho.	41
<b>Figura 13:</b> Extracción secuencial de Mn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) para suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho.	42
<b>Figura 14:</b> Extracción secuencial de Mn (%) para suelo Nogales, Ciruelo y Barbecho.	43
<b>Figura 15:</b> Extracción secuencial de Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) para los suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho	44
<b>Figura 16:</b> Extracción secuencial de Zn (%) para los suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho.	44
<b>Figura 17:</b> Concentración de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en hoja y raíz de lechugas secas cultivadas en los suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho en tratamiento con agua (T0) y con ácido cítrico (T1)	47
<b>Figura 18:</b> Concentración de Mn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en hoja y raíz de lechugas secas cultivadas en los suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho en tratamiento con agua (T0) y con ácido cítrico (T1)	48
<b>Figura 19:</b> Concentración de Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en hoja y raíz de lechugas secas cultivadas en los suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho en tratamiento con agua (T0) y con ácido cítrico (T1)	49
<b>Figura 20:</b> Efecto del tratamiento con ácido cítrico en el contenido de Mn en las hojas secas de las lechugas.	50
<b>Figura 21:</b> Efecto del tratamiento con ácido cítrico en el contenido de Cu y Zn en las hojas de las lechugas.	51
<b>Figura 22:</b> Factor de bioacumulación para Cu, Mn y Zn en lechugas cultivadas en suelo Nogales.	52
<b>Figura 23:</b> Factor de bioacumulación para Cu, Mn y Zn en lechugas cultivadas en suelo Ciruelos.	52
<b>Figura 24:</b> Factor de bioacumulación para Cu, Mn y Zn en lechugas cultivadas en suelo Barbecho.	52

## RESUMEN

La presencia de elementos traza metálicos o metales pesados es de gran importancia en el medio ambiente por su trascendencia en la contaminación de suelos, y la potencial transferencia a los cultivos agrícolas. En el suelo, la movilidad de algunos elementos metálicos puede ser favorecida por la acción de agentes quelantes naturales como el ácido cítrico. Para estimar la movilidad y biodisponibilidad elementos traza metálicos en el suelo, se utiliza la extracción secuencial o fraccionamiento de metales, lo que permite determinar la fracción del suelo en donde se encuentra el metal.

La extracción secuencial de Tessier distingue cinco fracciones a las cuales el metal se puede encontrar asociado al suelo: 1) la fracción soluble o intercambiable 2) los adsorbidos específicamente a carbonatos 3) la fracción asociada a óxidos de hierro y manganeso, 4) la fracción asociada a la materia orgánica y 5) la fracción residual o asociada a silicatos.

El presente trabajo tiene por objetivo estudiar el comportamiento del Cu, el Mn y el Zn en tres suelos agrícolas, de diferente composición y cercanos a relaves mineros; identificando en que fracciones del suelo se encuentran asociados, evaluando la movilidad que presentan cuando se aplica ácido cítrico como tratamiento a lechugas cultivadas en estos suelos y como la composición de cada uno influye en la absorción de estos micronutrientes.

El ensayo experimental con lechugas se llevó a cabo en un vivero de exterior utilizando macetas y tres suelos denominados Barbecho, Ciruelos y Nogales. Se determinó la textura de los suelos y sus principales propiedades químicas: pH, conductividad eléctrica, contenido de materia orgánica y concentración total de Cu, Mn y Zn.

Los resultados de la extracción secuencial muestran que la mayor parte del Cu y del Zn se encuentra en la fracción residual, sin embargo existe una fracción menor que está asociado a las fracciones de los óxidos de Fe y Mn y a la materia orgánica. Para el Cu en particular se constato una alta afinidad con la materia orgánica, encontrándose una relación entre el alto contenido de materia orgánica que presenta el suelo Nogales (4,3%) y el 25% de Cu asociado a esta fracción.

Los factores de bioacumulación de los metales estudiados muestran que sin importar la textura o la biodisponibilidad relativa del metal en el suelo, la planta es capaz de absorberlo en las cantidades que requieren las hojas para su desarrollo. Además, se constató que la menor estabilidad del quelato Mn-citrato no es un factor determinante para favorecer la biodisponibilidad de Cu o Zn que forman quelatos más estables con ácido cítrico, ya que la mayor concentración de Mn en el suelo desplaza el equilibrio, razón por la cual se pudo evidenciar un aumento en la movilidad de Mn, en hojas y raíces cuando se aplicó ácido cítrico como tratamiento en los suelos Ciruelos y Barbecho.

Finalmente, en los tres suelos existen concentraciones de Cu, Mn y Zn que están dentro de los rangos esperados para suelos no contaminados de la Zona Central de Chile, donde existe una alta concentración de Mn. Esto indica que no están afectados por el relave de las cercanías. Además, las hojas de lechuga contienen Cu (11-13 mg/kg), Mn (195-308 mg/kg) y Zn (29-34 mg/kg) en concentraciones normales que no presentan un peligro para su consumo.

## ABSTRACT

The presence of heavy metals in soils is importance in the environment for its significance in soil contamination and the potential transfer to agricultural crops. Into the soil, the mobility of some metal elements may be favored by the natural action of chelating agents such as citric acid. To estimate the mobility and bioavailability of heavy metals or metallic trace elements in soils, sequential extraction or fractionation of metals is used to determine the fraction whit the metal is associated.

Tessier sequential extraction identifies five fractions: 1) soluble fraction or exchangeable 2) specifically adsorbed to carbonates 3) the fraction associated with iron and manganese oxides, 4) the fraction associated with organic matter or sulfides and 5) associated with residual fraction or silicates.

The objective of this work was study the behavior of Cu, Mn and Zn in three agricultural soils of different composition and near mine tailings; identifying soil fractions that are associated, evaluating the metal mobility when citric acid is applied as a treatment to lettuce in these soils and the influence of soil composition in the absorption of these micronutrients.

The lettuce experimental test was performed in a greenhouse using pots outside and three soils called Nogales, Ciruelos y Barbecho. Soil texture, conductivity, pH, organic matter content and total concentration of Cu, Mn and Zn was determined.

The sequential extraction results show that most of the Cu and Zn are in the residual fraction, but exist a smaller fraction that is associated with oxides and organic matter. Cu in particular shown high affinity with organic matter, there being a relationship between the Nogales high organic matter content (4.3%) and 25% of Cu associated in this fraction.

Metals bioaccumulation factors studied show that regardless of texture or relative bioavailability of the metal in the soil, the plant is able to absorb the metal in the quantities required for development leaves. Also, it was verified that the lower chelate stability Mn-citrate is not decisive for the bioavailability of Cu or Zn to form more stable chelates with citric acid, since the highest concentration of Mn in the soils displaces the reaction equilibrium, evidence an increase in mobility of Mn in leaves and roots when citric acid was applied in Ciruelos and Barbecho.

Finally, the concentrations of Cu, Mn and Zn in three soils are within expected ranges for uncontaminated soils of the Central Zone of Chile, where there is a high concentration of Mn. This indicates that they are not affected by the tailings. In addition, the lettuce leaves contain Cu (11-13 mg / kg), Mn (195-308 mg / kg) and Zn (29-34 mg / kg). These concentrations do not represent a risk for human consumption.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes Generales.

#### 1.1.1 Elementos traza metálicos (ETMs): Definición y origen en los suelos

Los suelos contienen naturalmente casi la totalidad de los elementos metálicos de la tabla periódica, no obstante, la concentración de éstos varía ampliamente de un suelo a otro, y muchos de ellos se encuentran bajo el límite de detección de los procedimientos analíticos (Alloway 1995).

El término metales pesados es utilizado para referirse a un grupo de metales y metaloides con relativamente alta densidad ( $>5 \text{ g cm}^{-3}$ ) los que en primera instancia se asocian con problemas de toxicidad así como también a la contaminación de recursos naturales. Debido a cierta ambigüedad en el significado y a su connotación negativa, la comunidad científica está reemplazando el término "metal pesado", por "elementos traza metálicos (ETMs) o metales traza" (Alloway 1995).

El origen de los elementos traza metálicos en los suelos puede tener dos fuentes: geogénica o litogénica (origen natural) y antropogénicas (causada por el hombre).

La fuente de origen natural es uno de los factores predominantes en la concentración total de metales en los suelos del mundo en general, y se relaciona con el material parental del suelo, el polvo arrastrado por el viento, las erupciones volcánicas, los aerosoles marinos y los incendios forestales (Fergus, 1954).

Las fuentes de origen antropogénico, se relacionan directamente con la contaminación de un suelo, y pueden causar que las concentraciones se eleven por sobre las concentraciones naturales correspondientes a la composición geoquímica

original de un suelo (Kabata-Pendias, 2011). Dentro de las fuentes antropogénicas se encuentran las relacionadas con:

- La agricultura: fertilización, lodos de depuradoras y desechos animales, fertilizantes, pesticidas y aguas de irrigación,
- La producción de energía: emisiones desde las estaciones de poder), la minería (fundiciones, refinamiento, transporte y relaves,
- La producción de metales secundarios y operaciones de reciclaje,
- Los complejos urbano/industriales: incineración de desechos y rellenos sanitarios.
- Los automóviles. (combustión de derivados del petróleo) (Alloway, 1995).

### **1.1.2 Elementos traza metálicos y su comportamiento en el suelo**

Los ETMs son adsorbidos fuertemente por los constituyentes orgánicos e inorgánicos del suelo. La capacidad de amortiguar o controlar la movilidad o biodisponibilidad de los metales en el medio ambiente debe ser una de las propiedades más importantes atribuible a los suelos, con implicancias tanto para la disponibilidad de micronutrientes para los microorganismos terrestres y acuáticos como así mismo de los problemas relacionados con su toxicidad (Alloway, 1995).

En general la fuerza con que un metal es retenido en el suelo es el reflejo de:

- Las propiedades atribuibles a la fuente del metal.
- La afinidad intrínseca y las características propias del ion metálico para su adsorción en la superficie del suelo y para formar ligandos en éste.
- La presencia de ciertos componentes del suelo (humus, óxidos de metal, arcillas aluminio silicatadas) que forman complejos con los metales.
- Propiedades del suelo, incluyendo pH, potencial redox, contenido de agua, temperatura, actividad biológica y concentración de sales.
- Tiempo de contacto del metal en el suelo.

De forma global los ETMs incorporados al suelo pueden seguir cuatro diferentes vías (García y Dorronsoro., 2005):

1) Pueden quedar retenidos en el suelo, disueltos en la fase acuosa del suelo, ocupando sitios de intercambio o específicamente adsorbidos sobre constituyentes inorgánicos del suelo, asociados con la materia orgánica del suelo y/o precipitados como sólidos puros o mixtos (Pagnanelli, y col. 2004)

2) Pueden ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a las cadenas tróficas.

3) Pueden pasar a la atmósfera por volatilización.

4) Pueden mobilizarse a las aguas superficiales o subterráneas.

## **1.2 Antecedentes Específicos**

### **1.2.1 Relaves mineros y su impacto en suelos agrícolas**

En Chile, los suelos agrícolas constituyen un recurso de gran importancia para el desarrollo del país, sin embargo, estos son muy vulnerables a la contaminación con metales.

La minería es una de las actividades económicas del país que más ha crecido durante la última década y es también una de las que ha ocasionado más contaminación del medio ambiente, ya sea de forma directa o indirecta (Lagos, 2004). La dispersión de material particulado, desde los tranques de relaves a las zonas aledañas puede generar graves problemas de contaminación, ya que este se deposita en los suelos pudiendo ocasionar acidificación. Por otra parte, los relaves son susceptibles a la erosión eólica e hídrica, por lo que, los metales allí presentes pueden afectar suelos y cauces de agua cercanos (Peppas y col., 2000).

El suelo resulta ser el principal receptor de metales presentes en los relaves, los que constituyen un riesgo ambiental, cuando las concentraciones alcanzan los

límites de toxicidad. Además, los metales no son degradables, por lo cual se acumulan en las distintas matrices ambientales (Martin y col., 2008).

### **1.2.2 Absorción y acumulación de metales en tejidos vegetales**

Para que la planta absorba un metal, este debe estar en forma biodisponible ya que la absorción y posterior acumulación depende principalmente del movimiento del metal desde la solución suelo a la raíz. Se entiende por biodisponibilidad la fracción de ETMs que está disponible para la absorción por las plantas. Algunos metales pueden ser micronutrientes para las plantas como es el caso del Cu, el Mn y el Zn, y otros metales son tóxicos, como el Cd y el Pb que no cumplen función biológica conocida en plantas ni animales.

### **1.2.3 Factor de Bioacumulación de metales.**

El factor de bioacumulación (FB) de metales es un indicador de la capacidad de la planta para acumular un metal con respecto a la concentración que presenta en el suelo o sustrato (Tapia y col., 2013), y se calcula:

$$FB = \frac{\text{Concentración de metal en el tejido de la planta } (mg\ kg^{-1})}{\text{Concentración inicial de metal en el sustrato } (mg\ kg^{-1})}$$

### **1.2.4 Biodisponibilidad de metales en el suelo**

Las plantas usualmente no pueden acceder a la totalidad del contenido de metales presentes en los suelos. Por el contrario, la fracción que las plantas pueden absorber es conocida como la fracción disponible o biodisponible. Así, los metales presentes en el suelo pueden dividirse en un número de fracciones incluyendo: el metal soluble en la solución del suelo, metales precipitados, adsorbidos en las arcillas, los óxidos y la materia orgánica y los metales dentro de la matriz mineral del suelo (Reichman 2002).

Debido a que los metales traza pueden encontrarse asociados a distintas fracciones del suelo, de mayor a menor disponibilidad, el análisis de la concentración total de metales traza en suelos no permite estimar su potencial capacidad de movilización y biodisponibilidad (Thomas y col., 1994).

Para determinar a cuales fracciones, de acuerdo a su biodisponibilidad, se asocian los metales traza al suelo, se utilizan extracciones secuenciales o fraccionamientos químicos. Esto permite estimar si el metal traza se moviliza con facilidad o no dependiendo de la fracción a la cuales este asociada y así predecir si la planta lo puede absorber o si puede lixiviar a perfiles más profundos, pudiendo potencialmente alcanzar incluso las napas subterráneas.

#### **1.2.5 Extracción secuencial de metales en suelos.**

La importancia de saber de qué manera se encuentra un ETM en el suelo, ha permitido perfeccionar las técnicas analíticas de extracción, permitiendo mejorar las conclusiones en cuanto a la contaminación y a la biodisponibilidad que puede presentar un ETM.

La concentración total de un elemento no es un buen indicador de su movilidad en el suelo y, por sobre todo, del impacto que tendrá en el medio ambiente (Tessier y col, 1979). El uso de extracciones secuenciales entrega información detallada acerca de la biodisponibilidad, la movilización y el transporte de metales traza en el suelo (Tessier y col. 1979).

En general se distinguen 5 fracciones extraíbles, en las cuales pueden encontrarse los ETMs:

- la fracción soluble o intercambiable,
- adsorbidos específicamente a carbonatos o fracción ácido-soluble,
- la fracción asociada a óxidos de hierro y manganeso,
- la fracción asociada a la materia orgánica y

- la fracción residual o asociada a minerales y/o silicatos.

#### **1.2.5.1 Fracción intercambiable.**

Esta fracción incluye metales adsorbidos débilmente sobre superficies sólidas del suelo (arcillas, óxidos de Fe y Mn, materia orgánica) y que están retenidos por una interacción electrostática relativamente débil. Estos metales pueden ser liberados por un proceso de intercambio iónico. Los iones metálicos intercambiables son una medida de aquellos metales que son liberados más fácilmente en la solución del suelo. Esta etapa representa la fracción con mayor biodisponibilidad y se determina por un intercambio iónico con una sal de  $MgCl_2$ .

#### **1.2.5.2 Fracción asociada a los carbonatos.**

Esta fracción incluye los metales que puedan estar adsorbidos sobre las superficies de las sales de calcio o bien precipitados sobre las superficies de los minerales de calcio. En ausencia de carbonatos, esta fracción puede indicar el metal que está en una fracción ácido-soluble.

El uso del tampón ácido acético/acetato amónico a pH 5,0 y concentraciones, es utilizado para determinar los cationes de cambio asociado a carbonatos (Viets, 1962; Gibbs, 1973; Shuman, 1979). Esta mezcla no sólo actúa sobre los cationes de cambio sino que también ataca parcialmente a los carbonatos, extrayendo parte de la fracción unida a la materia orgánica y a los óxidos de hierro, aunque resulta menos agresivo que otros agentes extractantes

#### **1.2.5.3 Fracción reducible.**

En esta fracción se encuentran los ETM asociados principalmente a óxidos e hidróxidos de Fe y Mn. Los metales pueden estar enlazados a los óxidos de Fe y Mn por alguno de los siguientes mecanismos o la combinación de ellos: la co-

precipitación, la adsorción, la formación de complejos de superficie, el intercambio iónico y la penetración en la estructura cristalina.

Los metales traza unidos a estos minerales son inestables en condiciones reductoras. Esta fracción ocupa el segundo lugar respecto a la biodisponibilidad de metales traza hacia la solución del suelo.

Se han propuesto otra serie de reactivos para caracterizar los elementos que se liberan en condiciones reductoras como clorhidrato de hidroxilamina u oxalato amónico, bajo la acción de un medio ácido (ácido nítrico, ácido acético, ácido cítrico), aunque a veces se emplea un agente complejante (EDTA o ditionito sódico-citrato). La influencia de la temperatura reviste gran importancia, así al utilizar como extractante clorhidrato de hidroxilamina-ácido nítrico (pH 2,0) a temperatura ambiente, se liberan los metales unidos a los carbonatos y a los óxidos de manganeso, pero difícilmente los asociados a los óxidos de hierro (Chao, 1972). Sin embargo, si el tratamiento se realiza en caliente (96 °C) se disuelven los óxidos de hierro amorfos.

#### **1.2.5.4 Fracción oxidable.**

En esta fracción los metales traza pueden estar asociados por medio de reacciones de complejación, principalmente con los coloides de la materia orgánica del suelo. Las formas metálicas solubles son liberadas cuando la materia orgánica es atacada en condiciones oxidantes severas bajo tratamiento con peróxido de hidrogeno y acido nítrico, liberando de esta manera cualquier metal asociado. La biodisponibilidad de esta fracción depende en gran medida del tipo de materia orgánica.

#### **1.2.5.5 Fracción Residual:**

En esta fracción se encuentra el metal que forma parte de la estructura cristalina proveniente del material parental del suelo y representa la fracción no disponible para las plantas. Para su determinación se utilizan ácidos o mezclas de éstos, generalmente con el aumento en la temperatura, para asegurar la completa digestión del material en el ácido. La mezcla de ácido nítrico y peróxido de hidrógeno a altas temperaturas bajo presión asegura la total digestión de los metales.

#### **1.2.6 Factores que afectan la disponibilidad de metales traza en el suelo**

Los metales presentes en la solución del suelo corresponden a la fracción que está directamente disponible para la absorción por las plantas, sin embargo también existen fracciones que presentan una biodisponibilidad relativa. Por lo tanto, los factores que afectan la concentración de los metales en el suelo afectarán también la biodisponibilidad de éstos para las plantas. Estos factores incluyen principalmente: el pH, la materia orgánica, minerales de las arcillas y óxidos hidratados, los carbonatos y las condiciones redox.

##### **1.2.6.1 Efecto del pH del suelo.**

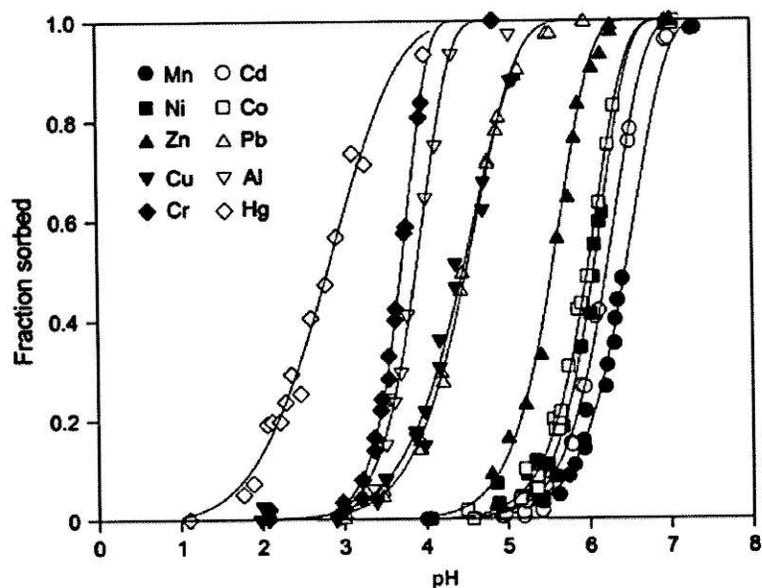
El pH es el factor más importante para estimar la movilidad de los metales en el suelo debido a que afecta el equilibrio entre la especiación metálica, la solubilidad, la adsorción y el intercambio de iones en el suelo (McBride, y col. 1997; Kabata-Pendias, 2000; Reichman, 2002).

A pH ácido se produce una competencia de los iones  $H^+$  con los cationes metálicos por los sitios de intercambio lo que lleva a la desorción de los metales traza metálicos, aumentando su concentración en la solución suelo y su biodisponibilidad (Alloway, 1995; Lassat, 2001). Por el contrario, al aumentar el pH,

los metales traza metálicos son removidos de la solución y son adsorbidos por los coloides del suelo o precipitados, disminuyendo su biodisponibilidad (Basta y Tabatabai, 1992; Alloway, 1995, Lassatt, 2001).

Sin embargo el efecto del pH en la biodisponibilidad de los principales metales traza micronutrientes, varía de acuerdo a sus afinidades con los sitios de intercambio. En general, la mayoría de los metales tienden a estar más disponibles a pH ácido, excepto As, Mo y Se, los cuales tienden a estar más disponibles a pH alcalino (Silveira, y col. 2003).

La Figura 1 muestra el efecto del pH en la adsorción de 10 iones metálicos después de 2 horas de reacción. (Fischer, y col. 2007)



**Figura 1:** Efecto del pH en la adsorción de diferentes iones metálicos después de 2 horas de reacción.

- **Efecto sobre la biodisponibilidad de Mn y Zn.** Tanto la biodisponibilidad del Mn como del Zn se ven afectadas fuertemente por el pH del suelo

(Fergus, 1954; McGrath y col., 1988; Turner 1994). Con la disminución del pH del suelo, el  $Mn^{2+}$  y el  $Zn^{2+}$  compiten con  $H^+$  y  $Al^{3+}$  por los sitios de intercambio, aumentando la solubilidad de  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  en el suelo y dejando una gran proporción de estos metales altamente disponible en la solución del suelo. (Kalbasi y col., 1978; McBride 1982; Bar-Tal y col., 1988; Msaky and Calvet, 1990; Sauve y col., 1997).

- **Efecto sobre la biodisponibilidad de Cu.** El pH tiene un efecto relativamente limitado sobre la distribución del contenido de  $Cu^{2+}$  soluble en el suelo. Esto puede ser explicado por la mayor afinidad del  $Cu^{2+}$  con la materia orgánica que con la concentración de  $H^+$  (Alloway, 1995).

#### **1.2.6.2 Efecto del contenido de Materia Orgánica.**

La materia orgánica del suelo se compone de sustancias húmicas y no húmicas, siendo las sustancias húmicas los compuestos más estables (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas). Estos poseen grupos funcionales (C=C, COOH, SH) nucleofílicos con una alta afinidad por los iones metálicos, y por lo tanto capaces de formar complejos órgano-metálicos (Kabata-Pendias y Pendias, 2000, Reichman 2002). Una vez que forman quelatos o complejos, los metales pueden migrar con mayor facilidad a lo largo del perfil del suelo.

El humus es el producto orgánico de la constante descomposición de los desechos de plantas y animales. En contraste con los constituyentes minerales para absorber metales, el humus es bastante heterogéneo y puede existir como partícula, coloide o diversas formas moleculares. La superficie de dichos coloides es negativa en un amplio rango de pH, entre 3,0 y 10,0. Esta carga negativa en el humus genera atracciones de metales y cationes, especialmente de los metales alcalinos y alcalinos-térreos, pero también de metales traza. La estabilidad de muchos de estos complejos órgano-metálicos frente a la degradación por los

organismos del suelo es una causa muy importante también de la persistencia de los metales traza en el suelo.

#### **1.2.6.2.1 Formación de complejos órgano-metálicos**

En general, las plantas no absorben complejos órgano-metálicos de gran tamaño por lo que su biodisponibilidad disminuye, sin embargo, también existen compuestos orgánicos solubles de menor tamaño asociados a los metales (Alloway, 1995b). Cierta fracción de la materia orgánica puede estar en forma soluble denominada carbono orgánico soluble (DOC) que transporta elementos metálicos para que puedan ser absorbidos por las plantas (Antonadis & Alloway, 2002).

En condiciones alcalinas, los grupos carboxilo (COOH) de la materia orgánica se transforman en aniones carboxilato (COO<sup>-</sup>) los cuales forman complejos estables con los metales, (González, 1995; Yin y col. 1996). De esta forma los ETMs quedan adsorbidos en la materia orgánica humificada (Rieuwerts y col. 1998; Silveira y col. 2003; Basta, 2004). Por lo tanto, al aumentar la cantidad de materia orgánica en el suelo también aumenta la formación de complejos órgano-metálicos cuya solubilidad depende del pH y la masa molar del complejo. El efecto de este factor en los metales micronutrientes Cu, Zn y Mn, varía de acuerdo a su capacidad relativa de coordinación con la materia orgánica.

- **Efecto de la materia orgánica sobre el Cu.** La materia orgánica puede adsorber tan fuertemente algunos metales, como el Cu<sup>2+</sup>, que estos pueden quedar no disponibles para las plantas. Por esta razón algunas plantas que crecen en suelos orgánicos, presentan carencia de ciertos elementos como el Cu<sup>2+</sup>, el cual es retenido irreversiblemente en el suelo (Mignorange, 2010).

- **Efecto de la materia orgánica sobre Zn y Mn.** La cantidad de materia orgánica afecta la biodisponibilidad de  $Zn^{2+}$ . Sin embargo, mientras el  $Zn^{2+}$  forma fácilmente complejos con la materia orgánica, no es tan buen competidor por estos sitios como  $Cu^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  (Fotovat y col., 1997). Por otra parte, el Mn tiende a formar complejos de coordinación con la materia orgánica de carácter débil, siendo incapaz de competir efectivamente con el  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  u otros iones como  $Ca^{2+}$  o  $Mg^{2+}$  por los sitios de coordinación con la materia orgánica.

### 1.2.6.3 Efecto de los minerales de arcilla.

Los minerales de arcilla surgen de la meteorización de las rocas e influyen significativamente en las propiedades químicas y físicas del suelo. Junto a otros minerales representan la mayor parte de la fracción inorgánica del suelo. Los minerales de arcilla se subdividen en cinco grupos: caolinita, esmectita, illita, clorita y vermiculita.

Aunque contienen metales dentro de sus estructuras, los minerales de arcilla son importantes en el comportamiento de los metales traza, debido principalmente a su alta área superficial y a la presencia de cargas negativas en su superficie o en el espacio interlaminar.

Estas características de los minerales de las arcillas le confieren a los suelos la capacidad de retener elementos catiónicos, disminuyendo su solubilidad y biodisponibilidad (Kabata-Pendias, 2000).

La capacidad de adsorción de los metales a la fase sólida está directamente relacionado con la capacidad de intercambio catiónico (CIC) del suelo y por lo general, a mayor CIC, mayor es la cantidad de ion adsorbido. La CIC es dependiente de cada tipo de arcilla y por lo tanto de acuerdo a esto varía el grado de retención de los cationes metálicos en el suelo.

La gran área superficial que poseen las arcillas y la sustitución isomorfica de  $Al^{3+}$  por el  $Si^{4+}$  ya sea en capas tetraédricas o octaédricas, crea un déficit de cargas positivas o sitios de carga negativa sin neutralizar, el cual es balanceado por cationes en el espacio interlaminar, tal como muestra la Figura 3.

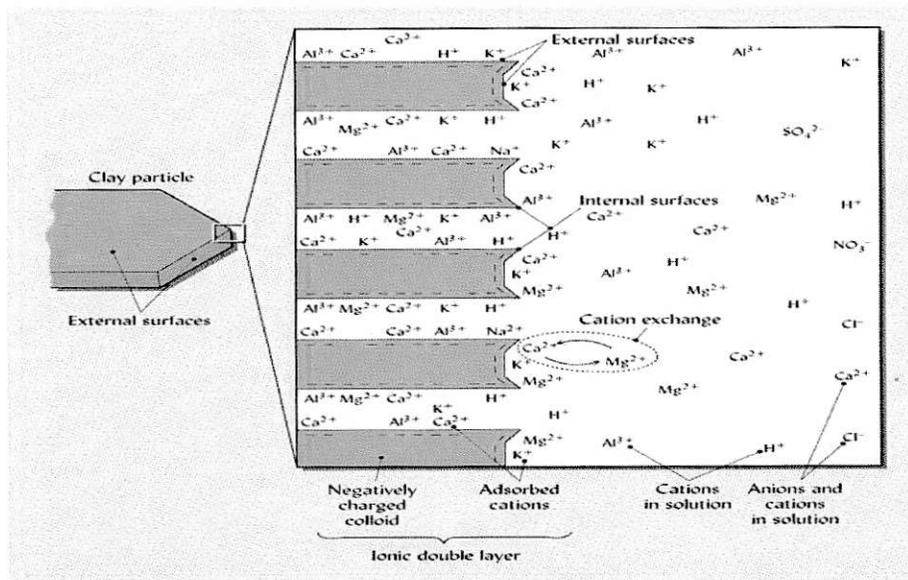


Figura 2: Representación esquemática de un cristal de arcilla de silicato. (Micela).

#### 1.2.6.4 Efecto de la presencia de óxidos de aluminio, hierro y manganeso en el suelo.

En el suelo existen distintos tipos de óxidos metálicos como los de titanio, silicio, hierro, manganeso y aluminio. Los tres últimos son los más importantes en la retención de elementos traza metálicos (Uchimiya, y col. 2010; Dijkstra y col. 2004). Los óxidos hidratados de Fe, Mn y Al se encuentran en la fracción fina de la arcilla ( $\leq 0,002$  mm) y suelen mezclarse con los minerales de arcilla, adsorbiendo metales traza en forma específica y determinando su biodisponibilidad (Miller, y col. 1987).

También los óxidos de Al, Fe y Mn presentan intercambio catiónico ya que, dependiendo del pH pueden tener carga negativa o positiva en su superficie (Basta y Tabatabai, 1992). Los más abundantes son los óxidos de hierro y pueden

adsorber metales traza como Co, Cr, Mn, Mo, Ni, V y Zn (Chakraborty, y col. 2010; Gu y col. 1994).

Los óxidos hidratados de Fe y Mn influyen la solubilidad de Cd, Cu, Pb y Zn; los óxidos de Mn en particular presentan una fuerte afinidad por la adsorción de Pb y, probablemente, en menor grado por la adsorción de Cd (Rieuwerts, y col. 1998).

La carga eléctrica de los óxidos de Fe y Mn surge principalmente de la adsorción y liberación de iones  $H^+$  de los átomos de oxígeno entre el mineral y la solución suelo. Los óxi-hidroxidos presentan características anfóteras y pueden llevar cargas positivas y negativas pero la carga superficial neta está alrededor del punto de carga cero a determinados valores de pH. Este punto de carga cero está para la mayoría de los óxidos de Fe entre pH 7,0 y 8,5 y para los óxidos de Mn entre pH 1,5 y 4,6.

#### **1.2.6.5 Suelos con Carbonatos.**

Las principales fuentes de carbonatos son la calcita [ $CaCO_3$ ], la dolomita [ $CaMg(CO_3)_2$ ], y el yeso [ $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ ]. La calcita representa la forma relativamente más lábil de los carbonatos de calcio presentes en el suelo, aumentando el pH y por lo tanto, modificando el comportamiento de los metales traza en los suelos (Xu y Saiers, 2010; Woodruff y Cannon, 2010).

Los elementos traza pueden coprecipitar con los carbonatos incorporándose en su estructura o adsorbiéndose en los óxidos de hierro y manganeso o en otras partículas del suelo precipitadas sobre los carbonatos (Woodruff y Cannon, 2010). Se ha demostrado la gran afinidad de elementos como el Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, U y Zn, por los carbonatos. Estos procesos son comúnmente observados en suelos contaminados con metales.

#### **1.2.6.6 Efecto del potencial redox del suelo.**

El potencial redox es una propiedad relacionada con la transferencia de electrones. Algunos elementos traza metálicos como el Cu, Cr, Fe, Mn y Hg se encuentran en diferentes estados de oxidación dependiendo del potencial redox del suelo. Las condiciones de óxido-reducción del suelo, tienen por lo general estrecha relación con el pH, influyendo considerablemente en la solubilidad de sus especies químicas (Xu y Saiers, 2010; Woodruff & Cannon, 2010).

Las formas oxidadas de los metales generalmente son mucho menos solubles que las formas reducidas. Los ETMs como Cu, Cr, Fe y Mn por lo general son más móviles, biodisponibles y pueden aumentar su toxicidad en condiciones reductoras (Alloway, 1995; Kabata-Pendias, 2000; Reichmann, 2002). Estas condiciones reductoras se presentan en suelos compactados e inundados, que tienen poca aireación, provocando la disolución de óxidos y, por consiguiente, la liberación de los metales adsorbidos (Tandy, y col. 2004; Alloway, 1995).

#### **1.2.7 Efecto de agentes quelantes en la biodisponibilidad de metales.**

Los iones metálicos pueden formar complejos de esfera interna con ligandos que se encuentren en el suelo. Esta formación se produce cuando un ligando con dos átomos es capaz de formar una unión fuerte con un catión no hidratado. Si dos o más grupos funcionales de un mismo ligando están coordinados a un catión metálico en un complejo, este recibe el nombre de agente quelante o quelato (Sposito, 1989).

Las plantas en forma natural secretan agentes quelantes para movilizar micronutrientes, particularmente el Fe. La quelación tiene una gran importancia en la nutrición vegetal, debido a que puede aumentar la solubilidad de los metales, afectando la biodisponibilidad de estos para las plantas, por lo que su uso puede proveer a la planta micronutrientes como Cu, Mn y Zn.

Algunos ejemplos de agentes quelantes naturales son los ácidos de baja masa molar (LMWOA) como el ácido cítrico, el ácido málico, el ácido tartárico y el ácido gálico. Muchos de estos ácidos son liberados naturalmente por las plantas y microorganismos de la rizosfera, para aumentar la solubilidad de los nutrientes minerales por acidificación y formación de complejos orgánicos minerales (Wasay et al. 2000).

Muchos otros compuestos naturales como las sustancias húmicas, ácidos lignosulfónicos, poliflavonoides, algunos aminoácidos, algunos polisacáridos y algunos polialcoholes también pueden tener propiedades quelantes.

#### 1.2.7.1 Ácido cítrico como agente quelante

El ácido cítrico es un agente efectivo en solubilizar componentes minerales (Stevenson, 1994), forma quelatos estables, asimilables y fitocompatibles con la mayoría de los cationes metálicos. Las constantes de estabilidad para los quelatos de ácido cítrico para el Cu, Mn y Zn se muestran en la Tabla 1. Cuando en un sistema hay más de un metal presente, se formará primero el quelato cuya constante de estabilidad sea mayor.

**Tabla 1:** Constante de estabilidad (Log K) de los quelatos del ácido cítrico (Barton L., 2006).

Metal	Estado de oxidación	Constante de estabilidad log K para el quelato con ácido cítrico
Cu	+2	5,9
Mn	+2	4,2
Zn	+2	5,0

Sin embargo este equilibrio dependerá de las concentraciones relativas de metales, las características físicas y químicas del suelo, así como de las fracciones a la cuales se encuentra asociado cada metal, de acuerdo a los antecedentes presentados en secciones anteriores.

### **1.3 Hipótesis**

La adición de ácido cítrico como agente quelante aumentará la concentración de Mn por sobre las de Cu y Zn en las hojas de las lechugas, ya que estos dos últimos metales se encuentran en menor concentración en el suelo y además se asocian a fracciones que presentan una menor movilidad para los metales.

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 Objetivo general**

Estudiar el comportamiento del Cu, el Mn y el Zn en tres suelos agrícolas, de diferente composición y cercanos a relaves mineros; identificando a que fracciones del suelo se encuentran asociados, evaluando la movilidad que presentan cuando se aplica el ácido cítrico como agente quelante en el cultivo de lechugas y como la composición de cada suelo influye en la absorción de estos micronutrientes.

#### **1.4.2 Objetivos Específicos**

- Establecer las principales características de los suelos, en cuanto a textura y contenido de arcillas, pH, conductividad eléctrica, contenido de materia orgánica y contenido de nutrientes.
- Determinar el contenido total de Cu, Mn y Zn en los tres suelos y el porcentaje de estos metales asociado a cada fracción del suelo mediante una extracción secuencial de metales en suelos.
- Establecer una relación entre la composición de cada suelo en cuanto a textura y la extracción secuencial.
- Determinar el contenido total de Cu, Mn y Zn y hojas y raíces de lechugas del tipo *Lactuca Sativa* L cultivadas en los suelos de estudio.
- Establecer si existe relación entre los resultados de la extracción secuencial de Cu, Mn y Zn y la absorción de estos metales por las plantas de lechuga.
- Establecer si existe un efecto del ácido cítrico como agente quelante de Cu, Mn y Zn en el cultivo de plantas de lechuga tratadas con este agente quelante (*Lactuca sativa* L).

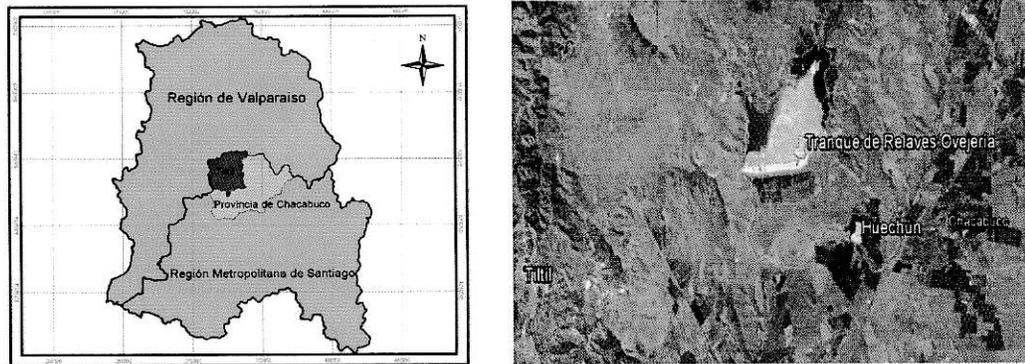
- Determinar el factor de bioacumulación de metales en plantas de lechuga mediante la determinación del contenido de Cu, Mn y Zn en hoja y raíz.

Determinar la posible influencia de la cercanía del relave en los niveles de Cu, Mn y Zn encontrados.

## II. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Obtención y tratamiento de muestras

El estudio se realizó con suelos colectados de tres puntos de la localidad de Huechún (19 UTM 0334079 o; 6338590 s. 576 m.s.n.m.) (Comuna de TilTil, Región Metropolitana), vecina al tranque de relaves mineros Ovejería (Figura 1).



**Figura 3:** Localidad de Huechún y cercanía con el Tranque de relaves.

Este tranque está en operaciones desde el año 1990 y está ubicado aproximadamente a 5,0 km de la comunidad de Huechún. Ocupa alrededor de unas 850 ha (19% de su capacidad) y recibe diariamente unas 90000 ton/día de relaves. En Huechún hay suelos de uso agrícola destinados principalmente al cultivo de viñas, ciruelos y nogales, que podrían verse afectados por la cercanía al relave.

Considerando que los suelos no contaminados de la Zona Central presentan naturalmente altas concentraciones de Mn en comparación a Cu y Zn, se espera poder observar si la concentración incide en forma importante en el factor de bioacumulación de los tres metales en cultivos de lechugas tratadas con ácido cítrico.

Dado que los suelos escogidos contienen diferentes porcentajes de arcilla y materia orgánica, se espera además evaluar el efecto relativo de estos parámetros en la biodisponibilidad de Cu, Mn y Zn.

Los suelos se colectaron en tres zonas de la localidad de Huechún que se denominaron Nogales, Ciruelos y Barbecho. Nogales es un terreno plano, cultivado con nogales; Ciruelos es un sector plano cultivado con ciruelos y Barbecho es un sector plano o semi plano, en situación de barbecho o sin cultivo de al menos 1 año (el terreno no presenta vegetación).

Cada muestra de suelo compuesta (muestra de suelo obtenida por la extracción de 12 muestras simples o submuestras y homogenizadas en un recipiente) es representativa de los primeros 10 cm de cada zona de muestreo.

Las muestras de suelo fueron trasladadas al Laboratorio de Química de Suelos y Aguas (Facultad de Ciencias Agronómicas, U. de Chile), en donde se secaron al aire y fueron tamizadas a 2,00 mm según los procedimientos para análisis de suelos de Chile (Sadzawka y col. 2006). Posteriormente las muestras de suelo fueron almacenadas en contenedores plásticos para el posterior análisis químico.

## **2.2 Reactivos y materiales.**

### **2.2.1 Equipos y materiales**

- Balanza Analítica Precisa 125 A Swiss Quality
- Conductivímetro OAKTON CON 510 Series UV HACH DR5000
- Agitador Orbital Gerhardt
- pH metro HANNA HI 3222
- Bomba de vacío conectada a un conjunto de envases para vacío con embudos Buchner.
- Autoclave HL30e

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica (EAA) Perkin Elmer 3110
- Espectrofotómetro HACH DR 5000 rango visible con cubetas de 10 mm de paso de luz
- Destilador por arrastre de vapor
- Centrifuga MLW T54
- Baño María Kettermann
- Microbureta digital Brand 50 mL
- Tubos para centrifuga de 40 mL
- Matraces Erlenmeyer
- Recipientes plásticos
- Probetas
- Frascos de vidrio con tapa rosca Duran Shott 50 mL resistentes a 180°C
- Bolitas de vidrio
- Tubos portamuestras de 15 y 50 mL
- Micropipeta y puntas de 5 mL
- Vaso precipitado de 100 mL
- Matraces de aforo
- Embudos
- Papel secante
- Espátula
- 24 Macetas de 1L
- Perlita

### **2.2.2 Reactivos**

- Ácido ascórbico (Lot: 1156700, Merck).
- Ácido nítrico, HNO<sub>3</sub> concentrado (Lot: 1557700, Merck).
- Ácido sulfúrico concentrado (96%, d=1,84) (Lot: 156700, Merck).

- Aleación de Davarda (50% Cu, 45% Al y 5% Zn) (Lot: 13700, Sigma Aldrich).
- Carbón activado(Lot: 0986700, Merck).
- Oxido de magnesio(Lot: 0786700, Merck).
- Peróxido de hidrógeno 30%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%(Lot: 1346700, Merck).
- Solución de acetato sódico 1M (a pH 5 con ácido acético)
- Solución de ácido acético 25%(Lot: 456700, Merck).
- Solución de ácido bórico-indicador (Lot: 67700, Merck).
- Solución de ácido cítrico 4 g/L (Lot: 78900, Merck).
- Solución de ácido sulfúrico 0,001 M (Lot: 156700, Merck).
- Solución de ácido sulfúrico 2,5 M (Lot: 156700, Merck).
- Solución de bicarbonato de sodio, NaHCO<sub>3</sub> 0,5 M a pH 8,5 (Lot: 1464000, Merck).
- Solución de clorhidrato de hidroxilamina 0,04M (Lot: 456700, Merck).
- Solución de cloruro de Magnesio 1 M (Lot: 1456700, Merck).
- Solución de cloruro de potasio 2 M (Lot: 4556700, Merck).
- Solución de dicromato de Sodio 0,5 M (Lot: 4456700, Merck).
- Solución de hidróxido de Sodio, NaOH 0,1 M (Lot: 56700, Merck).
- Solución de pirofosfato de Sodio 0,08M (Lot: 55670, Merck).
- Solución o reactivo mezclado (Molibdato de amonio y tartrato de potasio y amonio) (Lot: 456700, Sigma Aldrich).
- Soluciones estándar de Sacarosa 100 mg/mL (Lot: 45400, Merck).
- Soluciones estándares de fosforo: 0,0–0,1–0,2–0,5–1,0–2,5 y 5,0 mg/L de P. (Lot: 456700, Merck).
- Soluciones estándares de sacarosa de 0-10-20-30-40-50 mg de C por 1 mL de solución. (Lot: 656700, Merck).

### 2.3 Análisis de Suelos.

A continuación se detallan los procedimientos utilizados para la determinación de pH, conductividad eléctrica, contenido de materia orgánica, textura del suelo, concentración total de Cu, Mn y Zn; y extracción secuencial.

### **2.3.1 Determinación de pH**

Suspensión y determinación potenciométrica (Sadzawka y col., 2006): Se masó en balanza analítica 20 g (exactitud 1 g) de muestra de suelos seca al aire y < 2mm en un recipiente de 100 mL y se agregó 50 mL de agua destilada. Se agitó vigorosamente la suspensión durante 5 minutos usando un agitador orbital. Luego se dejó reposar el extracto durante 2 horas. Posteriormente, se agitó la suspensión e inmediatamente se determinó el valor del pH mediante un electrodo (HANNA HI 3222).

### **2.3.2 Conductividad eléctrica**

Extracto de saturación y determinación por conductivimetría (Sadzawka y col., 2006):: Se colocó entre 100 g y 200 g de muestra seca al aire y <2,0 mm en un vaso plástico de 150 mL con tapa, incluyendo 2 envases con 50 mL de agua como blancos. Se agregó agua suficiente hasta alcanzar el punto de saturación. Los criterios para este punto son: cuando se golpea al vaso contra el mesón no debe acumularse agua en la superficie, además la pasta debe brillar por el reflejo de la luz y debe fluir lentamente cuando el vaso se inclina. Alcanzado el punto de saturación se tapó el vaso y se dejó reposar durante la noche. Al día siguiente, se chequeó el punto de saturación de la pasta y se ajustaron las condiciones agregando suelo o agua según corresponda. Luego se transfirió la pasta a un embudo Buchner provisto de un disco de papel filtro. Se aplicó vacío y se colectó el filtrado en un matraz de 100 mL en donde se determinó la conductividad eléctrica directamente mediante un conductivímetro. Este método proporciona la medida más representativa del total de sales solubles en el suelo debido a que se relaciona estrechamente con los contenidos de agua del suelo bajo condiciones de campo. (Sadzawka y col., 2006).

### **2.3.3 Contenido de materia orgánica**

Oxidación con dicromato en medio ácido y determinación colorimétrica del cromo (III) (Sadzawka y col., 2006): El método consiste en una oxidación de la materia orgánica con una mezcla de dicromato de sodio y ácido sulfúrico. Después de la reacción de la oxidación de la materia orgánica se mide coloriméricamente el cromo (III), en un espectrofotómetro contrarrestando con una curva de sacarosa. Este método actúa sobre las formas más activas del carbono orgánico que posee el suelo y no produce una oxidación completa de dichos compuestos, por lo que se deben hacer ajustes a los resultados obtenidos en el laboratorio, cuando se quieren expresar en términos de contenido de materia orgánica.

Para ello, se masó en una balanza analítica entre 1 g y 2 g (exactitud 0,01) de muestra de suelo seca al aire y < 2,0 mm en un matraz Erlenmeyer de 150 mL, incluyendo un blanco y seis matraces con 1 mL de la serie de estándares de sacarosa. Se agregó 10 mL de solución de dicromato de sodio 0,5 M y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitando la suspensión para evitar puntos localizados de ebullición. Se dejó reposar los matraces sobre una plancha aislante, bajo campana durante 30 minutos. Luego, se agregó 70 mL de agua destilada. Se mezcló y dejó reposar durante la noche. Finalmente, se leyó la absorbancia del sobrenadante claro a 600 nm en el espectrofotómetro UV (HACH DR 5000).

### **2.3.4 Textura del suelo**

Hidrómetro de bouyoucous (Bouyoucous G., 1962): El método del hidrómetro implica la dispersión de las partículas de suelo con pirofosfato de sodio. Para ello, se masó 50 g (exactitud 0,1 g) de muestra de suelo seca y <2 mm en un vaso de vidrio de 400-600 mL. Se agregó alrededor de 100 mL de agua destilada y 100 mL de la solución dispersante de pirofosfato de sodio 0,08 M.

Se agitó vigorosamente y se transfirió cuantitativamente a una probeta de sedimentación y diluyó a 1L. Se mezcló bien usando una varilla de vidrio, 10 veces. Luego, inmediatamente se introduce el hidrómetro y se registra su lectura a los 40 segundos y a las 2 horas de terminada la agitación. Utilizando la ley de Stokes, se determina la cantidad de arena, limo y arcilla presente por la velocidad a la que cada una de ellas decanta en base a su tamaño.

### **2.3.5 Determinación de Nitrógeno disponible**

Extracción con cloruro de potasio 2 M, destilación de  $\text{NH}_3$  y determinación por titulación (Sadzawka y col.. 2006): Se masó 5 g de muestra seca al aire y <2 mm (exactitud 0,01) en balanza analítica en un frasco plástico de 150 mL. Se agregó 150 mL de solución de KCl 2 M y se agitó durante 1 hora. Luego se dejó sedimentar 30 minutos. Se agregó 5 mL de la solución de ácido bórico-indicador a un matraz erlenmeyer de 50 mL marcado a los 20 mL y se colocó bajo del condensador del destilador de manera que el extremo del condensador quede bajo la superficie de la solución. Posteriormente, se agregó 0,2 g de MgO y 0,2 g de aleación de Devarda. Se conectó el matraz al destilador por arrastre de vapor para comenzar la destilación. Cuando el destilado alcanzó los 20 mL, se retiró el matraz y se tituló con la solución de ácido sulfúrico 0,001M hasta el cambio de color de verde a rosado.

### **2.3.6 Determinación de fósforo disponible**

Extracción con solución de bicarbonato de sodio 0,5 M a pH 8,5 y determinación colorimétrica del azul de molibdeno (Sadzawka y col.. 2006): Se masó 2,5 g en balanza analítica (exactitud 0,01 g) de muestra seca al aire y < 2,0 mm en frascos de plástico de 150 mL y se agregó 0,3 g de carbón activado. Luego se agregó 50 mL de la solución de bicarbonato de sodio 0,5 M. Se tapó los frascos y se agitaron

por 30 minutos en un agitador orbital. Inmediatamente después de la agitación se filtro a través de un papel filtro. Lentamente se agregó 20 mL del reactivo para el desarrollo de color, agitando suavemente para liberar el CO<sub>2</sub>. Se dejó reposar por 60 min y se leyó la absorbancia contra agua a 880 nm.

### **2.3.7 Determinación de potasio disponible**

Extracción con solución de acetato de amonio 1 M a pH 7,0 y determinación por espectrofotometría de emisión atómica con lantano (Sadzawka y col., 2006):

Se masó 5 g en balanza analítica (exactitud 0,01 g) de muestra seca al aire y <2,0 mm en un frasco plástico de 150 mL. Se agregó 50 mL de solución de acetato de amonio 1 M. Se agitó los frascos por 30 minutos en un agitador orbital y se filtro con papel filtro. Se mezcló 1 mL del filtrado con 9 mL de solución de lantano 1,1 g/L. La concentración de potasio se determinó directamente por EAA mediante emisión.

### **2.3.8 Determinación de concentración total de Cu, Mn y Zn en suelos**

Digestión Ácida: A 0,500 g de suelo finamente tamizado (0,5 mm) se le adicionó 4 mL de agua destilada, 6 mL de ácido nítrico y 4 mL de peróxido de hidrógeno 30% y se dejó reaccionar durante la noche bajo campana de extracción en frascos de reacción con tapa rosca resistentes a 180°C. La digestión se realizó mediante un autoclave a 1,5 kg/cm<sup>2</sup> por 40 minutos. Posteriormente se filtró el sobrenadante y se enrasó a 50 mL en matraces de aforo. La concentración total de los ETMs se determinó directamente del filtrado por Espectroscopia de Absorción Atómica (EAA) (Ascar y col. 2008; Moreno y col. 2008, Moreno 2010).

## **2.4 Extracción secuencial de metales del suelo**

Las muestras de suelo de las zonas Nogales, Ciruelos y Barbecho se secaron al aire y posteriormente fueron tamizadas (0,500 mm). Para cada zona de suelo se masó 2,00 g y se siguió la metodología basada en Tessier y col. 1979.

#### **2.4.1 Fracción soluble intercambiable**

A los 2 g de suelo en tubos de centrifuga se adicionaron 16 mL de  $MgCl_2$  1M a pH 7 y temperatura ambiente. Se agitó durante 30 minutos en una centrifuga a 2000 rpm por 10 minutos. Se determinó la concentración de Cu, Mn y Zn mediante EAA.

#### **2.4.2 Fracción asociada a los carbonatos**

Al residuo se le realizó una extracción con 16 mL de acetato sódico 1M (tamponado a pH 5 con ácido acético) a temperatura ambiente y con agitación continua por 5 h. Posteriormente se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos y en el sobrenadante se determinó la concentración de Cu, Mn y Zn mediante EAA.

#### **2.4.3 Fracción asociada a los óxidos de hierro y manganeso:**

Al residuo anterior se le añadió 40 mL de clorhidrato de hidroxilamina 0,04 M en ácido acético al 25%. La extracción se realizó en baño de agua a 96°C durante 6 h (tiempo estimado para la disolución de óxidos de hierro libres). Es necesaria la agitación periódica. Finalmente se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos y al sobrenadante se determinó la concentración de Cu, Mn y Zn mediante EAA.

#### **2.4.4 Fracción asociada a la materia orgánica:**

Para la oxidación de la materia orgánica se le adicionó al residuo anterior 6 mL de  $HNO_3$  0,02M y 10 mL de  $H_2O_2$  al 30% con agitación periódica, en baño de agua a 85°C durante 5 horas. Posteriormente, se realizó la extracción de los metales con 10 mL  $NH_4Oac$  3,2 M en  $HNO_3$  al 20% con agitación continua durante 30 min. La solución se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se aforó a 50 mL y se determinó la concentración de Cu, Mn y Zn mediante EAA.



#### **2.4.5 Fracción residual:**

Digestión ácida: (Ascar y col. 2008; Moreno y col. 2008, Moreno 2010) A las muestras de suelo se les adicionó 4 mL de agua destilada, 6 mL de ácido nítrico y 4 mL de peróxido de hidrogeno 30% y se dejó reaccionar durante la noche bajo campana de extracción en frascos de reacción con tapa rosca resistentes a 180°C. La digestión se realizó mediante un autoclave a 1,5 kg/cm<sup>2</sup> por 40 minutos. Posteriormente se filtró el sobrenadante y se enrasó a 50 mL en matraces de aforo. La concentración total de los ETM se determinó directamente del filtrado mediante EAA.

### **2.5 Análisis de muestras vegetales**

#### **2.5.1 Cultivo y tratamiento de lechugas**

Para el ensayo en invernadero, se utilizó 24 macetas de 1 L. En cada una de ellas se mezcló los suelos con un 10% de perlita, de manera de mejorar la aireación e infiltración de los suelos. Se trasplantó 8 lechugas (de un mes de crecimiento en almácigo) para cada suelo (Nogales, Ciruelos, y Barbecho) con cuatro repeticiones de cada uno (Figura 2). Las plantas fueron mantenidas 4 semanas con riego con agua potable a capacidad de campo antes de iniciar los tratamientos. Las condiciones de Temperatura y humedad estuvieron dadas por las condiciones climáticas en exterior. Los tratamientos de riego fueron los siguientes:

**Tratamiento control (T0):** Riego con 250 ml de agua potable por maceta, 3 veces a la semana, durante 8 semanas.

**Tratamiento con Ácido Cítrico (T1):** Riego con disolución de ácido cítrico 4 g/L, 3 veces por semana, durante las últimas 8 semanas.



**Figura 4 :** Ensayo de aplicación de ácido cítrico en plantas de lechuga cultivadas en macetas con los suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho.

### **2.5.2 Preparación de la muestra para análisis:**

Los tejidos vegetales (raíz y hoja) fueron lavados con abundante agua potable y luego con agua destilada tres veces. Posteriormente, las muestras se secaron en bolsas de papel a  $67^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  en estufas con aire forzado por 24 horas. Las muestras secas fueron molidas y homogenizadas para su posterior almacenaje y análisis

### **2.5.3 Determinación de concentración total de Cu, Mn y Zn en hoja y raíz**

Digestión ácida: (Ascar y col. 2008; Moreno y col. 2008, Moreno 2010) A las muestras vegetales (0,5 g) se les adicionó 5 mL de agua destilada, 3 mL de ácido nítrico y 2 mL de peróxido de hidrógeno 30% y se dejó reaccionar durante la noche bajo campana de extracción en frascos de reacción con tapa rosca resistentes a  $180^{\circ}\text{C}$ . La digestión se realizó mediante un autoclave a  $1 \text{ kg/cm}^2$  por 40 minutos.

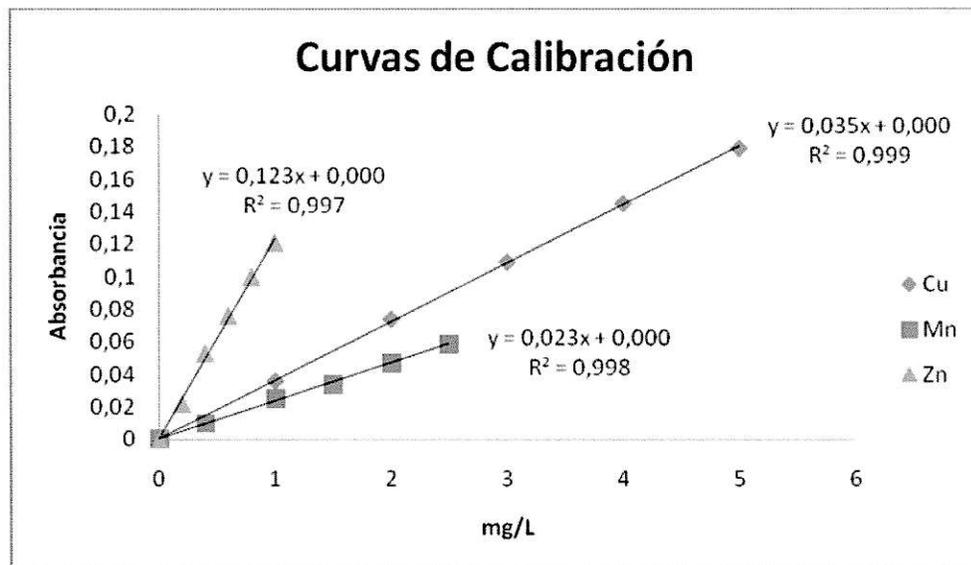
Posteriormente se filtró el sobrenadante y se enrasó a 50 mL en matraces de aforo. La concentración total de los ETMs se determinó directamente del filtrado por EAA .

## 2.6 Curvas de Calibración para la determinación de metales por EAA

La tabla 2 presenta las concentraciones utilizadas para cada elemento en la realización de las curvas de calibración utilizadas para la determinación de Cu, Mn y Zn en suelos, hojas y raíces por EAA.

**Tabla 2:** Curvas de calibración para Cu, Mn y Zn.

mg/L Cu	Abs	mg/L Mn	Abs	mg/L Zn	Abs
0	0	0	0	0	0
1	0,036	0,4	0,01	0,2	0,022
2	0,074	1	0,025	0,4	0,053
3	0,109	1,5	0,034	0,6	0,076
4	0,145	2	0,047	0,8	0,1
5	0,179	2,5	0,059	1	0,121



**Figura 5:** Curva de calibración para Cu, Mn y Zn

## 2.7 Análisis estadístico

Para la determinación de la extracción secuencial y la concentración total de metales, se realizaron 3 repeticiones de las mediciones de cada una de las muestras pertenecientes a cada suelo (Nogales, Ciruelos y Barbecho). Para el análisis en plantas, cada muestra corresponderá a una muestra homogénea tanto de hoja como de raíz, de cada uno de los tratamientos para cada suelo. A su vez, el resultado es el promedio de 3 mediciones.

Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico InfoStat (Version 2014e). Los promedios de los resultados fueron comparados usando ANOVA de un factor. Para evaluar las diferencias significativas se utilizó el test de Tuckey con una significación  $p \geq 0,05$  mediante el promedio y la desviación estándar.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Caracterización de los suelos.

En Tabla 3 se presentan los resultados correspondientes a la caracterización de los tres suelos en cuanto a textura, pH, conductividad eléctrica ( $\text{dS m}^{-1}$   $25^{\circ}\text{C}$ ), contenido de carbono orgánico fácilmente oxidable (%), nitrógeno disponible, potasio disponible y fósforo disponible ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) en los tres suelos.

**Tabla 3:** Textura, pH, conductividad eléctrica ( $\text{dS m}^{-1}$   $25^{\circ}\text{C}$ ), contenido de materia orgánica oxidable (%), nitrógeno disponible, potasio disponible y fósforo disponible ( $\text{mgkg}^{-1}$ ) en tres suelos agrícolas (Nogales, Ciruelos y Barbecho).

	Nogales			Ciruelos			Barbecho			Recomendado <sup>2</sup>
%:Arcilla(A); Limo(L); Arena(a)	A	L	a	A	L	a	A	L	a	
	35	33	32	48	20	32	26	48	24	
Textura	FA <sup>1</sup>			A			F			
pH	7,1			7,2			7,3			6,6 - 7,3
Conductividad eléctrica ( $\text{dS m}^{-1}$ $25^{\circ}\text{C}$ )	3,80			2,52			1,56			1,0 - 2,5
Materia orgánica total (%)	4,3			1,4			1,8			1,6 - 3,5
N disp ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	42,6			51,8			31,1			21 - 35
P disp ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	23			13			7			10 - 20
K disp ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	176			83			40			100 - 180

<sup>1</sup>FA: franco arcillosa; A: arcillosa; F: franca, según la USDA.

<sup>2</sup>Bernier V., (2000): Diagnostico de la fertilidad de un suelo. INIA

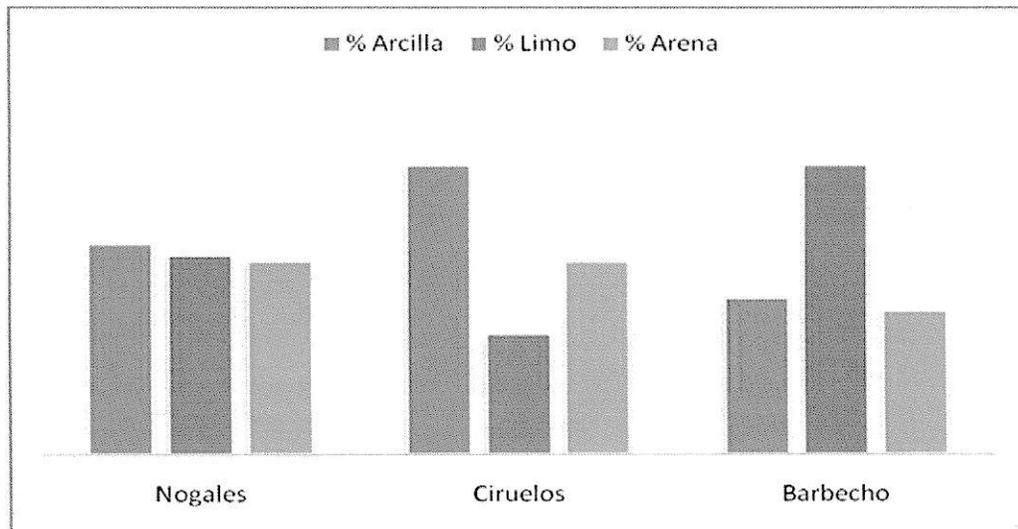
En los resultados obtenidos del análisis de textura (Figura 5), se puede apreciar que solo Ciruelos presenta un suelo arcilloso, otorgado principalmente por el alto porcentaje de arcilla presente (48%), haciendo de este un suelo compacto y de lenta infiltración.

Por el contrario, Barbecho presenta un alto contenido de Limo (48%) y proporciones equilibradas de arena y arcilla, lo que lo hace predecir mejores

condiciones de aireación y menor compactación. Este suelo tal como se espera (situación de barbecho) está en condiciones óptimas para iniciar un cultivo.

Por otra parte, Nogales, presenta una textura equilibrada en cuanto a los porcentajes de arena, limo y arcilla, otorgándole características de un suelo franco arcilloso y encontrándose en una situación intermedia a los otros dos suelos.

En cuanto a la retención de cationes metálicos, entre ellos el Cu, Mn y Zn, se espera que el alto porcentaje de arcilla presente en el suelo Ciruelos interactúe y retenga un mayor número de estas especies cargadas, así como también de iones como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , y  $\text{K}^+$  en su superficie, comparado con los otros dos suelos.

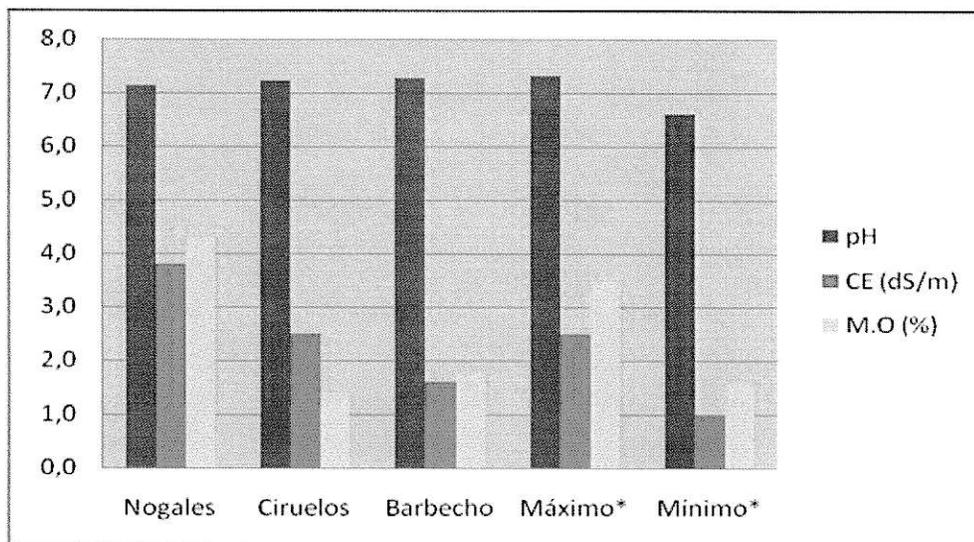


**Figura 6:** Porcentajes de arena, limo y arcilla para los suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho.

En general la bibliografía señala que los suelos del valle de Huechún presentan una influencia aluvial marcada y desarrollan suelos de textura fina; que corresponden principalmente a suelos arcillosos, pesados y de lenta infiltración (CIREN, 1996).

En relación al pH (Figura 6), los tres suelos presentan valores cercanos al neutro, levemente alcalinos, pero en general, dentro de lo valores recomendados.

La conductividad eléctrica en el extracto saturado fue la mayor para el suelo Nogales, acercándose a los niveles que indican salinidad, el cual es,  $4,0 \text{ dS m}^{-1}$  (Alloway, 1995)

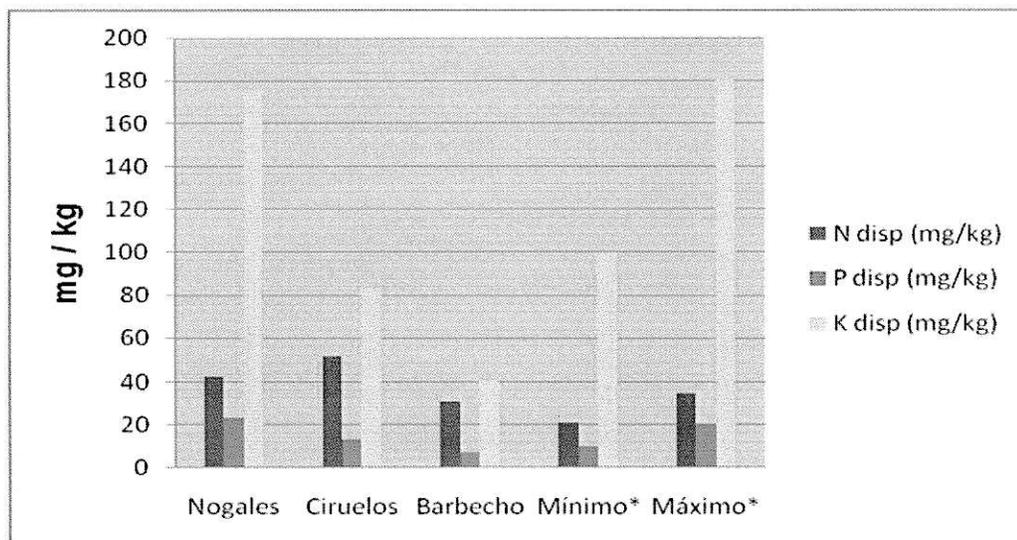


**Figura 7:** Valores de pH, conductividad eléctrica ( $\text{dS m}^{-1}$ ) y contenido de materia presente en los suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho. \*Máximos y mínimos recomendados por INIA.

El centro de información de recursos naturales, CIREN, obtuvo para esta serie de suelos (Huechún) un pH de 8,0 para los primeros 21 cm de suelo y una conductividad eléctrica menor a  $1,0 \text{ dS m}^{-1}$  para esta misma profundidad (CIREN., 1996). Probablemente un mayor nivel de potasio en el suelo Nogales (Figura 6), aumentó la conductividad eléctrica en este suelo.

El contenido de materia orgánica (%) fue mayor para el suelo Nogales (4,3%), alcanzando un contenido más alto de lo recomendado, mientras que en los suelos Ciruelos como Barbecho, se encuentran valores dentro de los niveles

recomendados, indicando además que en Nogales exista un número mayor de coloides orgánicos que están reteniendo a los metales y otros cationes.



**Figura 8:** Contenido de N, P y K disponible ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho, además de los niveles recomendados.

En cuanto a los valores de NPK disponible en cada suelo y los valores recomendados como máximos y mínimos (Figura 7), el contenido de nitrógeno disponible se encuentra ligeramente por sobre de los rangos medios para los tres suelos, mientras que el fósforo está en niveles medios para los suelos Nogales y Ciruelos, pero bajo lo recomendado para el suelo Barbecho. El potasio, se encuentra en niveles medios para el suelo Nogales y bajos para Ciruelos y Barbecho según lo recomendado por Bernier (Bernier y col., 2000).

Recientemente Ahumada y col., (2014) analizaron suelos agrícolas de Chile de la zona central, de características similares encontrando un rango de pH entre 6,8 y 8,3, mientras que Guerra y col., (2007) encontraron un contenido de materia orgánica entre 2,37 y 4,02% para esta misma clase de suelos, lo que indica que los

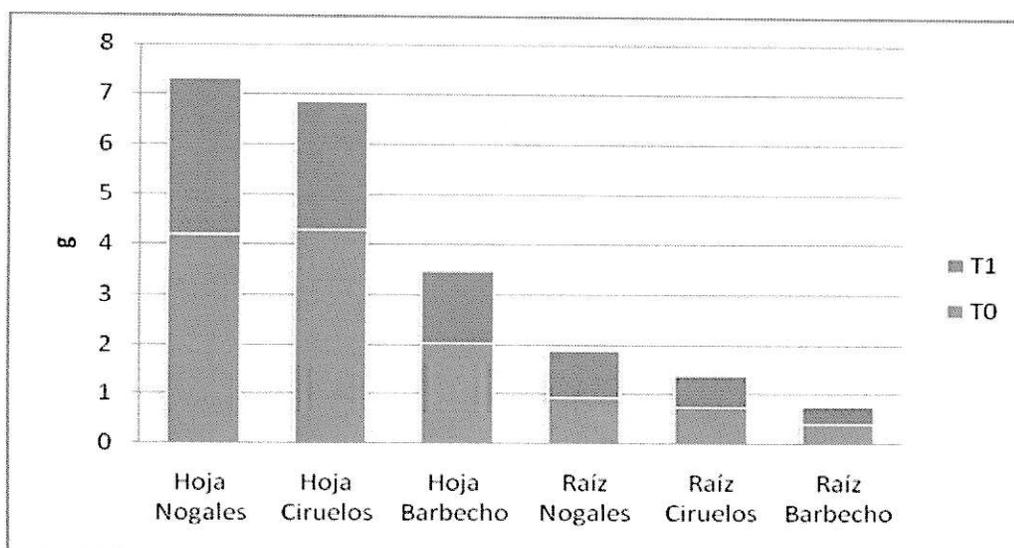
valores encontrados se encuentran dentro de los rangos esperados para estos suelos.

### **3.2 Efectos de las características del suelo en el crecimiento de hojas y raíces de *L. sativa***

Si se relaciona el contenido de NPK disponible encontrado en los suelos con la masa seca en gramos de las hojas y raíces de las lechugas cultivadas en cada suelo (Figura 7) se puede señalar que los bajos niveles de P y K disponible encontrados en el suelo Barbecho, tuvieron una implicancia directa en el crecimiento de las lechugas cultivadas en este suelo, a pesar de que en cuanto al nitrógeno disponible, éste se encontraba sobre el mínimo recomendado, lo que permite señalar que este suelo necesitará mayor fertilización de P y K.

Además, de los resultados se observa que el tratamiento con ácido cítrico no afectó mayormente al crecimiento de las raíces de las lechugas cultivadas en un mismo suelo, sin embargo, comparando las hojas de las lechugas en el mismo caso, se aprecia que el ácido cítrico provocó una disminución en el crecimiento de las hojas.

Comparando entre suelos, bajo tratamiento T0 se puede apreciar que las hojas y raíces de Nogales y Ciruelos presentaron un crecimiento similar y considerablemente mayor que Barbecho. Sin embargo, en el tratamiento T1, Nogales registró el mayor crecimiento en comparación con los otros dos suelos en hojas y raíces (Figura 8).

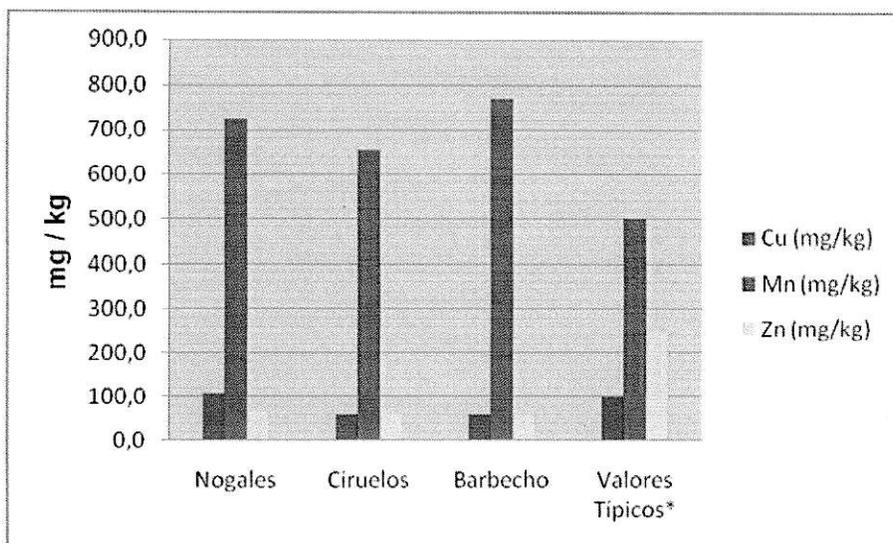


**Figura 9:** Masa seca (g) de las hojas y raíces de las lechugas cultivadas en suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho.

### 3.3 Concentración total de Cu, Mn y Zn.

Los resultados obtenidos de las concentraciones totales de Cu, Mn y Zn (Figura 9), muestran que la mayor concentración corresponde al Mn (entre  $655 \text{ mg kg}^{-1}$  y  $771 \text{ mg kg}^{-1}$ ), debido principalmente a que este metal forma parte de la composición del suelo, y sus concentraciones naturales en estos suelos, oscilan en esos rangos de concentraciones (Levinson., 1974).

La concentración de Cu fue la mayor para el suelo Nogales, incluso superando la concentración máxima permitida por la regulación chilena para suelos de uso agrícola antes de la aplicación de biosólidos, la cual indica un máximo de  $75 \text{ mg kg}^{-1}$  (DS-4 2009). Para los otros dos suelos el contenido fue bastante similar y dentro de los rangos encontrados por otros autores. (Ahumada y col., 2014)



**Figura 10:** Concentración total de Cu, Mn y Zn en suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho y valores típicos para suelos no contaminados\*.

La concentración de Zn también presentó niveles mayores en el suelo Nogales y similares en Ciruelos y Barbecho.

Según las directivas de Kelly referenciadas en un estudio de la Universidad de Chile y el SAG (U.de Chile-SAG, 2005), los valores típicos para suelos no contaminados señalan para Cu disponible  $0-100 \text{ mg kg}^{-1}$ , Mn total:  $0-500 \text{ mg kg}^{-1}$  y Zn total:  $0-250 \text{ mg kg}^{-1}$ . Por lo tanto, sólo el Mn presenta, niveles por sobre los valores típicos, y existiría una contaminación ligera en los tres suelos, sin embargo es necesario evaluar si el material parental es alto en niveles de Mn.

La concentración total crítica es definida como el rango de valores sobre los cuales la toxicidad pueda ocurrir. Kabata-Pendias (2000) consideraron los siguientes valores de concentraciones totales como críticos para los suelos: Cu:  $125 \text{ mg kg}^{-1}$ , Mn:  $3000 \text{ mg kg}^{-1}$  y Zn:  $400 \text{ mg kg}^{-1}$ . Se aprecia que los tres suelos estudiados presentan una concentración por debajo de los niveles críticos.

Ahumada y col., (2014) encontraron concentraciones totales para Cu entre 55 y  $141 \text{ mg kg}^{-1}$ , mientras que para Zn entre 26 y  $160 \text{ mg kg}^{-1}$  en suelos agrícolas de la

zona central de Chile. Por otro lado, Garrido y col., (2012), analizaron suelos agrícolas en Chile, cercanos a relaves mineros, encontrando para Cu, Mn y Zn valores de concentración total de 169, 1126 y 160 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente, mayores a los niveles encontrados en el presente estudio.

### **3.4 Extracción Secuencial de metales.**

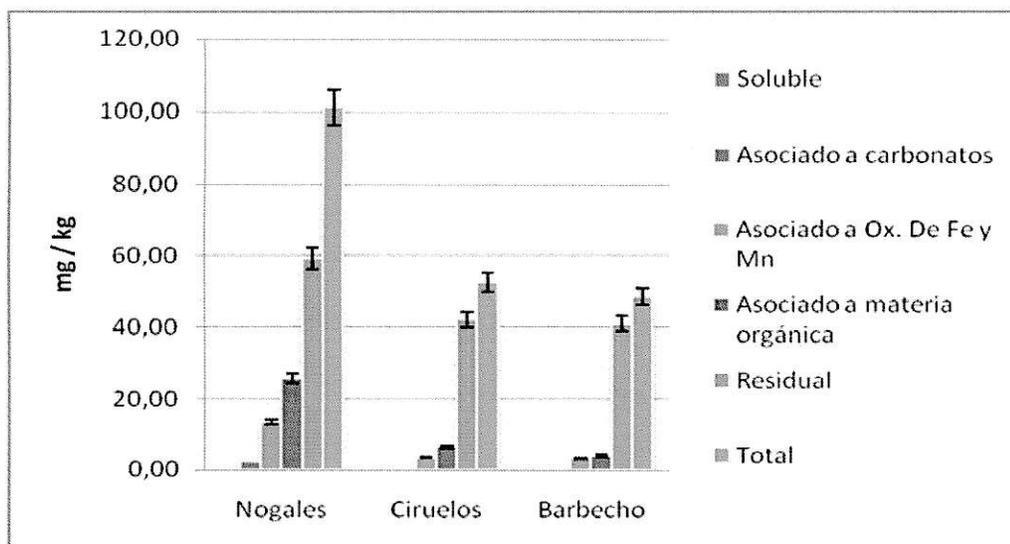
La extracción secuencial o fraccionamiento químico de Cu, Mn y Zn se realizó en los tres suelos de estudio, para evaluar en cual fracción (soluble, asociada a carbonatos, asociada a óxidos de Fe y Mn, asociada a la materia orgánica o asociada a la fracción residual) se encuentran cada uno de estos elementos traza metálicos en el suelo. A continuación se presentan los resultados para la extracción secuencial de cada elemento.

#### **3.4.1 Extracción secuencial de Cu**

En el Figura 10 se observa que existe baja concentración de Cu soluble y que la que la mayor concentración está en la materia residual. Además serían los óxidos y la materia orgánica en particular, los que concentran la mayor cantidad de este metal en las demás fracciones.

Al comparar los tres suelos, Nogales, con un mayor contenido de materia orgánica, obtiene la mayor concentración de Cu asociado a las cuatro primeras fracciones, dentro de las cuales, el Cu asociado a la materia orgánica es el que predomina con un 26%. En general, en suelos mayormente orgánicos el Cu se asocia en mayor medida a la materia orgánica (McLaren y col., 1973).

Tanto para los suelos Nogales como Ciruelos, se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) (Anexo: Tabla 1) en el Cu asociado a cada fracción, en cambio en el suelo Barbecho no hay diferencias significativas entre las dos primeras fracciones y las fracciones tres y cuatro.

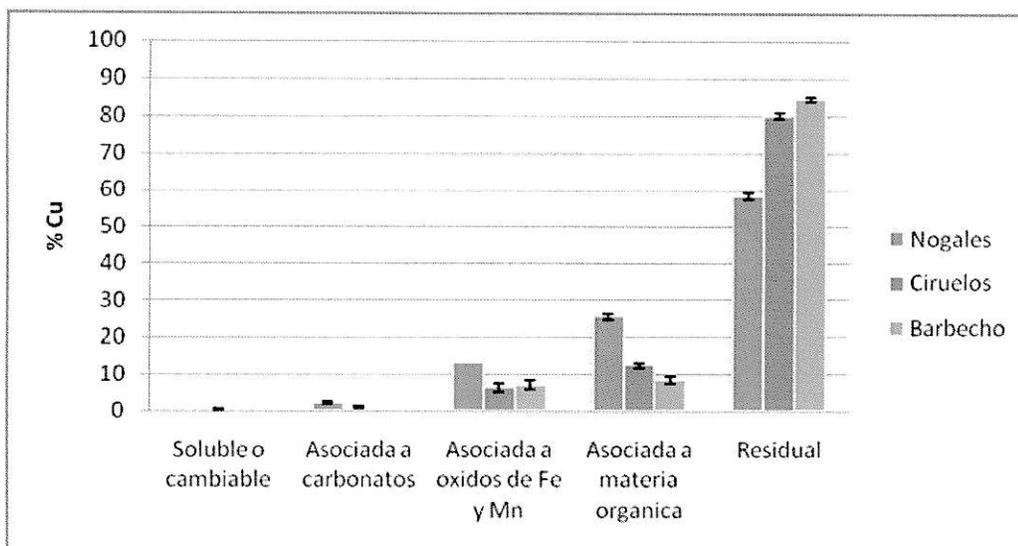


**Figura 11:** Extracción secuencial de Cu para suelo Nogales, Ciruelo y Barbecho.

La fracción residual, tanto para los suelos Ciruelos como Barbecho, alcanza el 80%, (Figura 11). En general, para estos dos suelos los porcentajes de Cu unido a las restantes fracciones son mucho menores. Prácticamente, en las primeras dos fracciones más lábiles no se encontró Cu, mientras que, el Cu asociado a los óxidos de Fe y Mn osciló entre un 6% y un 13% y el asociado a la materia orgánica entre un 8 y 12%. Ahumada y col. (2014), encontraron similares contenidos de Cu asociados a los óxidos y a la materia orgánica en suelos agrícolas de Polpaico, Chile.

Guerra y col., (2007) obtuvieron para cada fracción en suelos agrícolas de Chile enmendados con biosólidos porcentajes bastante similares a los encontrados en Nogales para el Cu: 3,5% soluble; 4,7% asociado a los carbonatos; 7,0% asociado a los óxidos de Fe y Mn; 21% asociado a la materia orgánica y un 63% residual.

Los porcentajes de recuperación (Anexo Tabla 4) mediante este método variaron entre un 83% para y un 94%, lo cual está dentro del rango informado por otros autores (Filgueiras y col., 2002, Jamali y col., 2006, Kabala y col., 2001).

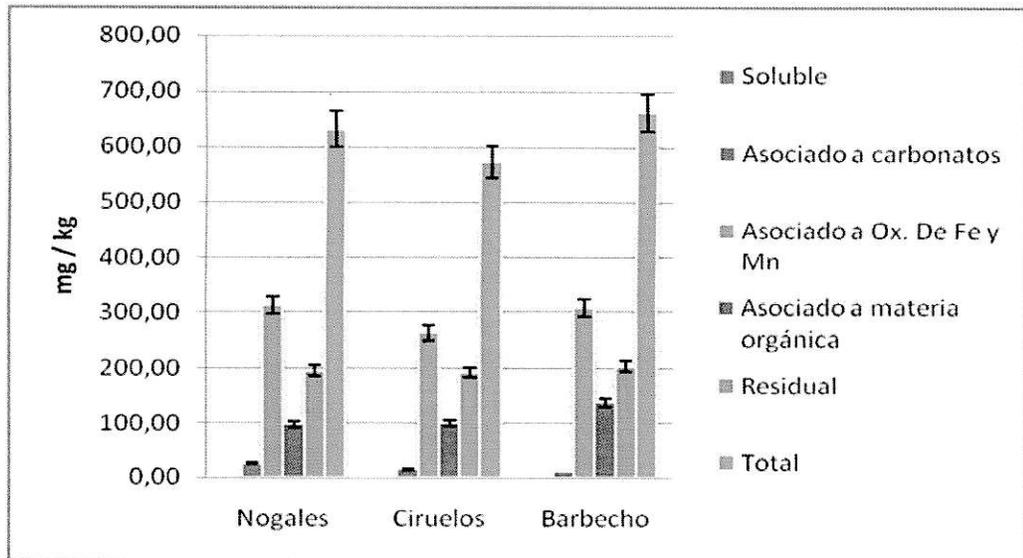


**Figura 12:** Extracción secuencial de Cu (%) para suelo Nogales, Ciruelo y Barbecho.

### 3.4.2 Extracción secuencial de Mn

Los resultados para la extracción secuencial o fraccionamiento químico del Mn (Figura 12 y 13) indican que el Mn se encuentra principalmente asociado a la fracción de los óxidos de Fe y Mn (46 – 50%). Una fracción menor se encuentra asociada a la fracción residual (30 – 33%) y a la materia orgánica (15 – 20%), mientras que un contenido mucho menor de Mn se encuentra intercambiable o unido a los carbonatos (0,1 – 4,0%).

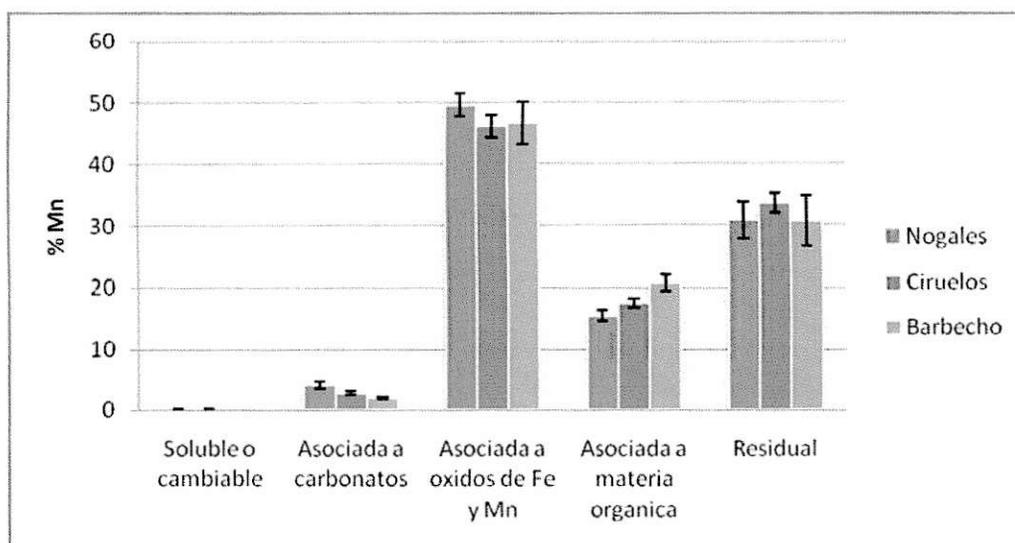
Para el suelo Nogales se obtuvo una máxima concentración de Mn asociado a la fracción de los óxidos de Fe y Mn, alcanzando los  $313 \text{ mg kg}^{-1}$ , siendo esta fracción, casi el 50% del total de todas las fracciones. Esta fracción es la más importante para el manganeso y puede asociar considerables cantidades de Cd, Pb y Zn. (Wilcke W. y col., 1998). Sanchez y col., (2005), obtuvieron un 60% de Mn asociado a esta fracción, mientras Navas y Lindhorfer (2005) un 52%, sin embargo el suelo Nogales, a su vez es un suelo poco arcilloso y con mucho más contenido de materia orgánica.



**Figura 13:** Extracción secuencial de Mn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) para suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho.

En general, se observa una uniformidad en los tres suelos, en cuanto a las proporciones en las que se encuentra asociado el Mn. El orden de asociación decreciente de Mn a las distintas fracciones fue: Óxidos de Fe y Mn > residual > materia orgánica > carbonatos > soluble o intercambiable.

Además, se puede señalar, que a pesar de que Nogales presenta mayor contenido de materia orgánica en comparación con los otros dos suelos, la asociación del Mn con esta fracción es menor que en los otros suelos, por lo que el Mn no presenta una afinidad tan marcada por la materia orgánica, como es el caso del Cu.



**Figura 14:** Extracción secuencial de Mn (%) para suelo Nogales, Ciruelo y Barbecho.

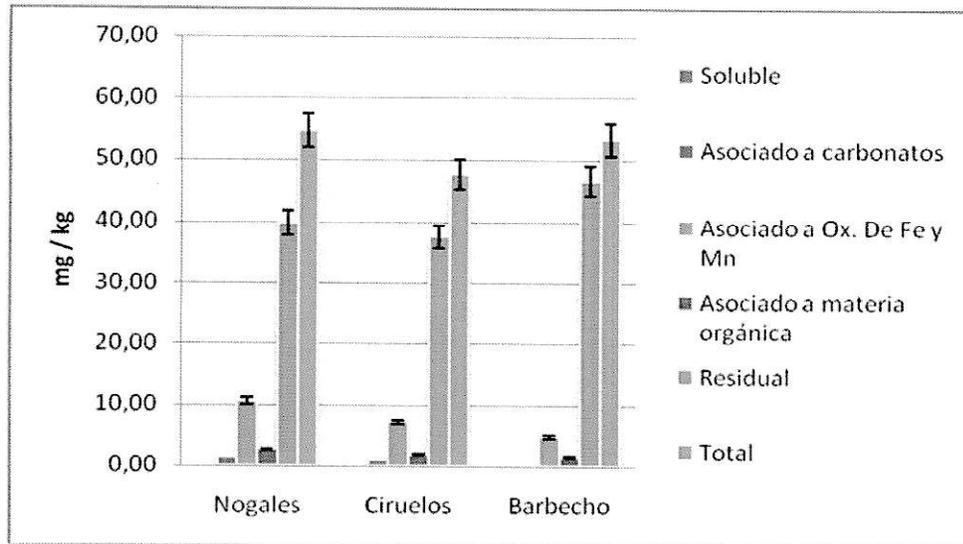
Los porcentajes de recuperación (Anexo Tabla 5) están dentro de los rangos obtenidos por otros autores. Mossop y col., (2003) encontraron porcentajes de recuperación para Mn, entre un 95% y un 110% en suelos de uso industrial.

### 3.4.3 Extracción secuencial de Zn

La Figura 14 muestra los resultados obtenidos para la extracción secuencial de Zn. Se puede apreciar, que entre un 70 y 90% del Zn se encuentra asociado a la fracción residual y entre un 10% y 20% asociado a los óxidos Fe y Mn (Figura 15). No se encontraron contenidos de Zn asociado a la fracción soluble en ninguno de los suelos y el Zn asociado a carbonatos y a la materia orgánica oscila entre un 2% y un 5%.

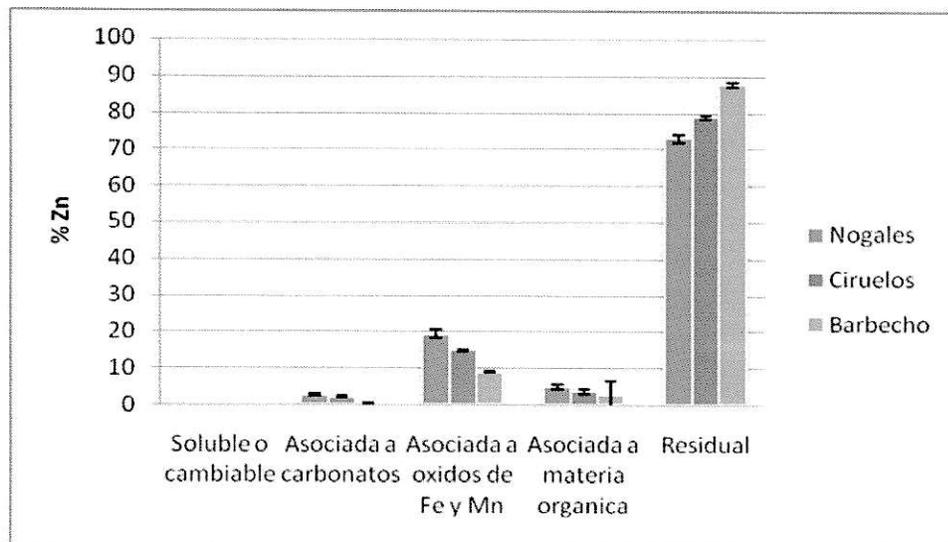
Barrios y col., (2007) encontraron porcentajes bastante similares para la distribución del Zn; éstos fueron: 1,0% intercambiable, 3,0% asociado a carbonatos, 17% asociado a los óxidos de Fe y Mn, 7,0% asociado a la materia orgánica y un

72% residual, para suelos de propiedades similares a los estudiados, en cuanto a pH, contenido de materia orgánica y conductividad eléctrica.



**Figura 151:** Extracción secuencial de Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) para los suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho

Los porcentajes de recuperación están dentro de los rangos aceptados, entre un 77% y un 91%. (Anexo Tabla 6)



**Figura 16:** Extracción secuencial de Zn (%) para los suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho.

### 3.5 Biodisponibilidad de Cu, Mn y Zn en los suelos.

En general, para los tres suelos las diferencias de concentraciones de Cu entre cada una de las fracciones, especialmente entre las primeras fracciones o las más solubles y las fracciones 4 y 5 es tan significativa, que prácticamente el Cu directamente disponible o que se encuentra en la solución suelo es mínimo.

Sin embargo, la absorción de metales no está determinada sólo por la forma en que se encuentran los metales en el suelo, sino también por la proximidad con la superficie de las raíces y con la capacidad de cada planta para absorberlos.

Si bien la mayoría de los micronutrientes están retenidos en las estructuras de los minerales primarios y secundarios y en los coloides de la materia orgánica, los metales retenidos pueden ser liberados para la absorción por las plantas. Así los metales adsorbidos tanto en los coloides de las arcillas como de los óxidos de Fe y Mn y del humus (materia orgánica) presentan una reducida disponibilidad en comparación con los metales solubles (o en la solución suelo) pero las plantas deberían ser capaces de absorber el Cu allí asociado.

Al igual que el Cu, existe muy poco Mn disponible o soluble, pero el alto contenido de Mn asociado a los coloides de los óxidos de Fe y Mn y a la materia orgánica, hace presumir que las plantas podrán acceder a este contenido de metal adsorbido y acumularlo en sus tejidos.

En el suelo Barbecho existen diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre el Zn asociado a cada una de las fracciones (Tabla 6 Anexo), sin embargo, para los suelos Nogales y Ciruelos, no se encontraron diferencias significativas entre el Zn asociado a la fracción soluble, al asociado a carbonatos y al asociado a la materia orgánica, por lo tanto, el mayor contenido de arcillas en Ciruelos y Barbecho, puede explicar la relativa disponibilidad de Zn.

### **3.6 Concentraciones de Cu, Mn y Zn en raíces y hojas de lechugas antes y después del tratamiento con ácido cítrico**

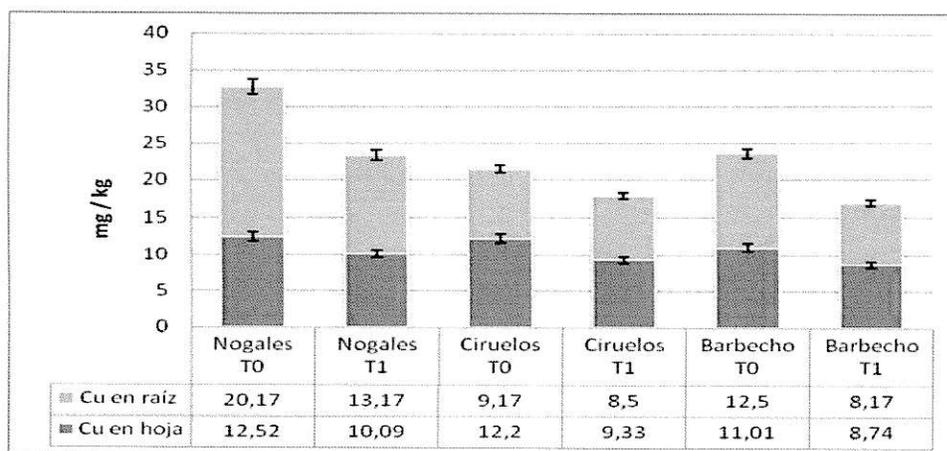
#### **3.6.1 Cobre en lechugas.**

Los resultados muestran (Figura 16) que la concentración total de Cu en las hojas y raíces de las lechugas disminuyó significativamente con la aplicación de ácido cítrico en los tres suelos.

En el suelo Nogales, las raíces de las plantas de lechuga, en ambos tratamientos, presentó los más altos niveles. Esto indica que las raíces de las lechugas cultivadas en este suelo accedieron de mejor forma al Cu asociado a la fracción orgánica principalmente, considerando además, que las raíces de estas lechugas eran las más grandes y por lo tanto pueden acceder a una mayor cantidad de micronutrientes y que Nogales presentó las mas alta concentración de Cu total.

Para los otros dos suelos, Ciruelos y Barbecho, cabe destacar que en este último suelo, las lechugas cultivadas, a pesar del menor tamaño de las raíces de sus plantas fueron capaces de extraer la misma cantidad de Cu que en Ciruelos. Esto puede ser explicado por el mayor contenido de materia orgánica que presentaba Barbecho por sobre Ciruelos, lo cual hace concluir que el Cu mantiene una fuerte interacción con la materia orgánica y las raíces de las lechugas son capaces de absorberlo desde esta fracción. Aparentemente las raíces lo acumulan como reserva para entregarlo gradualmente a las hojas cuyo requerimiento es característico de la planta.





**Figura 17:** Concentración de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en hoja y raíz de lechugas secas cultivadas en los suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho en tratamiento con agua (T0) y con ácido cítrico (T1)

### 3.6.2 Manganeso en lechugas.

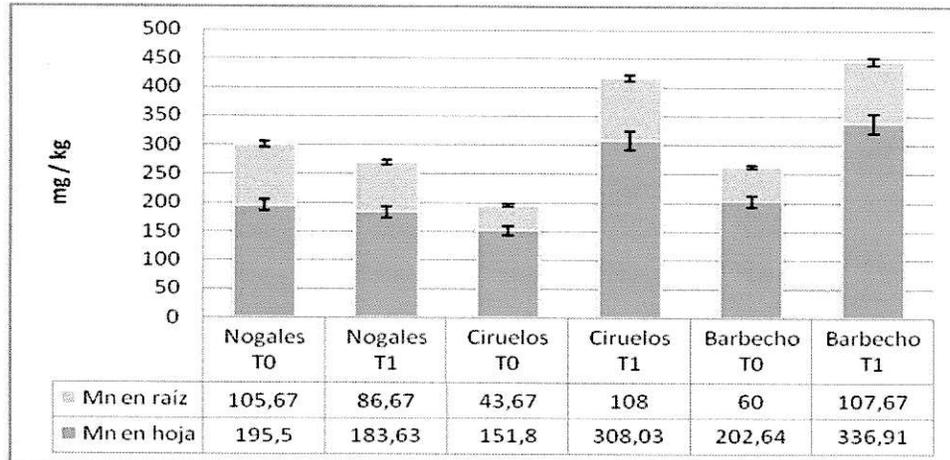
La concentración de Mn (Figura 17) aumenta significativamente con la aplicación de ácido cítrico en los suelos Barbecho y Ciruelos, pero disminuye levemente en los cultivos de Nogales.

Se observa una concentración similar de Mn en las hojas de las lechugas cultivadas en suelos no tratados (T0) de Nogales y Barbecho. Con el tratamiento (T1), sin embargo, incrementa significativamente la concentración total de Mn en las hojas cultivadas en suelos Ciruelos y Barbecho, en tanto que en Nogales disminuye, principalmente en la raíz.

Como se dijo anteriormente, el Mn fue el elemento que se encontró en mayor concentración en los suelos (Figura 9) y un alto porcentaje de este metal estaba asociado a la fracción de los óxidos de Fe y Mn. (Figura 12).

Además, Ciruelos y Barbecho poseen un alto contenido de arcillas y limos y una alta concentración de Mn asociada a estas fracciones, por lo que resultaron ser una fuente importante de Mn para las raíces de las lechugas en estos suelos, que con la ayuda del ácido cítrico pudieron acceder a una mayor cantidad de Mn y acumularlo

en sus raíces, dejando por detrás incluso al Cu y al Zn, que aunque poseían una constante de formación mayor con el complejo con ácido cítrico (Tabla 1), éste simplemente no se formó y las plantas no pudieron acumularlo, dejando incluso a las raíces en T1 con menor contenido de Zn en las raíces de Ciruelos y Barbecho, ya que el Zn que pudieron absorber las raíces lo traslocaron a las hojas.



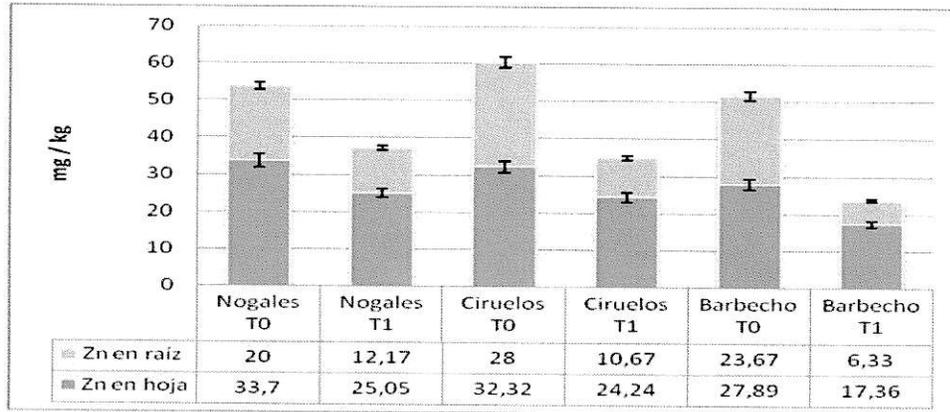
**Figura 18:** Concentración de Mn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en hoja y raíz de lechugas secas cultivadas en los suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho en tratamiento con agua (T0) y con ácido cítrico (T1)

### 3.6.3 Zinc en lechugas.

En particular, la concentración de Zn (Figura 18) disminuyó significativamente en las raíces de las lechugas en los suelos con el tratamiento con ácido cítrico (T1)

La concentración de Zn en las raíces de las lechugas de los suelos sin tratamiento, indican que las raíces en suelos Ciruelos fueron capaces de absorber y acumular la mayor concentración de Zn en comparación con los otros suelos. De la extracción secuencial, se indicó que solo una pequeña fracción de Zn estaba relativamente soluble y asociado principalmente a los óxidos de Fe y Mn.

Además, Ciruelos presentó un alto contenido de arcillas, por lo que seguramente las raíces de estas lechugas, fueron capaces de absorber de mejor manera el Zn que allí se encontraba disponible y acumularlo en sus raíces, más incluso que las raíces de Nogales de mayor tamaño. El ácido cítrico, al parecer inhibió la absorción de Zn de todas las raíces de las plantas, situación que se explica por el comportamiento del Mn.



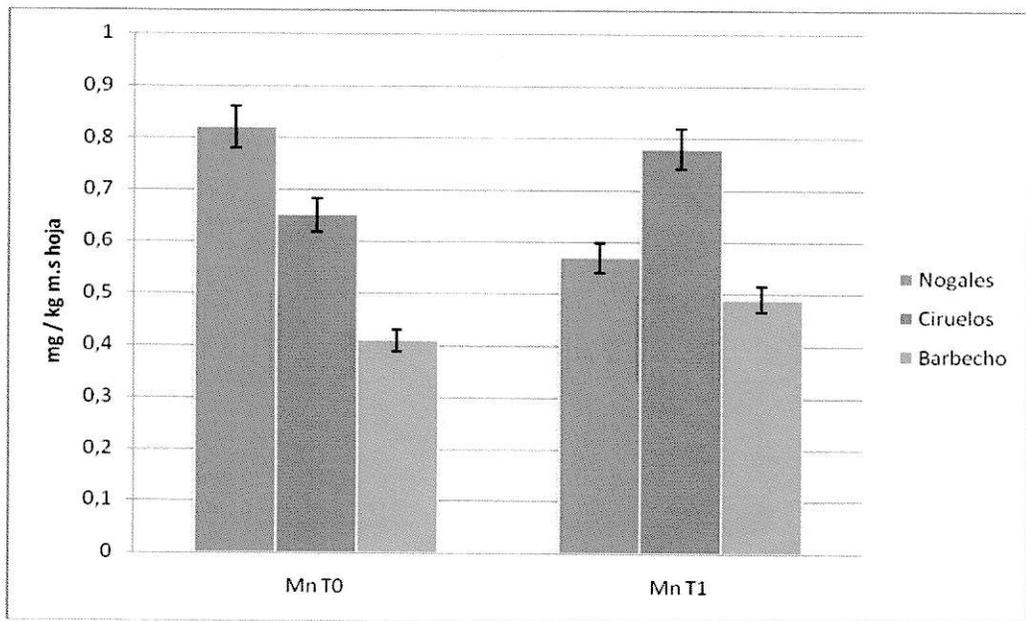
**Figura 19:** Concentración de Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) en hoja y raíz de lechugas secas cultivadas en los suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho en tratamiento con agua (T0) y con ácido cítrico (T1)

### 3.7 Contenido de Cu, Mn y Zn en hojas de *Lactuca sativa*

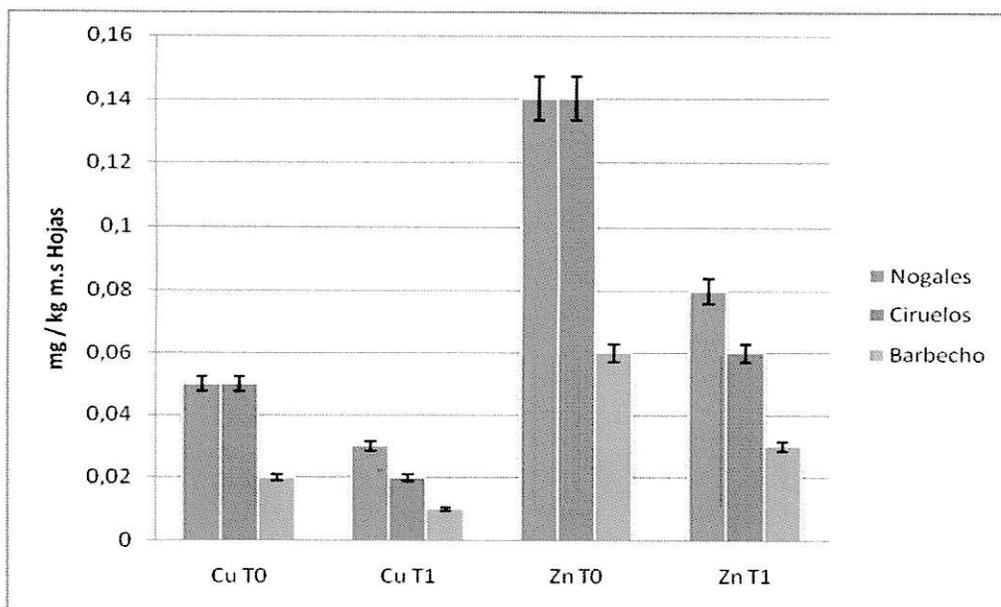
Relacionando la concentración de Cu, Mn y Zn en las hojas de las lechugas con la masa de las lechugas se obtiene el contenido por materia seca. En general, se puede señalar que el Mn es el elemento que se encuentra en un mayor contenido en la hoja, en especial en el suelo Nogales, sin tratamiento. ( $0,82 \text{ mg kg}^{-1} \text{ m.s.}$ ). Para los otros dos suelos, si bien es menor el contenido de Mn que en Nogales, se puede apreciar el efecto del ácido cítrico sobre la movilidad de Mn, encontrando mucho más Mn en las hojas bajo tratamiento. (Figura 19)

El segundo elemento con mayor concentración en la hoja es el Zn, el cual alcanza los  $0,14 \text{ mg kg}^{-1} \text{ m.s}$  en Nogales y Ciruelos sin aplicación de ácido cítrico

(Figura 20). Además, se puede apreciar que el contenido de Zn en las hojas de la lechuga fue siempre menor cuando se aplicó ácido cítrico como tratamiento dejando en evidencia que no se produjo movilidad del metal. Lo mismo ocurre para el Cu, el cual alcanza solo  $0,05 \text{ mg kg}^{-1} \text{ m.s.}$  y no evidencia movilidad con aplicación de ácido cítrico. Tapia y col., (2013) encontraron en ensayos de movilidad de metales en plantas (*Rosmarinus officinalis* y *Atriplex halimus*) que la concentración de Mn fue significativamente mayor para el tratamiento con ácido cítrico en hoja, tallo y raíz.



**Figura 20:** Efecto del tratamiento con ácido cítrico en el contenido de Mn en las hojas secas de las lechugas.



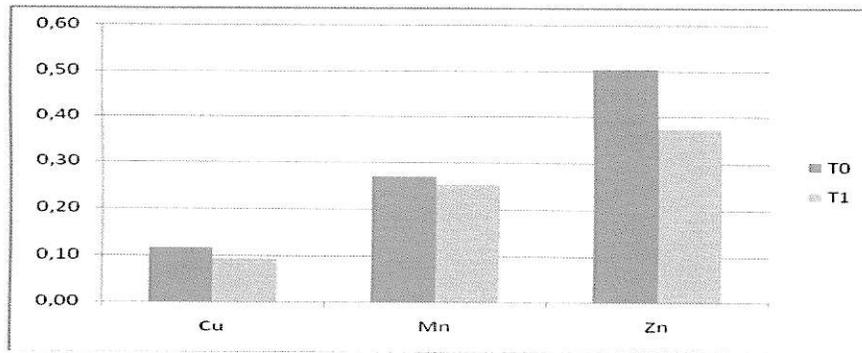
**Figura 21:** Efecto del tratamiento con ácido cítrico en el contenido de Cu y Zn en las hojas de las lechugas.

### 3.8 Factor de bioacumulación de Cu, Mn y Zn

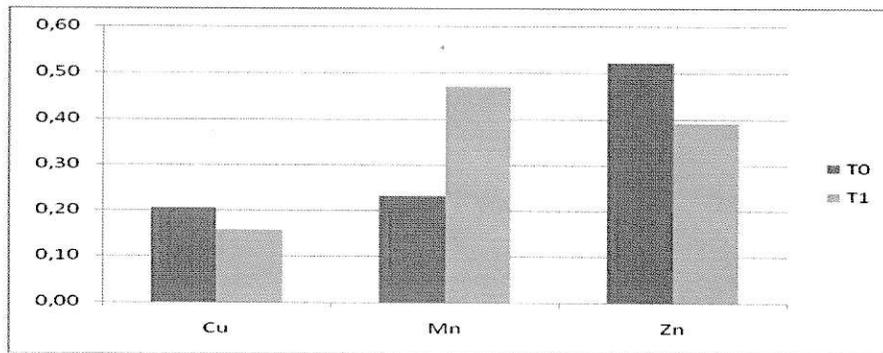
El factor de bioacumulación (FB) es un indicador de la capacidad de la planta para acumular un metal con respecto a la concentración que presenta el metal en el suelo o sustrato y por tanto es también un indicador de la movilidad de los metales desde el suelo a la planta.

Los resultados (Figuras 21, 22 y 23) muestran, en general, un mayor factor de bioacumulación para el Zn en las lechugas cultivadas en T0. Los valores de FB son independientes del tipo de suelo, para el caso de Mn y Zn pero en el caso de Cu hay diferencias debidas al contenido total de este metal en el suelo.

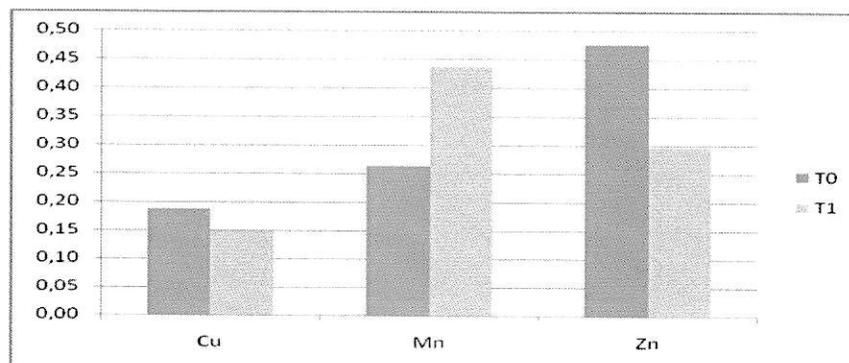
Por otra parte, al aplicar ácido cítrico el FB de Mn incrementa, por sobre el Zn, particularmente en Ciruelos y Barbecho.



**Figura 222:** Factor de bioacumulación para Cu, Mn y Zn en lechugas cultivadas en suelo Nogales.



**Figura 233:** Factor de bioacumulación para Cu, Mn y Zn en lechugas cultivadas en suelo Ciruelos.



**Figura 244:** Factor de bioacumulación para Cu, Mn y Zn en lechugas cultivadas en suelo Barbecho.

### 3.9 Toxicidad potencial de cultivos.

Diversos autores (Evangelou y col., 2012; Yoon y col., 2006; Xiaohai y col., 2008) han encontrado, en diferentes plantas cultivadas en suelos de similar

concentración de Cu total, en hoja y raíz alrededor de 40 mg kg<sup>-1</sup>. Según Mac Nicol y Beckett (1985) y Davis y col (1978), los niveles críticos de Cu asociados a la lechuga oscilan entre los 8 y 23 mg kg<sup>-1</sup>; que se ajustan a los niveles encontrados en el presente estudio.

Para el caso del Zn, las concentraciones críticas o tóxicas, según Macnicol y Beckett (1985), varían entre 380 mgkg<sup>-1</sup> y 520 mg kg<sup>-1</sup> en lechuga; mientras que para el Mn, los niveles suficientes o normales para plantas están entre 30 mg kg<sup>-1</sup> y 300 mg kg<sup>-1</sup>, y se vuelve tóxico a concentraciones entre 400 y 1000 mg kg<sup>-1</sup> (Kabata-Pendias, 2001).

El SAG a través de un estudio en conjunto con la Universidad de Chile (U de Chile-SAG., 2005) considerando valores de concentración máxima tolerable de metales pesados para algunos cultivos agrícolas de consumo regular, encontrados por diversos autores y en distintos suelos no contaminados del mundo, señalan para la hoja de la lechuga un máximo en Cu, Mn y Zn de 8,1; 30 y 73 mg por kilogramo de masa seca respectivamente. Los valores máximos en cultivos agrícolas corresponden a la cantidad (mg kg<sup>-1</sup> m.s vegetal consumida) bajo la cual no hay riesgo para la salud humana por ingesta directa y no a límites de fitotoxicidad. Por lo tanto, las lechugas cultivadas en Nogales, Ciruelos y Barbecho no presentarían riesgos para la salud en caso de ser consumidas por el ser humano.

#### IV. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de los análisis realizados en este Seminario se pudo establecer que:

1. En los tres suelos existen concentraciones de Cu, Mn y Zn que están dentro de los rangos esperados para suelos no contaminados de la Zona Central, donde existe una alta concentración de Mn. Esto indica que no están afectados por el relave de las cercanías.
2. Las hojas de lechuga contienen Cu (11-13 mg/Kg), Mn (195-308 mg/Kg) y Zn (29-34 mg/Kg) en concentraciones normales que no representan un peligro para su consumo.
3. Un análisis del contenido total de metales en el suelo y el de la fracción soluble en agua no permite predecir la biodisponibilidad de los metales micronutrientes, al menos en hojas de lechuga. Para ello es necesario conocer la forma de asociación de los metales en el suelo, mediante extracción secuencial.
4. Los factores de bioacumulación de los metales estudiados muestran que las hojas de las plantas presentan concentraciones similares de Cu y Zn en todos los casos, sin importar la textura o la biodisponibilidad relativa del metal en cada suelo, lo que permite señalar que la planta la planta es capaz de absorberlo en similares concentraciones.
5. Las raíces contienen Cu (9-20 mg), Mn (44-106 mg) y Zn (20-28 mg) por Kg. Las diferencias de concentraciones entre los suelos pueden correlacionarse con la cantidad de Cu asociado a materia orgánica, y con la cantidad de Mn y Zn asociado a óxidos, de acuerdo a los resultados de extracción secuencial.
6. Las diferencias en concentraciones de NPK entre los suelos afecta al tamaño de hojas y raíces, pero no es relevante en la absorción de metales.

7. La marcada afinidad del Cu con los coloides de la materia orgánica y del humus, reportada por diversos autores, se pudo comprobar en la extracción secuencial del Cu en el Suelo Nogales, en donde se observa un alto porcentaje de asociación con la materia orgánica en contraste con los otros suelos de menor contenido de carbono orgánico.
8. La adición de ácido cítrico al suelo disminuye significativamente el factor de bioacumulación de Zn en las raíces, en tanto el FB de Cu disminuye en menor proporción. El factor de bioacumulación de Mn aumenta en los suelos más arcillosos con la aplicación de ácido cítrico (Ciruelos y Barbecho).
9. Los resultados demuestran que la menor estabilidad del quelato Mn-citrato no es un factor determinante para favorecer la biodisponibilidad de Cu o Zn que forman quelatos más estables con ácido cítrico, ya que la mayor concentración de Mn en el suelo desplaza el equilibrio. Aparentemente, al formarse el quelato, el proceso de absorción se verá más favorecido que la descomposición del quelato.
10. Finalmente, la metodología utilizada en este estudio muestra buenos índices de recuperación en las extracciones secuenciales.

## V. BIBLIOGRAFÍA

- Ahumada, I., Sepulveda, K., Fernandez, P., Ascar, L., Pedraza, C., Richter, P., Brown, S. 2014. Effect of biosolid application to Mollisol Chilean soils in the bioavailability of heavy metals (Cu, Cr, Ni, and Zn) as assessed by bioassays with sunflower (*Helianthus annuus*) and DGT measurements. *Journal Soil Sediments*. **14**: 886-896
- Alloway, B.J. 1995. Heavy metals in soils. En Blackie Academic and Professional (eds), UK.
- V. Antoniadis\*, B.J. Alloway 2002. The role of dissolved organic carbon in the mobility of Cd, Ni and Zn in sewage sludge-amended soils *Environmental Pollution* 117 , 515–521
- Ascar, L., Ahumada, I., Richter, P. 2008. Effect of biosolid incorporation on arsenic distribution in mollisol soils in central Chile. *Chemosphere*. **70**: 1211–1217
- Barrios, M.S and Longa, M, S. 2007. Sequential extraction of Nickel, Chromium and Zinc in a soil of the Valencia Lake basin and its accumulation in sorghum plants. *Revista Facultad Agronomia*. **24**: 739-762
- Basta, N.T. y Tabatabai, M.A. 1992. Effect of cropping systems on adsorption of metals by soils: II. Effect of pH. *Soil Science*. **153**: 195–204.
- Bernier., V. 2000. Diagnostico de la fertilidad del suelo. Centro de Investigaciones Remehue. INIA
- Bouyoucos, G. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. *Agronomy Journal*. **54**: 464-465.
- Chakraborty, S., Boivin, F., Banerjee, D., Scheinost, A., Mullet, M., Ehrardt, J.J., Brendle, J., Vidal, L., Charlet, L. 2010. Uranium (VI) sorption and reduction by Fe(II) sorbed on montmorillonite. *Environmental Science and Technology*. **44**: 3779–3785
- CIREN .1996. Descripciones de suelos, materiales y símbolos. Estudio Agrológico de la Región Metropolitana. 425p.
- Davis, R.D. y Beckett, P.H.T. 1978. Upper critical levels of toxic elements in plants. Critical levels of copper in young barley, wheat, rape, lettuce and

ryegrass, and of nickel and zinc in young barley and ryegrass. *New Phytologist*. **80(1)**: 23-32.

- Dijkstra, J.J., Meeussen, J.C.L., and Comans, R.N.J. 2004. Leaching of Heavy Metals from Contaminated Soils: An Experimental and Modeling Study. *Environmental Science and Technology*. **38(16)**: 4390-4395
- Do Nascimento, W., Amarasiriwardena, D., Xing, B. 2006. Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals fro multi-metal contaminated soil. *Environmental Pollution*. **140**: 114-123
- DS-4. 2009. Republica de Chile. Reglamento para el manejo de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas servidas.
- Evangelou, M., Kerstin, H., Pokharel, R., Jakob, A., Schulin, R. 2012. Accumulation of Sb, Pb, Cu, Zn and Cd by various plants species on two different relocated military shooting range soils. *Journal of Environmental Management*. **108**: 102-107
- Fergus, I.F. 1954. Manganese Toxicity in acid soil. *Queensland Journal of agricultural Science*. **11**: 15-21
- García I. y Dorronsoro C. 2005. Contaminación por metales pesados. En *Tecnología de Suelos*. Universidad de Granada. Departamento de Edafología y Química Agrícola.
- Garrido, T., Mendoza, J., Arriagada, F. 2012. Changes in the sorption, desorption, distribution, and availability of copper, induced by application of sewage sludge on Chilean soils contaminated by mine tailings. *Journal of Environmental Sciences*. **24(5)**: 912-918
- González M., S. 1995. Copper upper critical levels for plants on copper polluted soils and the effect of organic additions. *En: Adriano Biochemistry of trace elements*. Science and Technology Letters.
- Guerra, P., Ahumada, I., Carrasco, A. 2007. Effect of biosolid incorporation to molisol soils on Cr, Cu, Ni, Pb, and Zn fractionation, and relationship with their bioavailability. *Chemosphere*. **68**: 2021-2027
- Kabata-Pendias, Alina. 2000. Trace elements in soils and plants. 3<sup>rd</sup> Edition. CRC Press.
- Lagos G. 2004. 20 años de cambio ambiental minero. *Ambiente y desarrollo*. **20(2)**: 57-66

- Lassat M. 2001. The uses of plants for removal of toxic metal from contaminated soil. USEPA
- Lesage, E., Meers, E. 2005. Enhanced phytoextraction II: Effect of EDTA and citric acid on heavy metal uptake by *Helianthus annuus* from a calcareous soil. *International Journal of Phytoremediation*. **7**: 143-152
- Levinson, A. A. 1974. Introduction to exploration geochemistry. Calgary: Applied Publishing.
- Macnicol, R. D. and Beckett, P.H.T. 1985. Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. *Plant and Soil*. **85**(1): 107-129.
- McLaren, R. G., & Crawford, D. V. 1973. Studies on soil copper.1. Fractionation of copper in soils. *Journal of Soil Science*. **24**(2): 172-181.
- Mignorance, A. 2010. El suelo, regulador fisicoquímico de elementos traza para las plantas. En: C4 y CAM, Características Generales y uso en programas de desarrollo de tierras áridas y semiáridas, Editorial CSIC.
- Miller, W. P., D. C. Martens, and L.W. Zelazny. 1986. Effect of sequence in extraction of trace metals from soils. *Soil Science Society of America Journal*. **50**(3): 598-601.
- Moreno, E., Peñalosa, J., Manzano, R., Carpena, R., Gamarra, R., Esteban, E. 2009. Heavy metals distribution in soil surrounding and abandoned mine in NW Madrid (Spain) and their transference to wild flora. *Journal of Hazardous Material*. **162**: 854-859.
- Moreno, E., Peñalosa, J.,R., Carpena, R., Esteban, E. 2007. Comparison of arsenic resistance in Mediterranean woody shrubs used in restoration activities. *Chemosphere*. **71**: 466-473
- Mossop, K, F., Davidson, C, M. 2003. Comparison of original and modified BCR sequential extraction procedures for the fractionation of copper, iron, lead, manganese and zinc in soils and sediments. *Analytical Chemical Acts*. **478**: 111-118
- Navas, A. and Lindhorfer, H. 2005. Chemical partitioning of Fe, Mn, Zn and Cr in mountain soils of the Iberian and Pyrenean ranges. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*. **14** (3): 249-259
- Norvell, W.A. 1991. Reaction of metal chelates in soils and nutrient solution.
- Pagnanelli, F., Moscardini, E., Giuliano, V. and Toro, L. 2004. Sequential Extraction of Heavy Metals in River Sediments of an Abandoned Pyrite Mining Area: Pollution Detection and Affinity Series. *Environmental Pollution*. **132**:189-201.

- Peppas, A., Komnitsas, K., Halikia, I. 2000. Use of organic covers for acid mine drainage control. *Mineral Engineering*. **13**: 563-574
- Reichman M.S. 2002. The responses of plants to metals toxicity: A review focusing on copper, manganese and zinc. Australian Minerals and Energy Environment Foundation. 54p.
- Rieuwerts J.S., Thornton I., Farago M.E and Ashmore M.R. 1998. Factors influencing metals bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation and Bioavailability*. **10**(2): 61-75.
- Sadzawka, A., R. Grez, M.A. Carrasco y M.L. Mora. 2006. Métodos Recomendados para Suelos Chilenos. Comisión Nacional de Normalización y Acreditación. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. Santiago, Chile. 164 p.
- Sanchez D.M., Queido A.J., Fernandez M., Hernandez C., Schmid T., Millan R., Gonzalez M., Aldea M., Martin R., Morante R. 2005. Mercury and trace element fractionation in Almaden soils by application of different sequential extraction procedures. *Bioanalytical Chemistry*. **381**: 1507-1514
- Silveira M.L.A., L.R.F. Alleoni, L.R.G. Guilherme. 2003. Biosolids and heavy metals in soils. *Scientia Agricola*. **60**(4): 793-806.
- Sposito, G. 1989. *The Chemistry of soils*. New York Oxford.
- Stevenson, F.J. 1994. *Humus Chemistry*. Ed. John Wiley and Sons, inc. NY.
- Y. Tapia & E. Eymar & A. Gárate & A. Masaguer 2013. Effect of citric acid on metals mobility in pruning wastes and biosolids compost and metals uptake in *Atriplex halimus* and *Rosmarinus officinalis*. *Environ Monit Assess* (2013) 185:4221–4229
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M. 1979. Sequential extraction procedure for speciation of particle trace metals. *Analytical Chemistry*. **51**(7): 844-851.
- Thomas, R. P.; Ure, A M.; Davidson, C. M.; Littlejohn, D.; Rauret, G.; Rubio, R. y López-Sánchez, J. F. 1994. Three-stage sequential extraction procedure for the determination of metals in river sediments. *Analytical Chemistry Acta*. **286**: 423-429.
- Turgut, C., Pepe, M., Cutright, J. 2004. The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr and Ni from soil using *Helianthus annuus*. *Environmental Pollution*. **131**: 147-154

- Uchimiya, M. 2010. Immobilization of Heavy Metal Ions (CuII, CdII, NiII, and PbII) by Broiler Litter- Derived Biochars in Water and Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**(9): 5538-5544.
- Wasay, S., Barrington, S., Tokunaga, S. 2001. Organic acids for in situ remediation of soils polluted by heavy metals: soil flushing in columns. *Water, Air and Soil Pollution*. **127**: 301-314
- Wilcke W., Muller S., Kanchanakool N., Zech W. 1998. Urban soil contamination in Bangkok: heavy metal and aluminium partitioning in topsoil. *Geoderma*. **86**: 211.
- Woodruff, L.G. and Cannon, W.F. 2010. Immediate and Long-Term Fire Effects on Total Mercury in Forests Soils of Northeastern Minnesota. *Environmental Science and Technology*. **44**(14): 5371-5376.
- Xiaohai, L., Yuntao, G., Sardar, K., Gang, D., Aikui, C., Li, L., Lei, Z., Zhonghan, L., Xuecan, W. 2008. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on contaminated sites and their potential accumulation capacity in Heqing, Yunnan. *Journal of Environmental Sciences*. **20**: 1469-1474
- Xu, N. and Saiers, J.E. 2010. Temperature and Hydrologic Controls on Dissolved Organic Matter Mobilization and Transport within a Forest Top soil. *Environmental Science and Technology*. **44**(14): 5423-5429
- Yoon J, Cao X D, Zhou Q X, Ma L Q, 2006. Accumulations of Pb, Cu and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment*. **368**: 456– 464.



## VI. ANEXO

**Tabla 4:** Extracción Secuencial de Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$  de suelo) en suelos correspondientes a Nogales, Ciruelos y Barbecho

	Soluble o cambiabile	Asociada a carbonatos	Asociada a óxidos de Fe y Mn	Asociada a materia orgánica	Residual	Suma	% R
	$\text{mg kg}^{-1}$						
Nogales	$0,30 \pm 0,05a$	$2,45 \pm 0,16b$	$13,55 \pm 0,59c$	$25,82 \pm 0,95d$	$59,31 \pm 3,51e$	101,43	88,34
Ciruelos	$0,04 \pm 0,07a$	$0,41 \pm 0,17b$	$3,5 \pm 0,66c$	$6,62 \pm 0,43d$	$42,08 \pm 1,62e$	52,64	94,04
Barbecho	$0 \pm 0a$	$0 \pm 0a$	$3,4 \pm 0,61b$	$4,1 \pm 0,44b$	$40,99 \pm 0,85c$	48,49	82,65

%R: porcentaje de recuperación. Diferentes letras, en filas, indican diferencias significativas entre las fracciones de acuerdo al test de Duncan ( $p= 0,05$ ).

**Tabla 5:** Extracción secuencial de Mn ( $\text{mg kg}^{-1}$  de suelo) en suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho

	Soluble o cambiabile	Asociada a carbonatos	Asociada a óxidos de Fe y Mn	Asociada a materia orgánica	Residual	Suma	% R
	$\text{mg kg}^{-1}$						
Nogales	$0,40 \pm 0,69a$	$25,51 \pm ,37b$	$313,17 \pm 4,36c$	$97,49 \pm 4,72d$	$195,17 \pm 27,96e$	631,74	88,34
Ciruelos	$0,67 \pm 0,46a$	$15,85 \pm ,02b$	$263,86 \pm 6,98c$	$99,88 \pm 0,06d$	$192,28 \pm 11,55e$	572,54	87,29
Barbecho	$0,40 \pm 0a$	$12,33 \pm ,73b$	$307,50 \pm 7,04c$	$137,63 \pm 0,80d$	$203,96 \pm 37,80e$	661,82	85,82

%R: porcentaje de recuperación. Diferentes letras, en filas, indican diferencias significativas entre las fracciones de acuerdo al test de Duncan ( $p= 0,05$ ).

**Tabla 6:** Extracción secuencial de Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$  de suelo) en suelos Nogales, Ciruelos y Barbecho

	Soluble o cambiabile	Asociada a carbonatos	Asociada a óxidos de Fe y Mn	Asociada a materia orgánica	Residual	Suma	% R
	$\text{mg kg}^{-1}$						
Nogales	$0,00 \pm 0a$	$1,45 \pm 0,11a$	$10,58 \pm 0,81b$	$2,73 \pm 0,45a$	$39,79 \pm 1,24c$	54,56	76,97
Ciruelos	$0,00 \pm 0a$	$1,07 \pm 0,05a$	$7,16 \pm 0,14 b$	$1,83 \pm 0,38a$	$37,58 \pm 0,86c$	47,64	81,42
Barbecho	$0,00 \pm 0a$	$0,21 \pm 0,09b$	$4,81 \pm 0,15c$	$1,49 \pm 0,25d$	$46,71 \pm 1,04e$	53,22	90,77

%R: porcentaje de recuperación. Diferentes letras, en filas, indican diferencias significativas entre las fracciones de acuerdo al test de Duncan ( $p= 0,05$ ).

**Tabla 7:** Contenido de Cu, Mn y Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$  m.s) en hoja y raíz de *Lactuca Sativa* cultivada en suelo Nogales sin tratamiento (T0) y con tratamiento de ácido cítrico 4 g/L (T1)

		T0	T1	
	Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Hoja	12,52 $\pm$ 0,98a A	10,09 $\pm$ 0,89b A
		Raíz	20,17 $\pm$ 1,53a B	13,17 $\pm$ 1,53b B
Nogales	Mn ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Hoja	195,50 $\pm$ 44,32a A	183,63 $\pm$ 15,17a A
		Raíz	105,67 $\pm$ 1,53a B	86,67 $\pm$ 1,53b B
	Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Hoja	33,70 $\pm$ 0,81a A	25,05 $\pm$ 2,54b A
		Raíz	20,00 $\pm$ 1,32a B	12,17 $\pm$ 0,58b B

Letras minúsculas distintas en una fila indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p \leq 0,05$ , Tukey). Letras mayúsculas distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas entre hoja y raíz para un mismo tratamiento ( $p \leq 0,05$ , Tukey).

**Tabla 8:** Contenido de Cu, Mn y Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$  m.s) en hoja y raíz de *Lactuca Sativa* cultivada en suelo Ciruelos sin tratamiento (T0) y con tratamiento de ácido cítrico 4 g/L (T1)

		T0	T1	
	Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Hoja	12,20 $\pm$ 1,69a A	9,33 $\pm$ 0,8a A
		Raíz	9,17 $\pm$ 0,58a B	8,50 $\pm$ 0,0a A
Ciruelos	Mn ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Hoja	151,80 $\pm$ 46,08a A	308,03 $\pm$ 49,51b A
		Raíz	43,67 $\pm$ 3,51a B	108 $\pm$ 2,0b B
	Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Hoja	32,32 $\pm$ 1,97a A	24,24 $\pm$ 1,62b A
		Raíz	28,0 $\pm$ 2a A	10,67 $\pm$ 0,58b B

Letras minúsculas distintas en una fila indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p \leq 0,05$ , Tukey). Letras mayúsculas distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas entre hoja y raíz para un mismo tratamiento ( $p \leq 0,05$ , Tukey).

**Tabla 9:** Concentración de Cu, Mn y Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$  m.s) en hoja y raíz de *Lactuca Sativa* cultivada en suelo Ciruelos sin tratamiento (T0) y con tratamiento de ácido cítrico 4 g/L (T1)

		T0	T1
	Cu ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Hoja 11,01 $\pm$ 0,72a A	8,74 $\pm$ 1,03b A
		Raíz 12,50 $\pm$ 2a A	8,17 $\pm$ 0,58b A
Barbecho	Mn ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Hoja 202,64 $\pm$ 10,05a A	336,91 $\pm$ 35,94b A
		Raíz 60 $\pm$ 13a B	107,67 $\pm$ 1,53b B
	Zn ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Hoja 27,89 $\pm$ 4,16a A	17,36 $\pm$ 2,46b A
		Raíz 23,67 $\pm$ 1,53a A	6,33 $\pm$ 0,58b B

Letras minúsculas distintas en una fila indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p \leq 0,05$ , Tukey). Letras mayúsculas distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas entre hoja y raíz para un mismo tratamiento ( $p \leq 0,05$ , Tukey).

**Tabla 10:** Factor de Bioacumulación para la lechuga en los distintos suelos

	T0	T1	T0	T1	T0	T1
	Cu		Mn		Zn	
Nogales	0,47	0,38	0,22	0,20	0,13	0,09
Ciruelos	0,46	0,35	0,17	0,34	0,12	0,09
Barbecho	0,42	0,33	0,22	0,37	0,10	0,07

**Tabla 11:** Contenido de Cu, Mn y Zn en hoja ( $\text{mg kg}^{-1}$  m.s.) de *Lactuca Sativa* cultivada en los distintos suelos sin tratamiento (T0) y con tratamiento de ácido cítrico 4 g/L (T1)

	T0	T1	T0	T1	T0	T1
	Cu		Mn		Zn	
	$\text{mg kg}^{-1}$ m.s.					
Nogales	0,05	0,03	0,82	0,57	0,14	0,08
Ciruelos	0,05	0,02	0,65	0,78	0,14	0,06
Barbecho	0,02	0,01	0,41	0,49	0,06	0,03