



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Inorgánica y Analítica
Laboratorio de Química Ambiental

**“Determinación de la fracción biodisponible de metales
traza en suelos tratados con biosólidos a través de la
técnica de la gradiente de difusión en capa fina (DGT),
cultivo de plantas de ballica y extracción secuencial”**

Memoria para obtener el Título de Químico

Directores de Tesis:

Inés Ahumada T.
Loreto Ascar E.

Patrocinante de Tesis:

Inés Ahumada T.

Viviana Andrea Vásquez Sepúlveda

Santiago – Chile

2009

Resumen

La aplicación de biosólidos generados en plantas de tratamiento en suelos agrícolas es una de las opciones más factibles para solucionar el problema de su disposición en monorrellenos. Además su alto contenido de materia orgánica, macro y micronutrientes permiten la recuperación de suelos degradados. Sin embargo esto puede traer problemas ambientales, ya que la aplicación de biosólidos trae consigo el aumento en el contenido total de metales traza en el suelo y efectos asociados a la biodisponibilidad, movilidad y asociación química de éstos en el suelo. La fracción biodisponible es aquella utilizable por las plantas, y se puede determinar mediante sistemas biológicos, los cuales requieren tiempo y poseen un alto costo. De aquí nace la necesidad de crear nuevos métodos químicos y físico-químicos para determinar la biodisponibilidad en un laboratorio y obtener respuestas rápidas sobre las condiciones ambientales del sistema. La técnica de Gradiente de Difusión en Capa Fina (DGT) ha demostrado ser una herramienta promisorio para evaluar la biodisponibilidad de los metales pesados en plantas, ya que los dispositivos DGT, al igual que las raíces de las plantas, disminuyen localmente la concentración de la solución de suelo y permiten el transporte por difusión desde la solución de suelo y la fase sólida.

Este estudio evaluó el efecto de la aplicación de biosólidos a distintas dosis (0, 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹), en cuanto al contenido total, asociaciones químicas y biodisponibilidad de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn, en dos series de suelos agrícolas de la región Metropolitana, Chicureo (CHC) y Los Morros (MRR). Para conocer la biodisponibilidad de los elementos traza en los suelos, fueron cultivadas plantas de Ballica (*Lolium perenne* L.) en ambos suelos a distintas dosis de biosólido. De manera adicional, se determinó la biodisponibilidad de los metales en suelos usando la técnica DGT, los resultados de concentración efectiva, C_E, se compararon con los contenidos en las plantas de Ballica y con la fracción soluble en ácido (fracción más lábil de los suelos, normalmente

asociada a la biodisponibilidad) de los metales en los suelos, determinada mediante el método de extracción secuencial BCR.

Los resultados mostraron que en el biosólido, el orden en el contenido total de los metales fue: $Zn > Cu > Cr > Ni > Pb$, todas estas concentraciones dentro de los límites establecidos por la norma chilena de tratamiento y manejo de lodos. Con respecto al contenido total de metales, ambos suelos presentaron un mayor contenido de Zn y Cu con respecto al resto de los metales, y en general se produce un aumento en el contenido de los metales en el suelo luego de la aplicación de biosólidos. Los metales se encuentran mayoritariamente en la fracción residual de los suelos, y con la aplicación de biosólidos se produce una disminución en esta fracción, y un aumento principalmente en la fracción soluble en ácido y oxidable.

Los contenidos de Cu y Zn en los cultivos de Ballica presentan un aumento con la aplicación de dosis crecientes de biosólido, llegando a un nivel constante. En cambio los contenidos de Cr, Ni y Pb alcanzan una concentración máxima y luego decrecen.

La comparación de los resultados de los cultivos de Ballica con C_E , presentan una buena correlación para Zn y sólo en el suelo CHC para Cu y Ni, el resto de las correlaciones no mostraron resultados satisfactorios. La correlación entre los cultivos de Ballica con la fracción lábil de los suelos sólo presenta resultados satisfactorios para Cu, Ni y Zn en el suelo CHC, y Cr para ambos suelos ($R > 0,85$). Las correlaciones entre C_E y la fracción lábil de la extracción secuencial presentaron mejores resultados, excepto en el caso de Cu en el suelo MRR. Los coeficientes de correlación fueron mayores a 0,95 en el caso del Zn, pero para Ni y Cr sólo se llegó a valores de $R \approx 0,86$.

"DETERMINATION OF THE BIOAVAILABLE FRACTION OF TRACE METALS IN SOILS
TREATED WITH BIOSOLIDS THROUGH THE TECHNIQUE OF DIFFUSION GRADIENT
IN THIN FILMS (DGT) AND THE CULTIVATION OF RYEGRASS PLANTS"

Summary

The application of biosolids generated at treatment plants on agricultural soils is one of the most feasible options to solve the problem of their disposal in monofills. Also their high content of organic matter and macro- and micronutrients allow the recovery of degraded soils. However this may result in environmental problems, since the application of biosolids brings about the increase in total content of trace metals in soil and effects associated with the bioavailability, mobility and chemical association of these in soil. The bioavailable fraction is that usable by plants, and can be determined by biological systems, which are time-consuming and have a high cost. Hence the need for new chemical and physical-chemical methods to determine bioavailability in a lab and get prompt answers on the environmental conditions of the system. The technique of Diffusion Gradient in Thin Layer (DGT) has proven to be a promising tool for assessing the bioavailability of heavy metals in plants, as the DGT devices like roots of plants, locally decrease the concentration of the soil solution and allow transport by diffusion from the soil solution and solid phase.

This study assessed the effect of the application of biosolids at different rates (0, 30, 45 and 60 Mg ha⁻¹), in terms of total content, chemical associations and bioavailability of Cr, Cu, Ni, Pb and Zn, in two series of agricultural soils in the Metropolitan Region, Chicureo (CHC) and Los Morros (MRR). To determine the bioavailability of trace elements in soils, ryegrass (*Lolium perenne* L.) was grown in both soils at different biosolid rates.

Additionally, we determined the bioavailability of metals in soils using DGT technique, the results of effective concentration, C_E , of which were compared with those in the ryegrass plant and with the acid soluble fraction (most labile fraction of the soils, normally associated to bioavailability) of metals in soils, determined by BCR sequential extraction.

The results showed that in the biosolid, the order in the total content of metals was $Zn > Cu > Cr > Ni > Pb$, all these concentrations within the limits fixed by the Chilean standard of sludge treatment and handling. Concerning the total content of metals, both soils showed a higher content of Zn and Cu relative to the rest of the metals, and in general, there is an increase in metal content in soil after biosolid application. Metals are mostly found in the residual fraction of soils, and biosolid application brings about a decrease in this fraction, and an increase mainly in the acid soluble and oxidisable ones.

The contents of Cu and Zn in crops of ryegrass increase with increasing rates of biosolid, reaching a constant level. However, the contents of Cr, Ni and Pb reach a maximum concentration and then decrease.

Comparison of the results of Ballica crops with C_E , show good correlation for Zn, and only in the CHC soil for Cu and Ni, the rest of the correlations did not show satisfactory results. The correlation between Ballica crops with soil labile fraction has satisfactory results only for Cu, Ni and Zn in soil CHC, and Cr for both soils ($R > 0.85$). Correlations between C_E and the labile fraction of the sequential extraction showed better results, except for Cu in MRR soil. The correlation coefficients for Zn were higher than 0.95, but only values of $R^2 \approx 0.86$ were reached for Ni and Cr.

Índice General de Contenidos

1.	Introducción	1
2.	Objetivos	6
•	Objetivos Generales	6
•	Objetivos Específicos	6
3.	Materiales y Métodos	7
3.1	Descripción de las Muestras	7
•	Suelos	7
•	Biosólido	7
•	Ensayo de Incubación	8
•	Ensayo de invernadero – Cultivo de Ballica	8
•	Preparación de muestras de plantas de Ballica a partir del ensayo de invernadero	9
3.2	Caracterización de los suelos	9
•	Determinación de pH	9
•	Determinación de Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)	9
•	Determinación de Materia Orgánica.....	10
•	Determinación Granulometría de Suelos	10
3.3	Determinación del contenido total de metales traza y asociaciones químicas en los suelos, biosólido y mezclas	10
•	Procedimiento para la determinación de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn total	10
•	Procedimiento de Extracción Secuencial de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn	11
3.4	Determinación de la Biodisponibilidad de metales traza en cultivos de Ballica.....	13
3.5	Determinación de la biodisponibilidad de metales traza por DGT	13
3.6	Análisis Estadístico	15
4.	Resultados y Discusión.....	16
4.1	Caracterización de los Suelos.....	16
4.2	Determinación contenido total de metales traza y asociaciones químicas de suelos, biosólido y mezclas	17
4.2.1	Contenido total de metales traza en biosólido, suelos y mezclas	17

4.2.2 Extracción secuencial de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn	20
• Cromo	20
• Cobre	22
• Níquel.....	24
• Plomo.....	26
• Zinc	27
4.3 Biodisponibilidad de metales traza en cultivos de Ballica	29
4.4 Determinación de C_E a través de la técnica DGT	32
4.5 Comparación entre los distintos métodos para la determinación de biodisponibilidad de metales en las plantas	34
• Correlación Cultivos de Ballica y C_E	35
• Correlación entre la fracción soluble en ácido y C_E	37
• Correlación entre la fracción soluble en ácido y los cultivos de Ballica ..	38
5. Conclusiones	40
6. Referencias	43
7. Anexos.....	44

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación y ubicación de las muestras de suelo	7
Tabla 2. Etapas de fraccionamiento secuencial propuesto por la BCR.....	12
Tabla 3. Características generales de los suelos control y enmendados con 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ de biosólidos BET2008	16
Tabla 4. Contenido total de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en Biosólido El Trebal (BET) 2008	17
Tabla 5. Concentración DGT y concentración en agua de poro, en suelos CHC y MRR tratados con dosis 0, 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ de biosólido BET2008	32
Tabla 6. Concentración Efectiva (C _E) determinada mediante la técnica DGT y la aplicación computacional DIFS, para los suelos CHC y MRR a dosis 0, 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ de biosólido BET2008	33
Tabla 7. Coeficientes de Correlación (R) para la comparación de los tres métodos de determinación de biodisponibilidad	35

• Tablas en Anexo

Tabla 1. Contenido total de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en suelos tratados con biosólidos, antes y después de la incubación	45
Tabla 2. Extracción secuencial de Cr en el suelo CHC y MRR control y tratados con 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ de biosólido, antes y después de la incubación	46
Tabla 3. Extracción secuencial de Cu en el suelo CHC y MRR control y tratados con 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ de biosólido, antes y después de la incubación	47
Tabla 4. Extracción secuencial de Ni en el suelo CHC y MRR control y tratados con 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ de biosólido, antes y después de la incubación	48
Tabla 5. Extracción secuencial de Pb en el suelo CHC y MRR control y tratados con 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ de biosólido, antes y después de la incubación	49
Tabla 6. Extracción secuencial de Zn en el suelo CHC y MRR control y tratados con 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ de biosólido, antes y después de la incubación	50

Tabla 7. Contenido de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en cultivos de Ballica en suelos CHC y MRR con distintas dosis de biosólido	51
---	----

Índice de Figuras

Figura 1. Diagramas de dispositivo DGT para suelos y fotografías dispositivo DGT y dispositivo desplegado en suelo	14
Figura 2. Contenido total de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en Biosólido El Trebal (BET) 2008	17
Figura 3. Contenido total de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en suelo Chicureo (CHC) control y enmendado con biosólido en dosis 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹	18
Figura 4. Contenido total de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en suelo Los Morros (MRR) control y enmendado con biosólido en dosis 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹	19
Figura 5. Distribución porcentual de Cr extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Chicureo (CHC) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ , antes (A) y después (D) de la incubación	21
Figura 6. Distribución porcentual de Cr extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Los Morros (MRR) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ , antes (A) y después (D) de la incubación	22
Figura 7. Distribución porcentual de Cu extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Chicureo (CHC) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ , antes (A) y después (D) de la incubación	23
Figura 8. Distribución porcentual de Cu extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Los Morros (MRR) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ , antes (A) y después (D) de la incubación	23
Figura 9. Distribución porcentual de Ni extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Chicureo (CHC) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ , antes (A) y después (D) de la incubación	25
Figura 10. Distribución porcentual de Ni extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Los Morros (MRR) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ , antes (A) y después (D) de la incubación	25

Figura 11. Distribución porcentual de Pb extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Chicureo (CHC) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ , antes (A) y después (D) de la incubación	26
Figura 12. Distribución porcentual de Pb extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Los Morros (MRR) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ , antes (A) y después (D) de la incubación	27
Figura 13. Distribución porcentual de Zn extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Chicureo (CHC) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ , antes (A) y después (D) de la incubación	28
Figura 14. Distribución porcentual de Zn extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Los Morros (MRR) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹ , antes (A) y después (D) de la incubación	29
Figura 15. Contenido de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en cultivos de Ballica en suelo Chicureo (CHC) control y enmendados con biosólido en dosis 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹	31
Figura 16. Contenido de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en cultivos de Ballica en suelo Los Morros (MRR) control y enmendados con biosólido en dosis 30, 45 y 60 Mg ha ⁻¹	31
Figura 17. Comparación entre C _E y la concentración en cultivos de Ballica de Ni en suelo CHC, a distintas dosis de biosólido	36
Figura 18. Comparación entre C _E y fracción soluble en ácido de Zn en suelo CHC, a distintas dosis de biosólido	38
Figura 19. Comparación entre el contenido de Cr en los cultivos de Ballica y la fracción lábil del suelo CHC, a distintas dosis de biosólido	39

1. Introducción

Los metales pueden llegar al hombre a través de los alimentos y el agua, siendo las plantas consideradas su fuente primaria. Las plantas captan los minerales durante la absorción de agua, y usualmente tanto elementos esenciales como los no esenciales siguen la misma vía. Esto significa que las plantas también pueden asimilar metales tóxicos, incluso aquellos sin significancia fisiológica para ellas, porque el mecanismo de transporte carece de especificidad (Marmiroli, 2008). Las plantas pueden acumular metales traza, debido a su gran habilidad de adaptarse a las diversas propiedades químicas en el medio ambiente: así, plantas son reservas intermediarias, a través de las cuales los elementos traza del suelo, agua y aire, son trasladados a animales y humanos (Kabata-Pendias, 2001).

Las fuentes de elementos traza en suelo son principalmente material parental (rocas), fertilizantes comerciales, aguas de regadío, residuos de combustión, industrias de fundición de metales, emisiones de automóviles, y la utilización de biosólidos en suelos para uso agrícola, entre otros (Sparks, 2003).

Dentro de la operación de plantas de tratamiento de agua potable, las aguas servidas y residuos industriales líquidos se generan gran cantidad de lodos, que corresponden a residuos sólidos predominantemente orgánicos, sedimentables que son separados en las distintas etapas del tratamiento. De manera adicional, luego de una serie de procesos para evitar la putrefacción se generan los lodos estabilizados o biosólidos (DS-4, 2009).

En Santiago, durante los últimos años se ha producido un aumento sustancial en la producción de biosólidos, debido a la implementación del Plan de Saneamiento de la Región Metropolitana, el cual busca mejorar la calidad de las aguas de la cuenca hídrica de la región mediante la creación de plantas de tratamiento de aguas servidas y un saneamiento de las aguas de la cuenca para disminuir su contenido de materia orgánica y carga patógena. Se ha planteado como uno de los proyectos más importantes en materia ambiental,

ya que una vez que se encuentre funcionando en su totalidad, permitirá descontaminar el 100% de las aguas servidas domiciliarias y, una pequeña parte, de residuos industriales líquidos de la región.

Una de las opciones para el uso futuro de los lodos generados es en la recuperación de suelos degradados, ya que los lodos son ricos en materia orgánica, macro y micronutrientes, podrían ser utilizados como reemplazo o complemento de los fertilizantes tradicionales. El uso agrícola de los lodos está respaldado por más de diez años de experiencia en el mundo, y por estudios e investigaciones de los aspectos ambientales, como son, el contenido de metales pesados, microorganismos patógenos y nutrientes presentes en los mismos (CONAMA, 2001). La cualidad más importantes de los nutrientes presentes en los lodos, es que al encontrarse complejados con componentes orgánicos, se liberan lentamente y pueden ser mejor absorbidos por los vegetales, obteniéndose una mejor fertilización del suelo para las plantas. Otro de los beneficios en el uso de lodos en la agricultura es la incorporación de metales traza como micronutrientes, los cuales generalmente están ausente o en pequeñas concentraciones en los suelos, ya que estas sustancias generalmente no son recuperables. El lodo proveniente de las plantas de tratamiento posee, en cantidades bajas pero importantes estos elementos traza, por lo que al usar lodos en suelos agrícolas abastecerá a éstos de micronutrientes necesarios para el crecimiento adecuado de muchos cultivos. De esta manera muchos suelos con un bajo valor agrícola podrán tener o recuperar calidad y mejorar su productividad (Sanhueza, 2003).

Sin embargo, ha sido necesario establecer las condiciones para su correcto tratamiento y disposición, las cuales en nuestro país se encuentran reguladas por la CONAMA, estableciéndose: las características del lodo que se puede utilizar, del sitio de aplicación y los criterios de aplicación, para prevenir eventuales impactos negativos en el medio ambiente, principalmente debido a un aumento en la disponibilidad de estos metales, que en altas concentraciones suelen ser nocivos, para la biosfera.

Aunque las legislaciones existentes están basadas principalmente en el contenido total de metales en el suelo, los investigadores están empezando a reconocer que el contenido total incluye grandes fracciones que están inasequibles para plantas, microorganismos o fauna del suelo (Zhang, 2001). La determinación de la biodisponibilidad de metales pesados - fracción que está disponible para la absorción por las plantas - es un paso crucial en la evaluación de riesgos, ésta se predice usualmente mediante correlaciones con la concentración en la solución de suelo, ión metálico libre en la solución de suelo o alguna fracción extractable definida (Nowack, 2004).

Las plantas absorben los nutrientes desde la solución de suelo, fase acuosa que contiene diversas especies químicas del suelo, donde se realizan los procesos bioquímicos y se produce el intercambio con la hidrosfera y biosfera. Este es el medio de transporte de especies químicas que interaccionan con las partículas del suelo. Además provee agua para el crecimiento de las plantas, y es una vía para el intercambio de nutrientes entre las raíces y el suelo (Manahan, 2000).

En general, la captación de metales traza por las plantas es afectado, además de la habilidad específica de ella, por factores físicos y químicos del suelo, de los cuales los más importantes son pH, potencial eléctrico, régimen de agua, contenido de arcilla, contenido de materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, balance de nutrientes, y la concentración de otros elementos traza (Cattani, 2006). También, las condiciones climáticas muestran una influencia en la velocidad de captación de metales. La absorción de elementos traza por las raíces puede ser pasiva o activa. La captación pasiva es la difusión de iones desde la solución externa a la endodermis de la raíz, en cambio la activa requiere energía metabólica y toma lugar en contra del gradiente químico. Los mecanismos pueden diferir dependiendo del elemento. Así, Pb y Ni son preferentemente absorbidos pasivamente, mientras que Cu, Mo, y Zn son absorbidos activamente (Kabata-Pendias, 2001).

En la búsqueda de nuevos métodos más eficaces y rápidos de determinar la biodisponibilidad de metales traza en el suelo, surge la técnica de Gradiente de Difusión en Capa Fina (DGT, Diffusive gradients in thin films), una técnica de medida emergente, que puede proveer diversa información sobre la concentración y comportamiento de los solutos en suelos y sedimentos.

Como las plantas, los dispositivos de DGT localizan concentraciones de metal en la solución de suelo y responden al reabastecimiento de especies lábiles desde la solución y la fase sólida. Los dispositivos de DGT consisten en un montaje plástico que contiene una capa de resina integrado en gel, recubierto por una capa de gel difusor y un filtro protector por el cual los iones pueden difundirse libremente. Estos son desplegados en el suelo por un periodo de tiempo durante el cual los iones metálicos se acumulan en la resina, siendo esta masa de metal acumulada, la determinada (Zhang, 2001). Para la completa interpretación de la dependencia de la acumulación de masa con el tiempo, se requiere un modelo numérico que considere el transporte y reacciones que ocurren entre el dispositivo y el medio de despliegue. Para esto, se ha desarrollado la aplicación del programa de computación DIFS (DGT Induced Fluxes in Sediments and Soils) que permite cuantificar la respuesta del DGT con respecto a las características de difusión, tanto del dispositivo DGT, como del suelo y la velocidad de suministro desde la fase sólida a la solución (Sochaczewski, 2007).

La técnica DGT se creó primeramente para el uso en sistemas acuosos, la teoría de ésta se basa en que la capa de resina se une a los solutos que se han difundido por la capa de difusión, eliminándolos de la solución. Esto establece un gradiente de concentración lineal constante a través de la capa de difusión, y por lo tanto un flujo constante hacia la resina, lo que facilita el cálculo de la concentración del soluto externo al dispositivo. Esta estimación de concentración requiere, que la concentración de soluto adyacente al dispositivo permanezca constante y efectivamente igual a la del seno del sistema más allá de la influencia del dispositivo DGT. Esto se cumple muy bien en los sistemas acuosos, sin embargo, en los sistemas sólidos, debido a la falta de

homogeneización se debe asumir que, en general, las concentraciones en el poro de agua adyacentes al dispositivo se ven empobrecidas con el tiempo. Si no hay un mecanismo de reabastecimiento de solutos fuera de la difusión, la zona de agotamiento se vuelve progresivamente más grande con el tiempo. Por lo tanto el flujo de metales va disminuyendo con el tiempo. La aplicación DIFS usa esta suposición para realizar los cálculos que nos llevan a la concentración efectiva, C_E , que se ha relacionado con la concentración biodisponible para las plantas en el poro de agua del suelo (DGT Research Ltd, 2003)

En general, en investigaciones recientes realizadas con esta técnica se muestra una buena correlación entre la concentración efectiva y las concentraciones obtenidas en cultivos de plantas (Zhang, 2001; Almas, 2006; Nowack, 2004). Sin embargo, antes de tomar decisiones basadas en estos resultados, se deben tomar en cuenta algunas características propias de las plantas que DGT no considera, como: la asimilación de metales decrece en plantas afectadas por toxicidad, mientras que la complejación de metales en la resina Chelex no lo hace (Almas, 2006); DGT mide la concentración de metal en un espacio de unos pocos milímetros, mientras la planta integra un volumen mucho mayor (Nowack, 2004); la relación con la parte aérea de la planta depende de la fisiología de la planta, y no de las características del suelo (Nowack, 2004); las plantas se ven afectas por características del ambiente, como la luz o agua, factores que DGT no considera (Nowack, 2004).

Con todos estos antecedentes, se propone la siguiente hipótesis de trabajo: La aplicación de biosólidos en los suelos, además de aumentar el contenido total de metales traza afecta la biodisponibilidad de éstos en el suelo, la cual podría ser determinada de forma eficiente mediante la técnica de Gradiente de Difusión en Capa Fina (DGT).

2. Objetivos

- **Objetivos Generales**

Evaluar la aplicación del método predictivo biomimético de la técnica de la Gradiente de Difusión de Capa Fina (DGT) para estimar la biodisponibilidad de metales traza en suelos tratados con biosólidos.

- **Objetivos Específicos**

- Caracterización química y física de dos suelos y un biosólido y sus mezclas en cuanto a pH, capacidad de intercambio catiónico (CIC) y materia orgánica (MO). Además se realizará la determinación granulométrica de los suelos.
- Determinación del contenido total de Cu, Cr, Pb, Ni y Zn y sus asociaciones químicas con los distintos componentes del suelo, biosólidos y muestras.
- Determinación de la fracción biodisponible de Cu, Cr, Pb, Ni y Zn a través de la técnica DGT en suelos y mezclas.
- Determinación de la fracción biodisponible de Cu, Cr, Pb, Ni y Zn en cultivos de Ballica.
- Análisis e interpretación de resultados.
- Análisis de correlación simple entre los resultados obtenidos mediante la técnica DGT, los cultivos de Ballica y la fracción lábil del suelo.

3. Materiales y Métodos

3.1 Descripción de las Muestras

- **Suelos**

Las muestras fueron obtenidas a nivel superficial (0-20 cm) de suelos agrícolas de la Región Metropolitana. Se seleccionaron dos series de suelo: Chicureo y Los Morros clasificados como Vertisol y Alfisol respectivamente, las muestras de suelo se almacenaron en bolsas plásticas para su transporte al laboratorio, donde fueron secadas al aire, disgregadas y tamizadas (tamiz de 2 mm) y almacenadas en frascos de polietileno de alta densidad a temperatura ambiente. En la Tabla 1 se muestra la clasificación y ubicación de los suelos.

Tabla 1. Clasificación y ubicación de las muestras de suelo

Serie Suelos	Nombre	Ubicación	Orden
Chicureo	CHC	33° 17' 095"	Vertisol
		70° 40' 434"	
Los Morros	MRR	33° 40' 052"	Alfisol
		70° 40' 191"	

- **Biosólido**

Se utilizó un lodo estabilizado anaeróbicamente, ó biosólido, proveniente de las canchas de monorrelleno de la planta de tratamiento de aguas servidas El Trebal, de la Región Metropolitana. El muestreo fue realizado el 7 de mayo de 2008 y corresponde a la mezcla de biosólidos de los meses de noviembre y diciembre de 2007, el cual fue identificado como BET 2008.

- **Ensayo de Incubación**

Se prepararon dos series de muestras de suelo y mezclas con biosólido en dosis de 0, 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹, de las cuales una de ellas se envasó en frascos plásticos directamente y que corresponderán a las muestras a tiempo 0 días. El segundo grupo de muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas e incubadas durante 60 días a capacidad de campo y temperatura (25°C) constantes en una Incubadora VWR. Una vez terminado el periodo de incubación las muestras se secaron y molieron para su posterior análisis.

- **Ensayo de invernadero – Cultivo de Ballica**

Se utilizaron macetas plásticas a las cuales se les colocó una malla plástica al fondo como soporte para el cuarzo, y así evitar la pérdida de muestra. Posteriormente a cada maceta se le agregaron las mezclas de suelo y biosólido, previamente pesado y homogeneizado, en la dosis de 0, 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹ para ambos suelos por triplicado. Se regaron a capacidad de campo durante 3 días, luego de los cuales se agregaron 5 g de semilla de Ballica (*Lolium perenne L.*), y se cubrieron con una pequeña capa de suelo. El cultivo se mantuvo con iluminación automática de manera de cumplir con periodos de luz en una relación de 14/10 hrs (día/noche), con una variación de temperatura $\pm 5^{\circ}\text{C}$. Las plantas fueron regadas diariamente con agua destilada para mantener la condición de humedad de campo y fueron mantenidas en estas condiciones por 30 días a contar de la siembra de las semillas.

- **Preparación de muestras de plantas de Ballica a partir del ensayo de invernadero**

Luego de transcurrido el tiempo de cultivo, las plantas fueron desmontadas de las macetas y lavadas con agua potable para eliminar el suelo adherido, y luego enjuagadas con agua destilada. Éstas se almacenaron en bolsas de papel y fueron secadas a 30°C en estufa durante aproximadamente una semana.

Las plantas secas, parte aérea y raíz fueron pesadas para la determinación de materia seca y luego molidas en un molinillo para facilitar el posterior análisis de éstas. Las muestras fueron guardadas en frascos plásticos.

3.2 Caracterización de los suelos

Los suelos y biosólido fueron caracterizados a través de determinaciones de pH, capacidad de intercambio catiónico, materia orgánica y granulometría.

- **Determinación de pH**

La determinación de pH se realizó mediante la medida potenciométrica con un electrodo de vidrio-calomelano, del sobrenadante de una suspensión de 10 g de suelo y 25 mL de agua, la cual se agitó durante 5 minutos y luego dejó reposar durante 2 horas (Sadzawka, 2006).

- **Determinación de Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)**

La CIC se determinó por saturación con acetato de sodio a pH 7,0, y el posterior intercambio de sodio adsorbido por amonio. El sodio se determinó por espectroscopía de emisión atómica, en un equipo Perkin Elmer 1100B (Jackson, 1970).

- **Determinación de Materia Orgánica**

El contenido de materia orgánica se determinó por el método de Metson, que consiste en una combustión húmeda de la materia orgánica con una mezcla de $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en medio H_2SO_4 . Después de la reacción, se cuantifica colorimétricamente el Cr^{3+} formado, en un espectrofotómetro UV-Visible Unicam UV-2, con celdas de 1 cm a una longitud de onda de 600 nm (Sadzawka, 2006).

- **Determinación Granulometría de Suelos**

La determinación de textura se realizó a través del análisis de tamaño de partículas por el método del hidrómetro (Bouyoucos).

Para la determinación de la textura del suelo se pesaron 50 g de suelo, a los cuales se agregaron 700 mL de agua y 20 mL de polifosfato de sodio al 10%. Se agitó durante 15 minutos y trasvasijó a una probeta de 1 L y se aforó. Se tapó y agitó durante 1 minuto, se dejó reposar 4 minutos y luego se midió la temperatura y lectura del hidrómetro. Se dejó reposar 2 horas y se repitió el proceso de medida.

Para conocer la textura de la muestra se realizó un tratamiento matemático de los datos y se utilizó el esquema de clasificación textural del suelo.

3.3 Determinación del contenido total de metales traza y asociaciones químicas en los suelos, biosólido y mezclas

- **Procedimiento para la determinación de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn total**

La determinación del contenido total de metales traza en suelos, biosólido y mezclas suelo-biosólido se realizó mediante una digestión ácida y análisis por

Espectroscopía de Absorción Atómica con llama en un equipo Perkin Elmer 1100B.

Para esto se pesaron 200 mg de muestra y se adicionaron 4 mL de HNO₃ 65%, 4 mL de HF 32% y 2 mL de H₂O₂ 37%. La digestión se realizó en horno microondas Milestone 1200 Mega, en un programa de 3 etapas: 5 minutos a 250 W, 5 minutos a 400 W y 10 minutos a 500 W, con un minuto de ventilación. Una vez terminado el programa las muestras se arrastraron con agua destilada a cápsulas de teflón, donde se evaporaron en placa calefactora, hasta aproximadamente 1 mL. Posteriormente las muestras se transfirieron a matraces de 10 mL con HCl 1M y se filtraron con papel Advantec MFS N°1.

• **Procedimiento de Extracción Secuencial de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn**

Para conocer las asociaciones que los metales tienen con el suelo o biosólido, las muestras se extrajeron secuencialmente con el método propuesto por la BCR (Ure, 1993), el cual considera una fracción soluble en ácidos (metal unido a carbonato), fracción reducible (metal asociado a MnO_x/FeO_x), fracción oxidable (metal enlazado a MO) y una fracción residual.

Para extraer cada fracción se siguió el siguiente procedimiento: Se pesaron por triplicado en tubos de centrífuga 500 mg de muestra, se agregaron 20 mL de solución de ácido acético 0,11 M y se dejó agitando durante 16 horas. Luego se centrifugó, y el sobrenadante se almacenó en frascos de polietileno. El residuo se lavó con 10 mL de agua destilada, se agitó durante 15 minutos y se centrifugó, descartándose este sobrenadante y el residuo pasó a la siguiente fase del fraccionamiento, cuyas etapas se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Etapas de fraccionamiento secuencial propuesto por la BCR

Etapa	Extractante	Tratamiento	Suelo:Solución
Fracción Soluble en Ácidos	CH ₃ COOH 0,11 M	Agitación por 16 horas a 22±5°C, centrifugar por 20 minutos	1:40
Fracción Reducible	NH ₂ OH·HCl 0,5 M + HNO ₃ 2 M	Agitación por 16 horas a 22±5°C, centrifugar por 20 minutos	1:40
Fracción Oxidable	a) H ₂ O ₂ 30% b) NH ₄ OAc 1M	a) Digestión 1 h a temperatura ambiente, 1 h en baño de agua a 85±2°C. Volver a agregar H ₂ O ₂ , y calentar 1h baño de agua a 85±2°C b) Agitación por 16 horas a 22±5°C, centrifugar por 20 minutos	a) 1:10 b) 1:50

La fracción residual se determinó por diferencia entre la suma de las fracciones anteriores y el contenido total de metales traza en las muestras.

La concentración de las muestras se determinó por Espectroscopía de Absorción Atómica y Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).

3.4 Determinación de la Biodisponibilidad de metales traza en cultivos de Ballica

Para conocer el contenido de metales traza en las plantas de Ballica se pesaron 500 mg de muestra (raíces y parte aérea molida) y se agregaron 4 mL de HNO₃ 65% y 2 mL DE H₂O₂ 37% y se realizó una digestión en horno microondas Milestone 1200 Mega, utilizando un programa de tres etapas: 5 minutos a 250 W, 5 minutos a 400 W y 10 minutos a 500 W. Una vez concluido el programa las muestras se aforaron en matraces de 10 mL con agua destilada y luego filtraron con papel Advantec MFS N°1.

La concentración en las muestras se determinó por Espectroscopía de Absorción Atómica en un equipo Perkin Elmer 1100B.

3.5 Determinación de la biodisponibilidad de metales traza por DGT

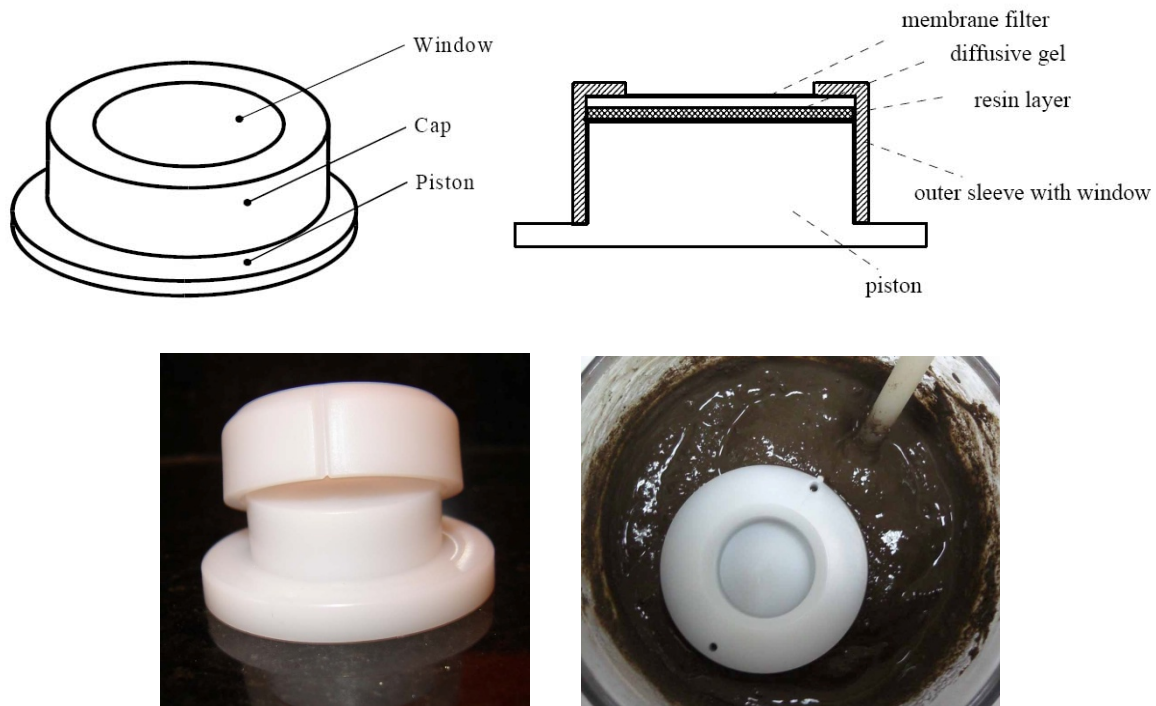
A las muestras de suelo y mezclas de suelo-biosólido en distintas dosis, se les agregó agua de manera de formar una pasta de saturación, la cual se dejó en incubación durante 3 días a 25°C.

El sistema de DGT se preparó colocando encima del soporte el disco de Chelex-100, seguido de un disco de gel difusivo y por último un filtro de membrana. Luego se colocó tapa superior que posee una ventana que queda expuesta a la muestra. Los DGT se desplegaron en las pastas de saturación durante 24 horas, a 25°C en incubadora. En la Figura 1 se muestran fotografías y esquemas del sistema DGT.

Pasado el tiempo requerido, el DGT fue retirado, lavado con agua Milli-Q y secado con papel absorbente. Luego se recuperó la resina-gel rompiendo la tapa del DGT, las que se dispusieron en tubos de ensayo con 5 mL de HNO₃

1M, que se refrigeraron por 24 horas, luego de las cuales se desechó la resina y la solución fue analizada por ICP-MS.

Figura 1. Diagramas dispositivo DGT para suelos y fotografías dispositivo DGT y dispositivo desplegado en suelo.



Por otro lado, luego del despliegue del DGT se tomó una parte de la pasta de saturación y se centrifugó a 2000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante se filtró y conservó para su análisis por ICP-MS, para la determinación de la concentración de agua de poro.

Para conocer la concentración efectiva de metales, fue necesario seguir un tratamiento matemático donde se calculó la masa de metal acumulado en la resina (M), mediante la siguiente ecuación:

$$M = C_{elu} \cdot \frac{(V_{acid} + V_{gel})}{f_e}$$

Donde: C_{elu} : concentración de los metales en solución HNO_3 [$\mu g/l$]

V_{acid} : volumen de ácido HNO_3

agregado a la resina

V_{gel} : volumen de la resina-gel

F_e : factor de elución de cada metal

La concentración de metal medido por el DGT (C_{DGT}) puede ser calculado por:

$$C_{DGT} = \frac{M \cdot \Delta g}{D \cdot t \cdot A}$$

Donde: Δg : espesor de capa de difusión (gel difusivo + filtro de membrana)

D : coeficiente de difusión del metal en la resina-gel

t : tiempo de despliegue

A : área de ventana de exposición

La conversión de C_{DGT} a C_E , concentración de metal que está efectivamente disponible desde la solución de suelo, se realizó mediante la siguiente relación:

$$C_E = \frac{C_{DGT}}{R_{diff}}$$

R_{diff} es la razón de concentración en la interfase del DGT a la concentración en el seno de la solución de suelo, considerándose sólo el caso difusivo. Éste parámetro se calculó usando el modelo numérico computacional del sistema DGT-suelo, DIFS (DGT Induced Fluxes in Sediments). Para el cálculo de R_{diff} es necesario conocer la concentración de partículas (P_c) y la porosidad (ϕ).

3.6 Análisis Estadístico

El análisis estadístico de resultados se realizó con el programa computacional Statgraphics. Se utilizaron los test de análisis de varianza y el test de las mínimas diferencias o test de Tukey, para evaluar las diferencias entre las dosis para cada etapa de la extracción secuencial. Además se realizaron los test de correlación simple en los estudios de biodisponibilidad con el objeto de comparar las respuestas entre cada tratamiento (DGT, cultivos de plantas y extracción secuencial BCR).

4. Resultados y Discusión

4.1 Caracterización de los Suelos

En la Tabla 3 se muestran las características generales de los suelos estudiados. El pH de ambos suelos es neutro, y no hay cambios importantes al aumentar el contenido de biosólidos. La materia orgánica, sin embargo aumenta a medida que se incrementa la dosis de biosólido en el suelo. La capacidad de intercambio catiónico se determinó sólo en los suelos control, y se puede ver una diferencia notoria entre ambos suelos, lo que mostraría un mayor contenido de sales solubles en el suelo de la serie Chicureo. En relación a la textura de los suelos, ambos son clasificados como Franco Arenoso.

Tabla 3. Características generales de los suelos control y enmendados con 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹ de biosólidos BET2008

Análisis	Método	Unidad	Dosis	Suelo	
			Biosólido Mg ha ⁻¹	CHC	MRR
pH	Suelo:Agua 1:2,5	-	0	7,64	7,54
			30	7,64	7,42
			45	7,46	7,42
			60	7,39	7,41
MO	Digestión Ácida	%	0	2,60	3,13
			30	3,25	3,66
			45	3,96	4,22
			60	4,69	5,01
CIC	Saturación con NH ₄ OAc 1 M a pH 7.0	cmol·kg ⁻¹	0	43,0	17,5
Textura	Bouyoucos	-	0	Franco Arenoso	Franco Arenoso

4.2 Determinación contenido total de metales traza y asociaciones químicas de suelos, biosólido y mezclas

4.2.1 Contenido total de metales traza en biosólido, suelos y mezclas

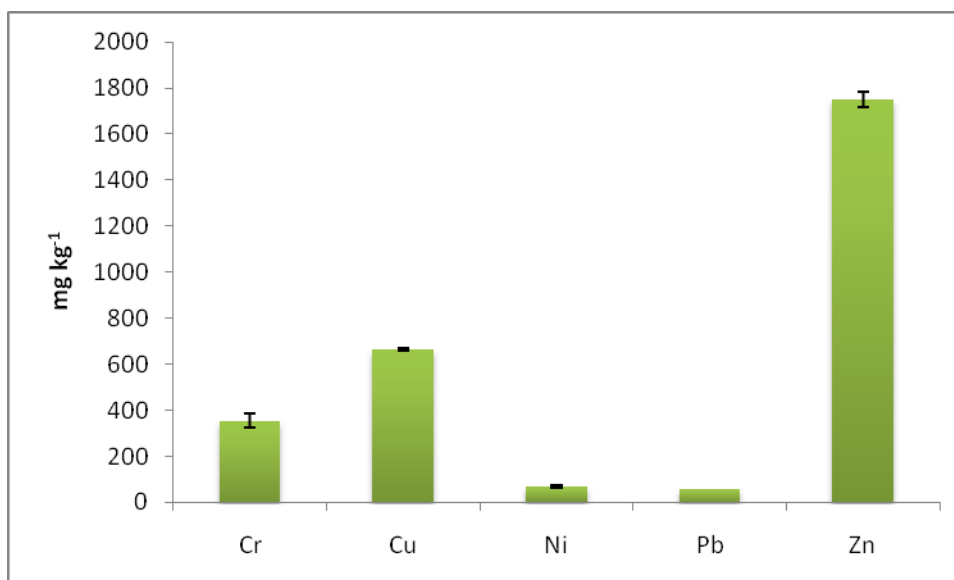
En la Tabla 4 y Figura 2, se muestran los contenidos de metales traza del biosólido utilizado (BET2008).

El contenido de metales totales en el biosólido indica que este biosólido puede ser utilizable en suelos agrícolas, ya que las concentraciones de metales se encuentran bajo los límites permitidos por la norma chilena (DS-4, 2009).

Tabla 4. Contenido total de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en Biosólido El Trebal (BET) 2008

	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
mg kg⁻¹	355	665	69,2	58,9	1750
<i>DER %</i>	<i>8</i>	<i>1</i>	<i>5,9</i>	<i>2,0</i>	<i>2</i>

Figura 2. Contenido total de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en Biosólido El Trebal (BET) 2008



En la Figura 3 se muestran los contenidos de metales totales del suelo de la serie Chicureo y en la Figura 4 se muestran los contenidos de metales totales del suelo de la serie Los Morros.

Se puede observar que en el suelo CHC el contenido total de metales sigue el siguiente orden: Ni < Cr < Pb < Cu < Zn. En el suelo MRR se observa un orden similar, sólo que se invierte el orden de Cr y Ni, siendo el Cr el menos abundante.

La aplicación de biosólidos en ambos suelos produce un incremento en el contenido total de metales traza, aunque éste es dependiente del suelo y del metal (Tabla 1 en Anexo), lo que coincide con estudios anteriores (Ahumada, 2004 y Singh, 2007).

Al aplicar biosólido se produce un aumento estadísticamente significativo en el contenido total de Cr en los dos suelos (Tabla 2 en Anexo). Este metal no está regulado por la norma chilena, sin embargo es importante para el crecimiento de las plantas dependiendo del estado de oxidación a que éstas se encuentren expuestas (Kabata-Pendias, 2001).

Figura 3. Contenido total de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en suelo Chicureo (CHC) control y enmendado con biosólido en dosis 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹

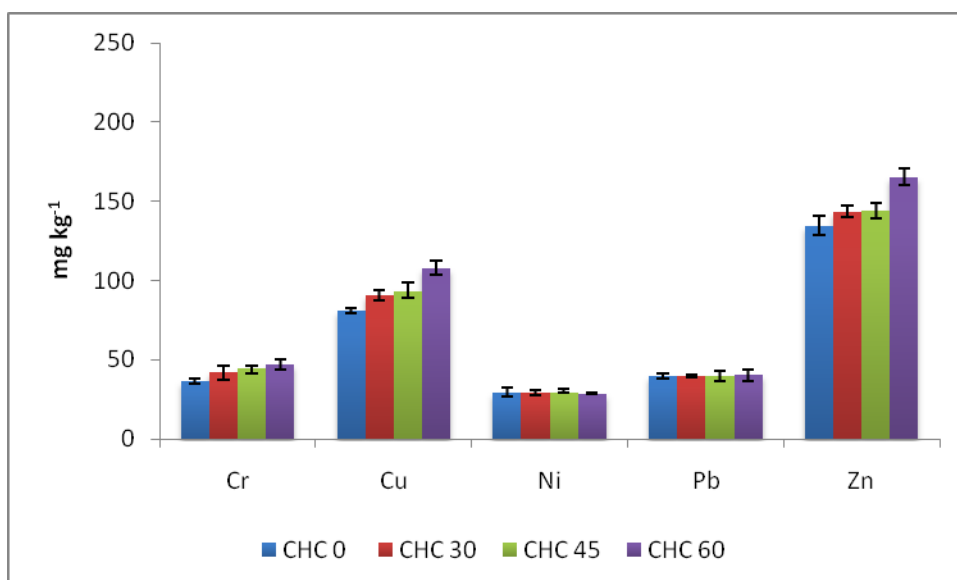
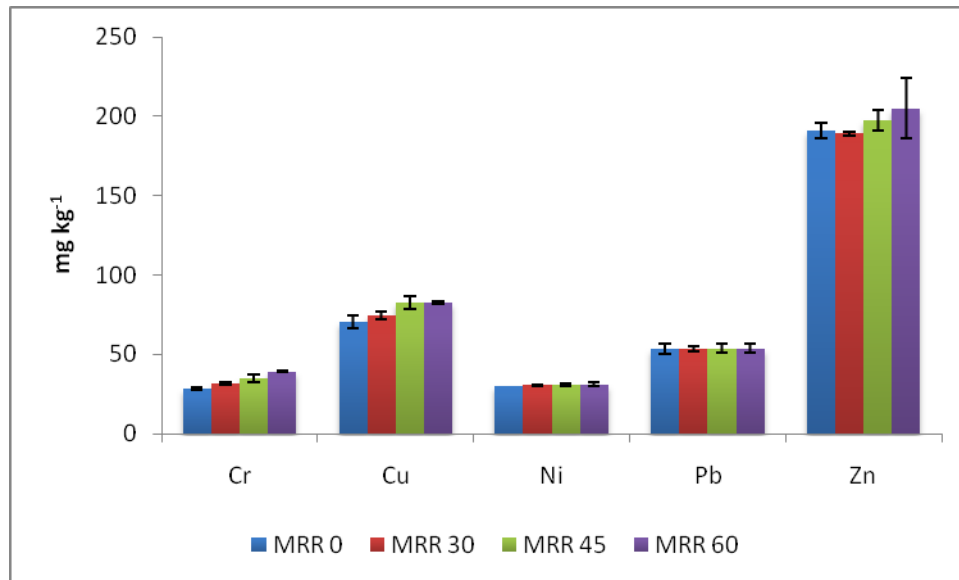


Figura 4. Contenido total de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en suelo Los Morros (MRR) control y enmendado con biosólido en dosis 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹



El suelo CHC muestra un mayor contenido de Cu que el suelo MRR. En ambos suelos el contenido de Cu antes de la aplicación de biosólidos en suelo agrícolas se encuentra bajo el límite impuesto por la norma (150 mg kg^{-1}), por lo que la aplicación de biosólidos es factible de realizar (DS-4, 2009). En ambos casos como era de esperar, la aplicación de biosólidos incrementa significativamente el contenido de metal total de Cu en los suelos (Tabla 3 en Anexo).

Para el caso del Ni el suelo MRR presenta la mayor concentración, sin embargo la diferencia entre ambos valores no es significativa. Para ambos suelos la incorporación de biosólido no origina un incremento significativo del contenido de Ni en el suelo (Tabla 4 en Anexo), debido a la baja concentración de este elemento en el biosólido. Al igual que Cu, el contenido total de Ni en los suelos se encuentra dentro de los límites permitidos por la norma, por lo cual es viable la aplicación de este biosólido (DS-4, 2009).

El mayor contenido de Pb lo presenta el suelo MRR. La concentración del metal en ambos suelos se encuentra bajo los límites permitidos por la norma para suelos agrícolas (75 mg kg^{-1}) (DS-4, 2009). Con la aplicación de biosólido no

se encuentran diferencias significativas en el contenido total de Pb en los suelos (Tabla 5 en Anexo).

El mayor contenido de Zn lo presenta el suelo MRR, que incluso supera el límite de la norma para la evaluación del uso de biosólidos en suelos agrícolas (175 mg kg^{-1}), con un valor de 191 mg kg^{-1} (DS-4, 2009). El suelo CHC, en cambio se encuentra bajo los límites permitidos. En ambos suelos se observa un aumento en el contenido total de Zn con la aplicación de biosólidos, sin embargo sólo existen diferencias significativas en el suelo CHC cuando se aplica la dosis 60 Mg ha^{-1} (Tabla 6 en Anexo), y en el caso del suelo MRR, en general se presenta un incremento en la concentración del metal, pero las diferencias observadas no son significativas.

4.2.2 Extracción secuencial de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn

La extracción secuencial BCR, nos da información sobre las formas químicas en que se encuentran los metales traza en el suelo, definiéndose cuatro fracciones: soluble en ácido, reducible, oxidable y residual. En las figuras que siguen en esta sección (Figura 5 – Figura 14) se puede ver que en ambos suelos, para todos los metales, antes y después de la incubación, la fracción más importante es la residual, y la menor es la fracción soluble en ácidos, correspondiente a la fracción soluble, intercambiable y unido a carbonatos, la que daría cuenta del metal lábil, y por lo tanto disponible para las plantas, que en general presenta un aumento de concentración con la aplicación de biosólidos (Ahumada, 2007).

- **Cromo**

En la Figura 5 y 6 se puede ver la distribución porcentual de Cr en los suelos CHC y MRR respectivamente, tratados con las distintas dosis de biosólido, antes y después de la incubación.

En ambos suelos se puede observar que la fracción predominante es la residual. Esta fracción generalmente disminuye al aumentar la dosis de biosólido aplicado. Sin embargo, después del proceso de incubación no se observa una tendencia clara, ya que en general, en el suelo CHC esta fracción aumenta y en el suelo MRR con excepción de la dosis 30 Mg ha⁻¹, disminuye.

En ambos suelos, con el incremento en las dosis de biosólidos aplicado, se observa un aumento significativo de las fracciones de Cr soluble en ácido, reducible y oxidable, sobre todo en esta última, que correspondería a los metales asociados a la materia orgánica (Tabla 2 en Anexo).

En general, como consecuencia de la incubación de los suelos se produce una disminución en el contenido de Cr en las tres primeras fracciones consideradas, con el consecuente incremento en la fracción residual, pero dicho aumento sólo fue observado en algunos casos.

Figura 5. Distribución porcentual de Cr extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Chicureo (CHC) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹, antes (A) y después (D) de incubación

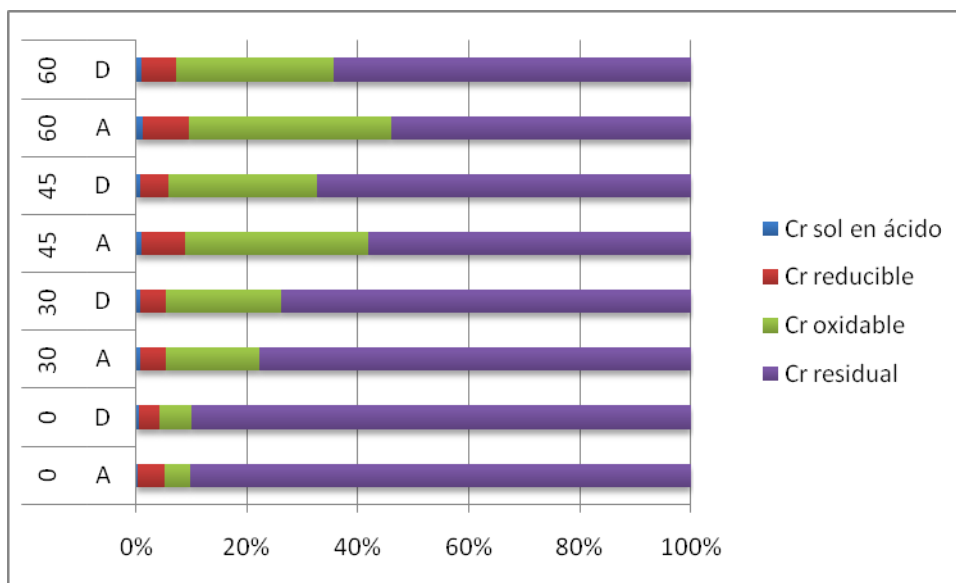
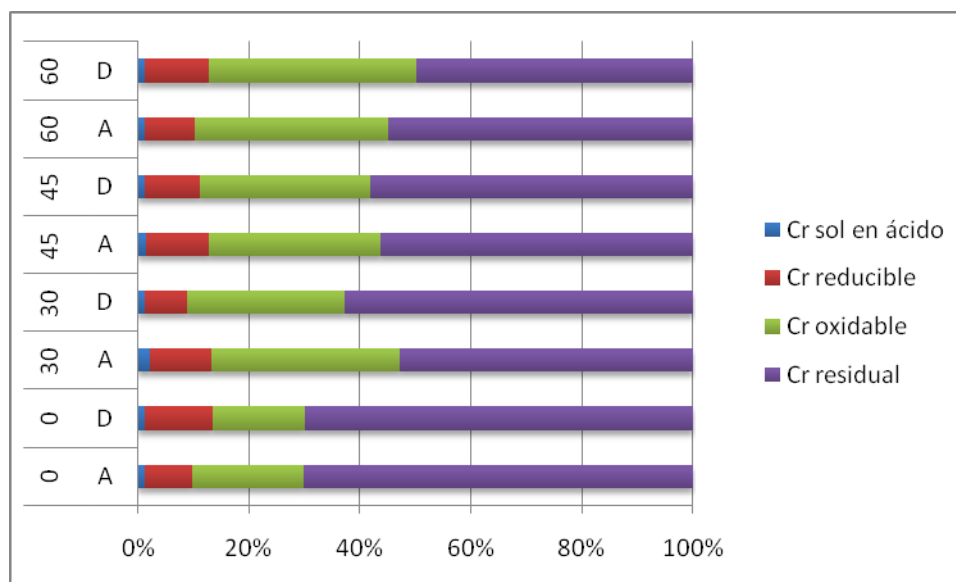


Figura 6. Distribución porcentual de Cr extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Los Morros (MRR) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹, antes (A) y después (D) de incubación



- **Cobre**

En la Figura 7 y 8, se muestran la distribución porcentual de Cu en los suelos CHC y MRR respectivamente, antes y después de la incubación.

En ambos suelos la fracción residual es la predominante, pero en el suelo MRR ésta corresponde sólo alrededor del 40% del contenido total de Cu del suelo. La aplicación de biosólido a los suelos y el proceso de incubación no muestran una clara tendencia de los resultados obtenidos respecto a esta fracción.

Entre ambos suelos se encuentra una clara diferencia de la forma de Cu soluble en ácido y la oxidable, que en el suelo MRR son notoriamente más altas. La incorporación de biosólidos genera un aumento significativo de las fracciones de Cu soluble en ácido, oxidable y reducible, pero cuando los suelos son tratados con 60 Mg ha⁻¹ de biosólido, se observa un efecto contrario en ambas fracciones (Tabla 3 en Anexo).

El proceso de incubación no tiene influencia en la distribución de las distintas formas de Cu en los suelos.

Figura 7. Distribución porcentual de Cu extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Chicureo (CHC) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹, antes (A) y después (D) de incubación

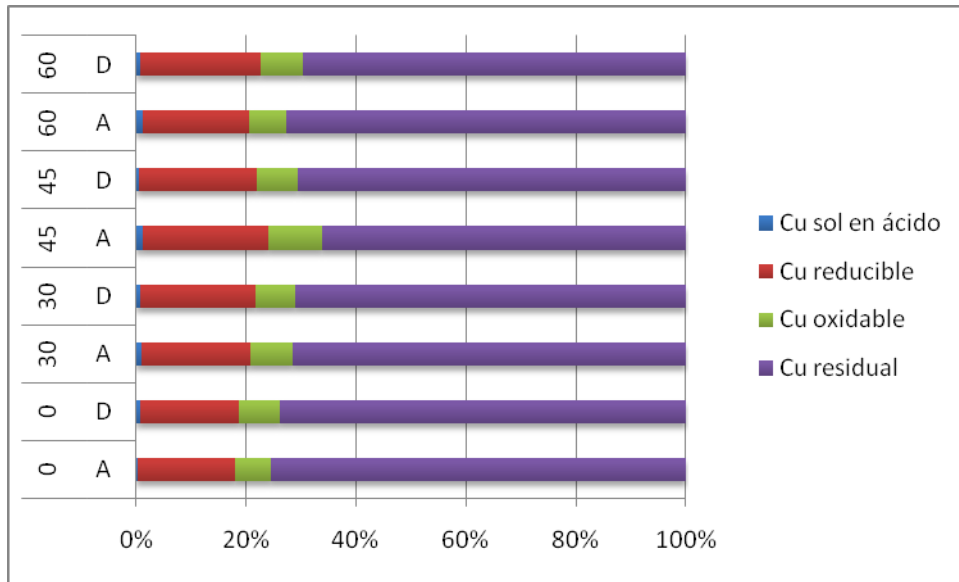
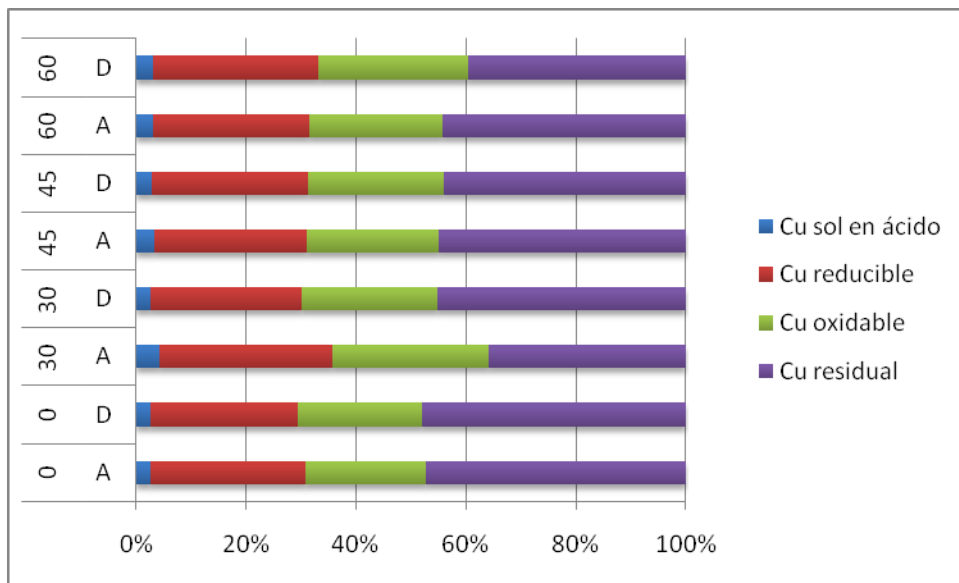


Figura 8. Distribución porcentual de Cu extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Los Morros (MRR) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹, antes (A) y después (D) de incubación



- **Níquel**

En la Figura 9 y 10, se muestra la distribución porcentual de Ni en el suelo CHC y MRR respectivamente, antes y después de la incubación.

Al igual que en los demás metales, en ambos suelos, la fracción más importante de Ni es la residual. Como consecuencia de la aplicación de biosólidos la fracción residual disminuye con el aumento de dosis en el suelo MRR, en cambio el suelo CHC presenta el efecto contrario. Al incubar los suelos, se encuentra que esta fracción disminuye en los suelos tratados con las distintas dosis de biosólido.

Níquel es el metal que se presenta en mayor proporción en la fase lábil del suelo, siendo mayor en el suelo MRR. Esta fracción aumenta significativamente con el incremento en las dosis de biosólido, y disminuye con la incubación de los suelos. La fracción reducible en general se presenta un aumento significativo de la fracción reducible de Ni. Después de la incubación la fracción reducible de Ni aumenta en el suelo CHC y disminuye en el suelo MRR. La fracción oxidable muestra esta misma tendencia, aumentando en el suelo CHC y disminuyendo en el suelo MRR con la incorporación del biosólido. Ambos suelos presentan una disminución de la fracción de Ni oxidable al incubar los suelos (Tabla 4 en Anexo).

Figura 9. Distribución porcentual de Ni extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Chicureo (CHC) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹, antes (A) y después (D) de incubación

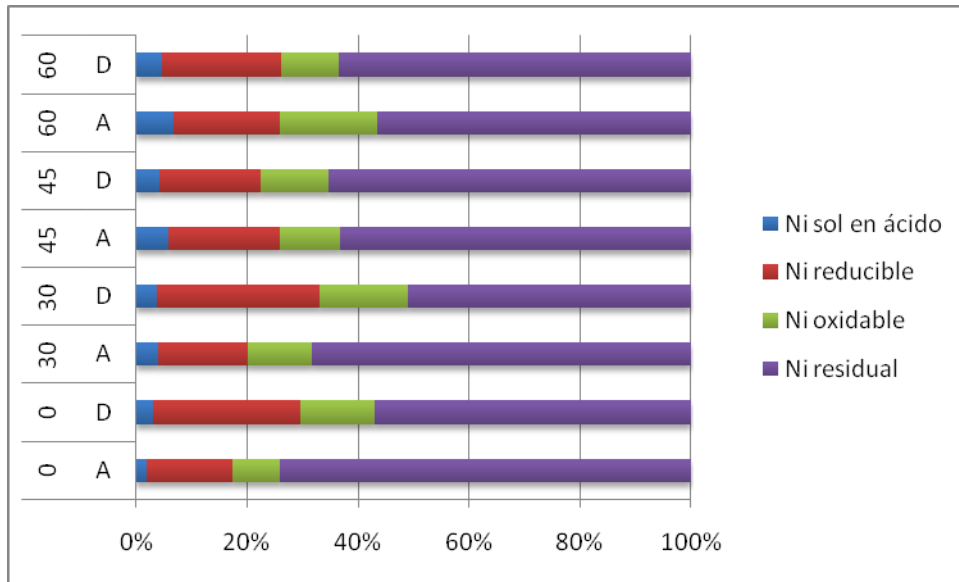
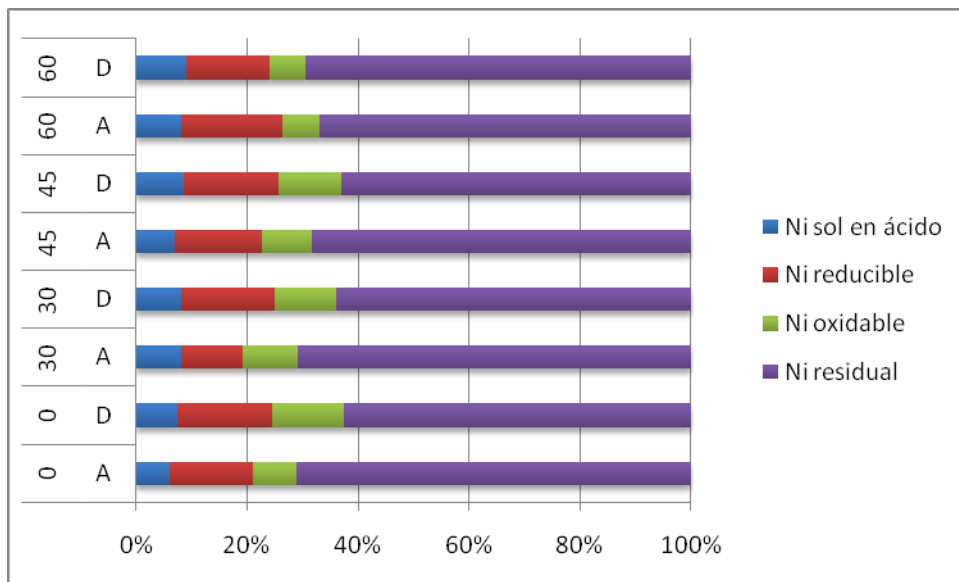


Figura 10. Distribución porcentual de Ni extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Los Morros (MRR) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹, antes (A) y después (D) de incubación



- **Plomo**

La Figura 11 y 12 muestran la distribución porcentual de Pb en el suelo CHC y MRR respectivamente, a diferentes dosis de biosólido y en condiciones antes y después de la incubación.

La fracción más importante es la residual, seguida de fracción reducible, oxidable y por último la fracción soluble en ácido, que en ambos suelos prácticamente no es detectable. Con respecto a la aplicación de biosólidos en ambos suelos la fracción lábil de Pb aumenta, con la dosis de biosólido. Sin embargo el resto de las fracciones no muestran un comportamiento regular. Respecto de la incubación de los suelos, en ambos se encuentra que, salvo algunas excepciones, todas las fracciones de Pb disminuyeron con el tiempo de incubación. En ninguno de los casos se presentan diferencias significativas (Tabla 5 en Anexo).

Figura 11. Distribución porcentual de Pb extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Chicureo (CHC) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹, antes (A) y después (D) de la incubación

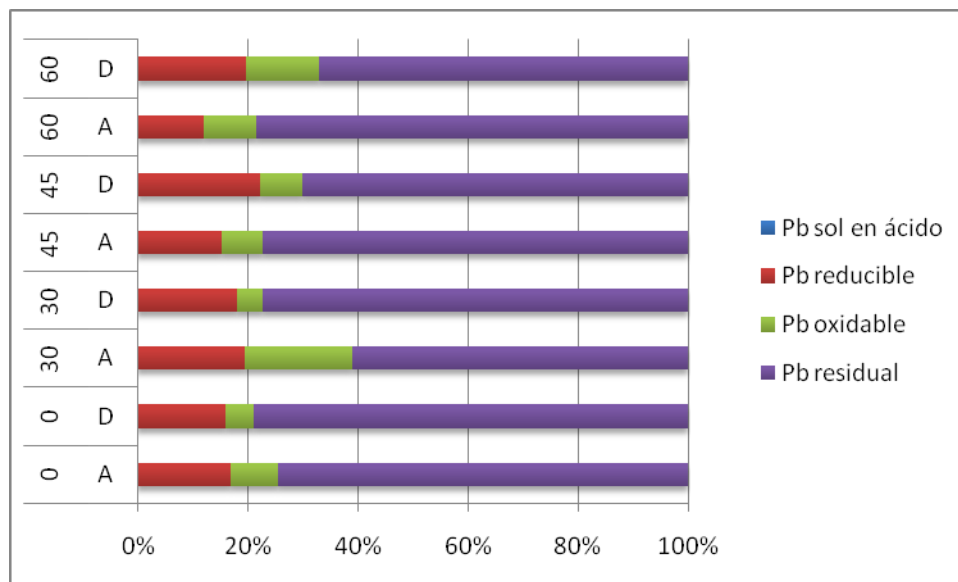
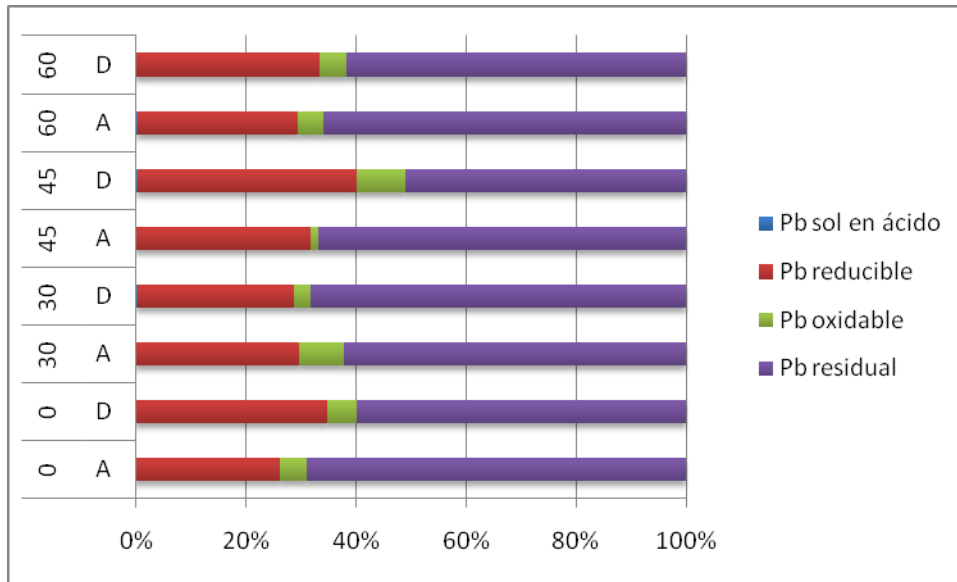


Figura 12. Distribución porcentual de Pb extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Los Morros (MRR) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹, antes (A) y después (D) de la incubación



- **Zinc**

La Figura 13 y 14 muestran la distribución porcentual de Zn en el suelo CHC y MRR respectivamente, y el efecto de la aplicación de biosólido, antes y después de la incubación.

En ambos suelos la fracción dominante es la residual. En el suelo CHC la fracción residual disminuye al aumentar la dosis de biosólido, sin embargo en el suelo MRR no se puede identificar una tendencia en el comportamiento de esta fracción con respecto a la aplicación de biosólido. En ambos casos, se puede apreciar que el contenido de Zn en la fracción residual disminuye después de la incubación.

Ambos suelos muestran un incremento de la disponibilidad de Zn, representada por el aumento del metal en la fracción soluble en ácido. La fracción soluble en ácido aumenta significativamente con la aplicación de biosólido, principalmente con la dosis 30 Mg ha⁻¹, para luego disminuir y mantenerse cuando se trata con las dosis más altas. En ambos suelos después

de la incubación, esta fracción en los suelos enmendados con biosólido disminuye respecto al suelo control (Tabla 6 en Anexo).

En el suelo CHC las fracciones de Zn reducible y oxidable, presentan una dependencia directa con la aplicación de dosis crecientes de biosólidos. En cambio, en el suelo MRR éstas aumentan cuando se aplican 30 Mg ha⁻¹, sin experimentar cambio alguno a mayores dosis de aplicación. Con respecto a la incubación de los suelos, sólo se observa variación en ambas fracciones del suelo CHC, ya que la fracción reducible disminuye mientras que la oxidable aumenta.

Figura 13. Distribución porcentual de Zn extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Chicureo (CHC) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹, antes (A) y después (D) de la incubación

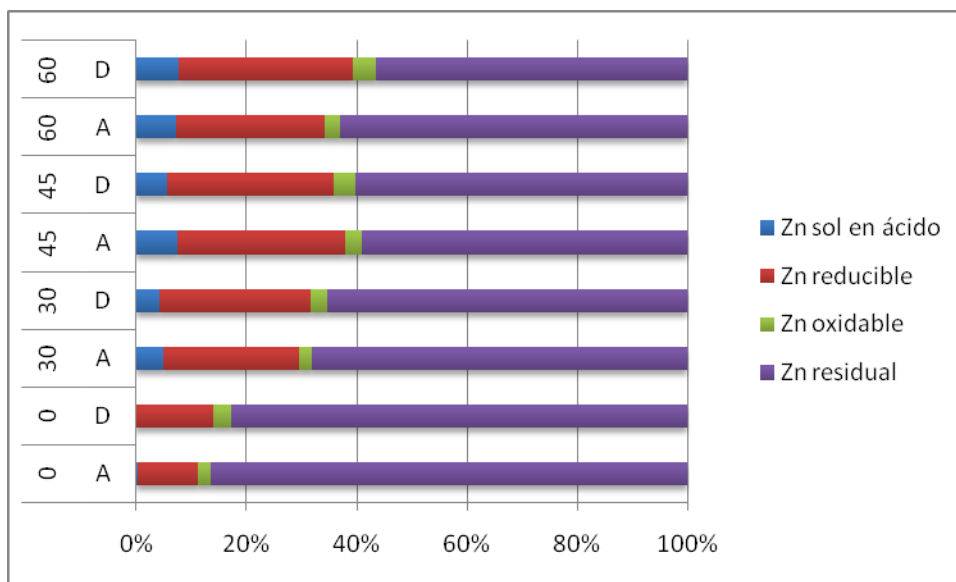
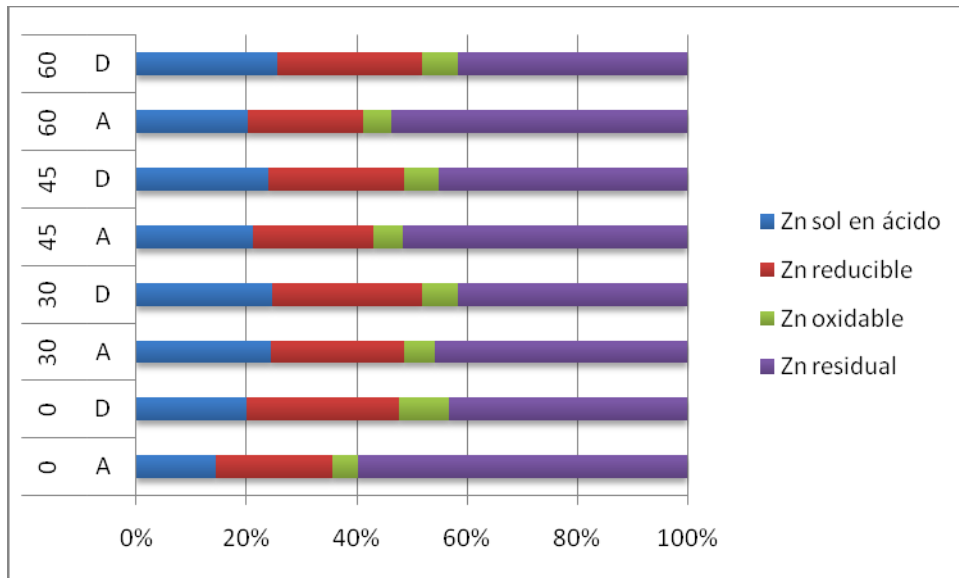


Figura 14. Distribución porcentual de Zn extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Los Morros (MRR) control y enmendado con dosis de 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹, antes (A) y después (D) de la incubación



4.3 Biodisponibilidad de metales traza en cultivos de Ballica

En las Figura 15 y Figura 16 se muestran los contenidos de elementos traza en los cultivos de Ballica con suelos CHC y MRR, respectivamente, a diferentes dosis de biosólido.

Se puede ver que los metales más absorbidos por la planta son Zn y Cu, lo cual concuerda con que son estos dos metales, los que se encuentran en mayor cantidad en los suelos. Además se puede observar que las plantas cultivadas en el suelo MRR, poseen un contenido mayor de estos elementos que en las cultivadas en el suelo CHC, lo que está de acuerdo con el contenido total de los metales en los suelos. El elemento que se encuentra en menor concentración en ambos cultivos es el Pb, lo que no da cuenta respecto del contenido total de Pb en los suelos, que tanto en CHC y MRR corresponde al tercer metal en mayor concentración. Por otra parte Ni y Cr se encuentran en los cultivos realizados en ambos suelos en niveles similares, que concuerda con el contenido total de los suelos para Ni y Cr. En cambio respecto de Pb su

contenido total en el suelo MRR es mayor que en el suelo CHC, dicha diferencia no se ve reflejada en el caso de los cultivos, pero hay que considerar que la fracción de Pb soluble en ácido en ambos suelos es mínima.

Uno de los factores que están relacionados con la disponibilidad de los metales para las plantas es la CIC del suelo con un efecto inverso, es decir, a mayor CIC existe una menor biodisponibilidad, ya que existe una mayor cantidad de sitios de adsorción para inmovilizar los metales en el suelo (Kabata-Pendias, 2001). En los suelos control, el suelo MRR presenta una mayor biodisponibilidad de los elementos, sobre todo Cu y Zn, lo que concuerda ya que este suelo posee una CIC bastante menor que el suelo CHC. El pH también es un factor que influye en la disponibilidad de los metales, a mayor pH hay una menor biodisponibilidad. Aunque en este caso los pH de ambos suelos son similares, el suelo CHC posee un pH levemente mayor, lo que se traduciría en una menor disponibilidad, ya que los iones metálicos pueden encontrarse precipitados o adsorbidos.

Al aplicar dosis crecientes de biosólidos, se observa que el contenido de Cu se incrementa sólo en el suelo CHC, mientras que el contenido de Zn se incrementa en ambos suelos llegando a nivel constante luego de 45 Mg ha^{-1} . Los contenidos de Cr, Ni y Pb y Cu en los cultivos de Ballica cultivados en el suelo CHC, llegan a un máximo para luego decrecer, al igual que el contenido de Cu en el suelo MRR. Esto se debe a que con el aumento del contenido de materia orgánica por la aplicación de biosólidos al suelo, se produce una disminución de la absorción de los elementos traza. La causa de este fenómeno sería la mayor ocurrencia de que se formen complejos organometálicos, de gran tamaño, que no son absorbidos por las plantas (Acevedo, 2005). Otra explicación para este fenómeno, puede ser que las plantas hayan alcanzado su límite de toxicidad para ciertos elementos, y en estas condiciones las plantas limitan la absorción de metales eficientemente, debido a que tienen mecanismos de defensa al estrés metálico (Almas, 2006).

Figura 15. Contenido de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en cultivos de Ballica en suelo Chicureo (CHC) control y enmendado con biosólido en dosis 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹

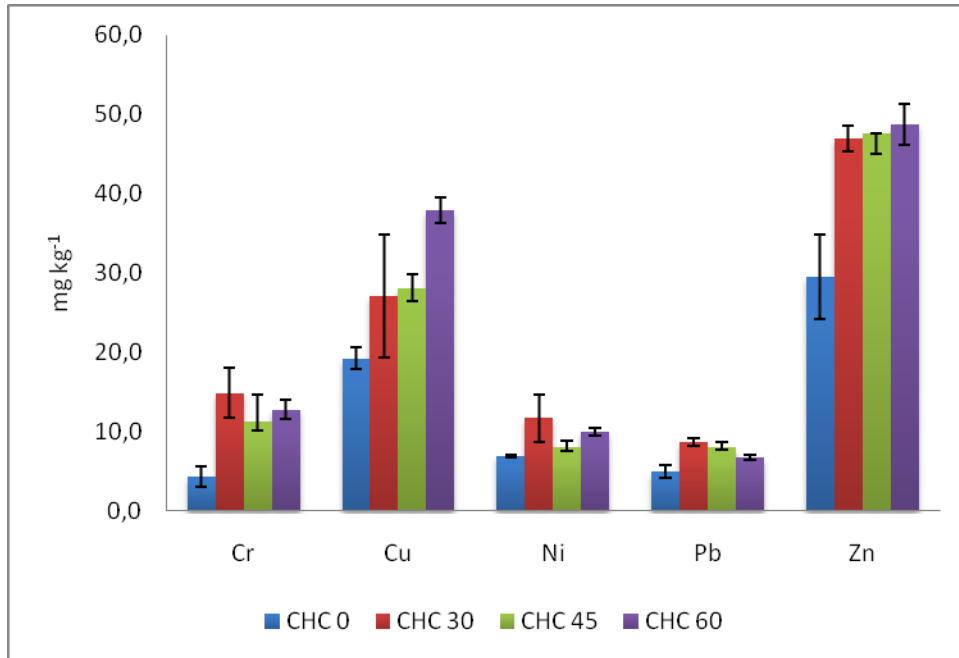
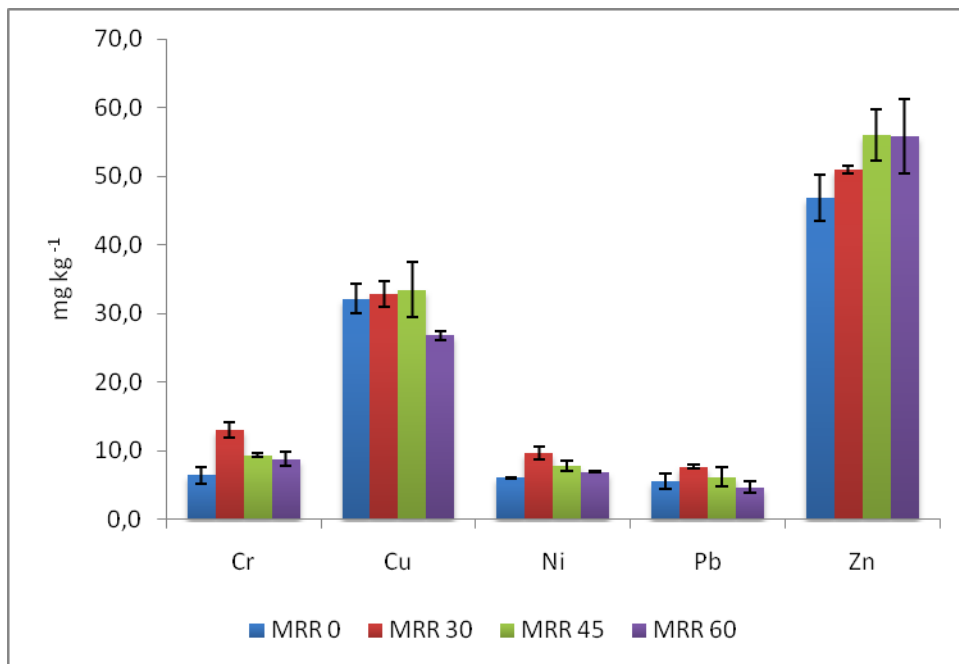


Figura 16. Contenido de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en cultivos de Ballica en suelo Los Morros (MRR) control y enmendado con biosólido en dosis 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹



4.4 Determinación de C_E a través de la técnica DGT

En la Tabla 5 se muestra las concentraciones DGT, calculadas a partir de la concentración que se eluyen desde la resina Chelex, y que por lo tanto corresponden a la masa de metal absorbido por el dispositivo DGT. También se muestra la concentración de metal que posee el poro de agua en cada suelo a distintas dosis de biosólido. Con estos valores, luego se puede obtener la concentración efectiva (C_E), que se relaciona con la fracción disponible para las plantas.

Se puede ver que la concentración de metal en agua de poro (C_{sol}) y la concentración DGT (C_{DGT}) aumentan con la aplicación de biosólidos, lo que se encuentra de acuerdo con el aumento del contenido total de metales en el suelo con el biosólido, y en el caso de la C_{DGT} , por lo tanto también un aumento en la absorción de metales por el dispositivo DGT.

Tabla 5. Concentración DGT y concentración en agua de poro, en suelos CHC y MRR tratados con dosis 0, 30, 45 y 60 Mg ha⁻¹ de biosólido BET2008

Dosis Mg ha ⁻¹	Cr		Cu		Ni		Zn	
	C_{DGT} μg/L	C_{sol} nmol/mL	C_{DGT} μg/L	C_{sol} nmol/mL	C_{DGT} μg/L	C_{sol} nmol/mL	C_{DGT} μg/L	C_{sol} nmol/mL
<i>Suelo Chicureo</i>								
0	0,661	0,041	8,54	0,774	5,70	0,579	48,9	0,554
30	9,55	0,096	16,1	0,512	13,4	1,44	416	0,626
45	5,64	0,156	11,4	0,508	11,8	2,31	470	0,928
60	21,1	0,180	12,6	0,897	18,4	2,53	596	1,52
<i>Suelo Los Morros</i>								
0	N.D.	0,140	17,1	1,32	4,95	1,64	6,90	1,00
30	N.D.	0,113	14,6	1,61	7,09	1,08	13,6	0,839
45	N.D.	0,204	8,82	1,87	8,90	2,07	13,6	1,39
60	N.D.	0,245	7,56	2,32	8,82	2,27	14,0	1,70

N.D.: no detectado

En la Tabla 6, se muestran los resultados obtenidos en la determinación de la biodisponibilidad de elementos traza en suelos mediante la técnica de DGT. Se puede observar que en general se produce un aumento en la C_E con el aumento de las dosis de biosólido.

Sin embargo se producen algunas excepciones a este comportamiento, siendo el mejor ejemplo el suelo CHC con una dosis de 30 Mg ha^{-1} de biosólido aplicado. Se puede observar que en este caso, para los metales Cr, Cu y Ni se presenta una mayor concentración de estos metales que en las dosis que le siguen. Esto podría tener varias razones, entre ellas: una homogeneización deficiente de la muestra, o que el dispositivo DGT no se haya desplegado bien en el suelo. Esto también podría dar una explicación a las elevadas desviaciones estándar relativas que se obtienen.

Tabla 6. Concentración Efectiva (C_E) determinada mediante la técnica DGT y la aplicación computacional DIFS, para los suelos CHC y MRR a dosis 0, 30, 45 y 60 Mg ha^{-1} de biosólido BET 2008

Dosis Mg ha^{-1}	Cr		Cu		Ni		Pb		Zn	
	C_E $\mu\text{g/L}$	<i>DER</i> %	C_E $\mu\text{g/L}$	<i>DER</i> %	C_E $\mu\text{g/L}$	<i>DER</i> %	C_E $\mu\text{g/L}$	<i>DER</i> %	C_E $\mu\text{g/L}$	<i>DER</i> %
<i>Suelo Chicureo</i>										
0	15,1	-	217	19,6	139	1,0	N.D.		1228	-
30	219	52,4	406	72,1	327	21,9	N.D.		10458	-
45	129	24,7	290	30,9	289	13,7	N.D.		11795	-
60	483	78,1	321	43,6	450	27,5	N.D.		14925	-
<i>Suelo Los Morros</i>										
0	N.D.		441	11,2	123	23,1	N.D.		176	48,9
30	N.D.		376	58,8	176	7,4	N.D.		347	7,1
45	N.D.		227	15,2	221	31,4	N.D.		345	19,3
60	N.D.		195	3,7	219	8,2	N.D.		358	10,2

N.D.: no detectable

4.5 Comparación entre los distintos métodos para la determinación de biodisponibilidad de metales en las plantas

Actualmente se usan una serie de métodos para la determinación de la biodisponibilidad de metales traza en los suelos, entre ellos métodos en sistemas vivos, como son los cultivos de plantas. También se pueden llevar a cabo métodos químicos, como la extracción secuencial, éstos son criticados principalmente porque pueden cambiar la composición química del suelo por la agresividad de los reactivos y en general, puede extraer una cantidad mayor de metal que la que está disponible para la planta (Sonmez, 2004). La técnica DGT, al igual que las plantas reduce localmente la concentración en la solución de suelo, incluyendo el reabastecimiento desde la fase sólida, dos factores que se consideran al determinar la C_E mediante el modelo matemático computacional DIFS, por lo tanto es posible relacionar este término con al biodisponibilidad de los metales en los suelos (Zhang, 2001).

De esta manera, los resultados obtenidos de contenido de metales en los cultivos de Ballica, la concentración en la fracción soluble en ácido de la extracción secuencial de los suelos y la C_E determinada por DGT-DIFS, se relacionaron a través de un análisis de regresión simple para evaluar la eficiencia de estas técnicas en la estimación de la biodisponibilidad de metales.

En la Tabla 7 se muestran los coeficientes de correlación obtenidos en la comparación de estas técnicas para cada suelo y metal.

Tabla 7. Coeficientes de Correlación (R) para la comparación de los tres métodos de determinación de biodisponibilidad

R (coeficientes de correlación análisis de regresión simple)					
	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
<i>Correlación Cultivos de Ballica – C_E</i>					
CHC	n.c.	0,9656	0,9918	-	0,9714
MRR	-	n.c.	n.c.	-	0,8556
<i>Correlación Fracción Soluble en Ácido – C_E</i>					
CHC	0,8694	0,9972	0,8563	-	0,9833
MRR	-	n.c.	0,8661	-	0,9576
<i>Correlación Fracción Soluble en Ácido – Cultivos de Ballica</i>					
CHC	0,9905	0,9435	0,8552	n.c.	0,9463
MRR	0,9950	n.c.	n.c.	n.c.	0,6808

n.c.: No se encontró correlación; - : datos no disponibles

- **Correlación Cultivos de Ballica y C_E**

Se puede observar que para el caso del suelo CHC, se produce una buena correlación para el contenido de Cu entre las dos metodologías, con un R = 0,9655. Sin embargo para el suelo MRR no se encontró correlación entre estas variables, ya que los valores de C_E decrecen al aumentar la dosis de biosólido, lo que no concuerda con la teoría de la técnica DGT, que asevera que a mayor concentración de metales en el suelo mayor debiera ser la absorción producida por la resina Chelex, ni tampoco con los datos de biodisponibilidad en cultivos de Ballica donde al aumentar la dosis de biosólido se aumenta el contenido de Cu en las plantas.

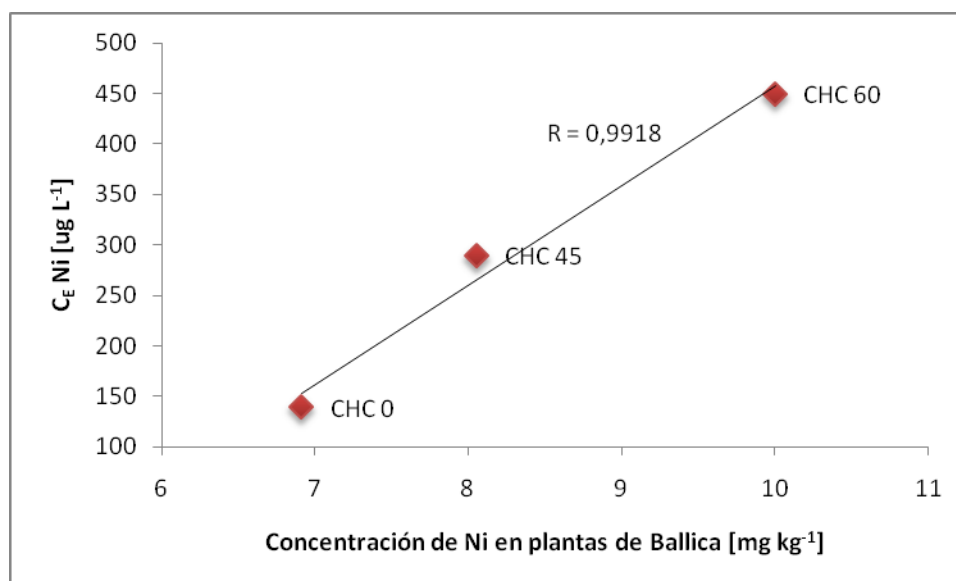
Para el Zn, se encontró una correlación con un R = 0,9714 en el caso del suelo CHC y un R = 0,8556 para el suelo MRR, entre las variables C_E y los contenidos de Zn en las plantas de Ballica. Cabe destacar, que de los metales determinados el Zn fue el único donde se encuentra un coeficiente de correlación apropiado para ambos suelos, por lo que podría confirmar el uso de esta nueva técnica para la estimación de la fracción de Zn biodisponible.

Al igual que para el Cu, en el caso del Ni se pudo obtener una buena correlación ($R = 0,9918$) en el caso del suelo CHC (Figura 17). En cambio en el suelo MRR no se encontró correlación, porque aunque las concentraciones efectivas encontradas presentan un orden creciente con la aplicación de distintas dosis de biosólidos, esto no se cumple en los contenidos de Ni en las plantas, posiblemente el aumento del contenido de materia orgánica en el suelo influye en una menor disponibilidad de éste.

En el caso de Cr, éste sólo se pudo detectar en el suelo CHC, y no se encontró una correlación entre las variables consideradas de C_E y contenido de Cr en las plantas de Ballica.

Mediante la técnica DGT no fue posible detectar concentraciones de Pb por sobre el límite de detección del equipo de ICP-MS, así como Cr en el suelo MRR.

Figura 17. Comparación entre C_E y la concentración en cultivos de Ballica de Ni en suelo CHC, a distintas dosis de biosólido



- **Correlación entre la fracción soluble en ácido y C_E**

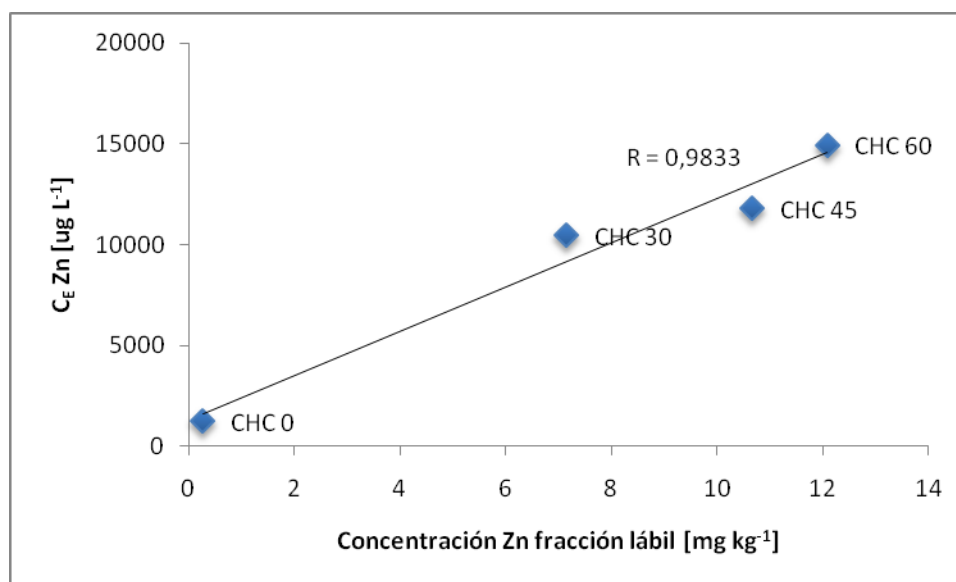
Con la concentración efectiva obtenida con la técnica DGT, además se realizó una correlación simple de la primera fracción de la Extracción Secuencial BCR, fracción soluble en ácido, la cual se relaciona con la cantidad de metal en el suelo que se encuentra disponible para las plantas. Se encontró que los coeficientes de correlación entre estas variables presentan un mejor ajuste que la relación entre C_E y el contenido de los metales en los cultivos de plantas de Ballica.

Para el Cu, en el suelo CHC se obtiene un $R = 0,9972$. En el caso del suelo MRR no es posible realizar una correlación satisfactoria, ya que los valores de C_E no presentan la tendencia que teóricamente debiera seguir frente a la aplicación de biosólidos, es decir con el aumento en el contenido de metales en el suelo, la absorción producida por el dispositivo DGT debiera aumentar, y en este caso disminuye.

Para el Zn, las correlaciones entre C_E y la primera fracción de la extracción secuencial presentan buenos coeficientes de correlación en ambos suelos, $R = 0,9833$ para el suelo CHC (Figura 18) y $R = 0,9576$ para el suelo MRR. Esto concuerda con lo encontrado en la correlación realizada con los cultivos de plantas de Ballica, donde el Zn es el metal en que se encontraron las mayores correlaciones. Sin embargo, en este caso los coeficientes de correlación son mayores, especialmente en el caso del suelo MRR, esto podría deberse a que ambas técnicas son estimativas, ya que no consideran los factores que afectan la absorción de los metales por las plantas (Sonmez, 2005).

En el caso del Ni en ambos suelos y el Cr en el suelo CHC, encontramos coeficientes de correlación menores que para el caso de Cu y Zn, con $R = 0,8563$ para Ni en el suelo CHC, $R = 0,8661$ para Ni en el suelo MRR y $R = 0,8694$ para Cr en el suelo CHC. Esto se debe principalmente a que los valores de C_E en estos metales no presentan una clara tendencia frente a la aplicación de biosólidos, dando mayor dispersión a los datos obtenidos.

Figura 18. Comparación entre C_E y fracción soluble en ácido de Zn en suelo CHC, a distintas dosis de biosólido



- **Correlación entre la fracción soluble en ácido y los cultivos de Ballica**

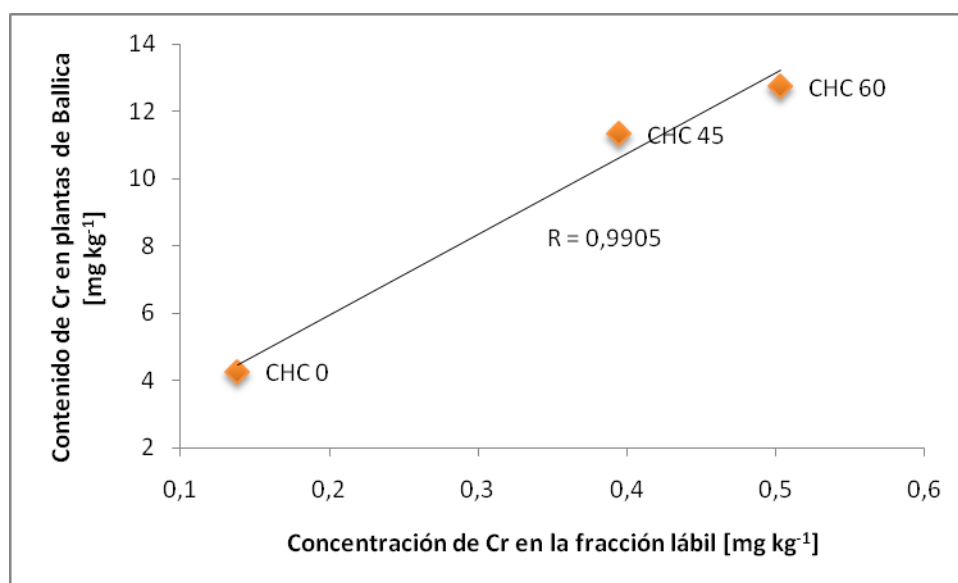
Al igual que las correlaciones realizadas entre los contenidos metálicos en los cultivos de Ballica y C_E , en las correlaciones efectuadas entre la fracción lábil de metal en los suelos y los contenidos de metal en los cultivos de Ballica, los resultados no fueron totalmente satisfactorios. Esto podría explicarse porque ambas técnicas (extracción secuencial y DGT) no consideran algunos factores que influyen en la absorción de metales por las plantas.

Para el Cu, sólo fue posible realizar una correlación en el suelo CHC obteniéndose un $R = 0,9435$. En el caso del suelo MRR no se encontró correlación entre ambas variables, debido a que ninguna de ellas presenta una tendencia clara respecto a la aplicación de biosólidos.

Al igual que en las dos correlaciones realizadas anteriormente, el Zn presenta correlaciones en ambos suelos con valores de $R = 0,9463$ y $R^2 = 0,6808$, para el suelo CHC y MRR respectivamente. El Cr, es en este caso el metal que presenta mejores coeficientes de correlación de $R = 0,9905$ y $R = 0,9950$ en

los suelos CHC (Figura 19) y MRR respectivamente. Níquel presenta correlación de estas variables sólo en el suelo CHC, con un $R^2 = 0,8552$, en cambio en el suelo MRR no se presentó una correlación, ya que al igual que para el Cu ninguna de las dos variables presenta una tendencia clara que dé cuenta del comportamiento de los metales a distintas dosis de biosólido. En el Pb, no se encontraron correlaciones en ninguno de los suelos.

Figura 19. Comparación entre el contenido de Cr en los cultivos de Ballica y la fracción lábil del suelo CHC, a distintas dosis de biosólido



5. Conclusiones

- El orden del contenido total de los metales en el biosólido fue: $Zn > Cu > Cr > Ni > Pb$. Todas las concentraciones se encuentran bajos los límites definidos por la norma chilena.
- La aplicación de biosólidos produce un aumento en el contenido total de metales traza en los suelos. Para Cr, Cu y Zn estas diferencias fueron significativas. Con excepción del suelo MRR para Zn, las concentraciones de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn se encuentran dentro de los límites fijados por la norma chilena, por lo tanto podría utilizarse biosólido como enmienda.
- Todos los metales determinados se encuentran mayoritariamente en la fracción residual de los suelos. Con la aplicación de biosólidos se genera un aumento principalmente de las fracciones soluble en ácido y oxidable. El Cr, Cu, Ni y Zn presentan diferencias significativas en todas o algunas de sus fracciones frente a la aplicación de biosólidos.
- Con respecto a la incubación de los suelos, no se presenta una tendencia general en el comportamiento de los metales. Los metales que presentan una mayor disponibilidad para las plantas (fracción soluble en ácido) son Ni y Zn.
- Los metales más absorbidos por las plantas son Cu y Zn, mientras que el menos absorbido corresponde a Pb. Los cultivos en el suelo MRR presentan mayores contenidos de los metales traza que aquellos realizados en el suelo CHC. Al aplicar dosis crecientes de biosólidos el contenido de Cu y Zn se incrementa, aunque llega a un nivel de equilibrio, en cambio Cr, Ni y Pb llegan a una concentración máxima y luego decrecen.

- La eficiencia de la técnica DGT en la determinación de biodisponibilidad de los metales traza en los suelos, evaluada a través del modelo matemático de correlación simple entre las variables, C_E y el contenido de metales en los cultivos de Ballica, no dieron buenos resultados en todos los casos estudiados. Para Cu y Ni se obtuvieron valores de R sobre 0,96. Para el Zn se encontraron mejores resultados con $R = 0,97$ y $R = 0,85$, para los suelos CHC y MRR respectivamente. Sin embargo, no fue posible correlacionar ambas variables en el resto de los ensayos.
- Sólo para Zn los resultados obtenidos con la técnica DGT fueron satisfactorios para la predicción de la biodisponibilidad de metales traza en suelos.
- La correlación simple que se hizo entre los resultados de C_E arrojados por la técnica DGT y la fracción soluble en ácido de la extracción secuencial, presenta mejores resultados que la relación entre éstos y las plantas de Ballica. Para Cu sólo se realizó una correlación ($R = 0,99$) con el suelo CHC. Para Zn se encontraron los mejores resultados, ya que se pudo realizar una correlación con ambos suelos obteniéndose buenos coeficientes de correlación, $R = 0,98$ y $R = 0,95$; para los suelos CHC y MRR respectivamente. Para el caso de Cr (en suelo CHC) y Ni (en ambos suelos) se realizaron correlaciones, sin embargo los coeficientes de correlación en estos casos fueron sustancialmente menores (del orden $R = 0,86$).
- En el análisis de correlación simple realizado entre las variables contenido de metales en plantas de Ballica y la fracción soluble en ácido de la extracción secuencial, no fue posible realizarlo en todos los casos. Para Cu y Zn en el suelo CHC, se obtuvieron $R \approx 0,95$; en cambio para Zn en el suelo MRR sólo se alcanzó un $R \approx 0,68$. Para Ni sólo se pudo realizar correlación en el suelo CHC, con un $R \approx 0,86$. Los mejores resultados se obtuvieron para Cr en ambos suelos, alcanzándose de R mayores a 0,99.
- Las mejores correlaciones fueron las realizadas entre la C_E y la fracción soluble en ácidos de los metales en el suelo, lo que podría explicarse ya que

ambas son estimativas. En cambio en los cultivos de Ballica, influye un mayor número de factores, por lo tanto al compararlo con los otros métodos, no se obtuvieron resultados satisfactorios.

6. Referencias

- Acevedo E. et al. Informe: Criterios de Calidad de Suelo Agrícola. SAG-Universidad de Chile. 2005
- Ahumada I. et al. Use of sequential extraction to asses the influence of sewage sludge amendment of metal mobility in Chilean soils. J. Environmental Monitoring. 6 (327-334). 2004
- Almas A., Lombnaes P., Song T., Mulder J. Speciation of Cd and Zn in contaminated soils assessed by DGT-DIFS, and WHAM/Model VI in relation to uptake by spinach and ryegrass. Chemosphere. 62 (1647-1655). 2006
- Cattani I., Fragoulis G., Bocelli R., Capri E. Copper bioavailability in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) grown in two Italian soils. Chemosphere. 64 (1972-1979). 2006
- Comisión Nacional del Medio Ambiente (CONAMA), 2001, Reglamento de Tratamiento de Lodos. Chile
- DGT Research. DGT-for measurements in waters, soils and sediments Preparado por H. Zhang. University of Lancaster. 2003
- DS-4, 2009. República de Chile. Reglamento para el manejo de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas servidas.
- Jackson M.L. 1970. Análisis químico de suelos. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España. pp 102.
- Kabata-Pendias A, Pendias H. Trace Metals in Soils and Plants. 3rd edition. CRC Press. 2001

- Manahan, Stanley E. Environmental Chemistry. CRC Press LLC, 2000. 7th edition. Capitulo 16
- Marmiroli N, Maestri E., Health Implications of Trace Elements in the Environment and the Food Chain. En: Trace Elements as Contaminants and Nutrients: Consequences in Ecosystems and Human Health, Edited by Prasad M. N. V.; Ed. Wiley. 2008. pp 23-54
- Nowack B., Koehler S., Schulin R. Use of diffusive gradients in thin films (DGT) in undisturbed field soils. Environ. Sci. Technol. 38 (1133-1138). 2004
- Sadzawka M.A. et al. 2006. Métodos de Análisis Recomendados para Suelos de Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Actas INIA-N°34, Santiago, Chile.
- Sanhueza, Nancy. Beneficios de Plan de Saneamiento de Aguas Servidas de la Cuenca Maipo-Mapocho: Aplicación de Conceptos de Valor Económico Total y Sistema Ambiental. Seminario de Título para el grado de Biólogo Ambiental. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile. 2003
- Singh R.P., Agrawal M. Effects of sewage sludge amendment on heavy metal accumulation and consequent responses of *Beta vulgaris* plants. Chemosphere. 67 (2229-2240). 2007
- Sochaczewski L., Tych W., Davison B., Zhang H. 2D DGT induced fluxes in sediments and soils (2D DIFS). Environmental Modelling & Software. 22 (14-23). 2007
- Sonmez O., Pierzynski G. Assessment of zinc phytoavailability by diffusive gradients in thin films. Environmental Toxicology and Chemistry. 24 N°4 (934-941). 2005
- Sparks, Donald. 2003. Environmental Soil Chemistry. Academic Press. 2nd Edition. pg 13.

- Ure, A.M., Ph. Quevauviller, H. Muntau, and B. Griepink. 1993. Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. *International J. Environ. Analytical Chemistry* 51:135 – 151.
- Zhang H. et al. A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environ. Sci. Technol.* 35 (2602-2607). 2001