



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

*Memoria para optar al Título de Químico*

***“Determinación de la fracción biodisponible de metales trazas  
(Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) en suelos tratados con biosólidos por  
medio de métodos biosimuladores validados a través de ensayos  
con plantas de maravilla”***

**Priscilla Pamela Fernández Castro**

**Directora de Tesis:**

Inés Ahumada T.

**Profesor Patrocinante:**

Inés Ahumada T.

Santiago- Chile

2011

*“La gloria del mundo es transitoria, y no es ella  
la que nos da la dimensión de nuestra vida,  
sino la elección que hacemos de seguir  
nuestra leyenda personal, tener fe en nuestras  
utopías y luchar por nuestros sueños”*

*Paulo Coelho*

## Agradecimientos

*Dedicada a mis queridos padres Nelson y Raquel por el ejemplo que me han dado, por su esfuerzo, valores, apoyo e incondicional cariño.*

*A mis hermanas Susan, Carol y Cinthya por ser como son, cada una con una visión diferente de la vida, por su cariño, comprensión y apoyo desde siempre, las quiero mucho.*

*A mi querido sobrino Seba, por toda la alegría que irradia siempre y por que sin el nuestra vida no sería la misma.*

*A Flavio, mi cómplice en la vida, por su amor, respeto y cariño, y por hacerme inmensamente feliz cada día.*

*A mis queridas amigas que jamás olvidaré Vivi, Patty, Natty, Yanina, Feña, Karen, Paula, por permitir crecer juntas y compartir muchos momentos de nuestras vidas.*

*Agradezco de forma especial a mi Profesora guía, Inés Ahumada, por darme la oportunidad de realizar mi memoria de título en su laboratorio, por la confianza, conocimientos, calidez y disposición entregada en este proceso.*

*Gracias al proyecto Fondecyt N° 1110115, por permitir el financiamiento de esta tesis.*

*Me siento inmensamente feliz de finalizar esta larga aventura y paso por la universidad, agradezco a todas las personas que estuvieron junto a mí, las cuales siempre estarán en mi corazón.*

## Resumen

La aplicación de residuos estabilizados generados del tratamiento de aguas servidas o biosólidos en la agricultura, puede ser beneficiosa, por su elevado contenido de macro y micronutrientes y por su liberación lenta al encontrarse complejados con la fracción orgánica de este sustrato, lo cual constituiría una fuente de nutrientes a largo plazo para las plantas. Así, suelos degradados pueden recuperar su calidad agrícola mejorando su fertilidad. Por otra parte, su aplicación a suelos con estos fines, sería una forma eficiente de reciclaje de estos residuos. Sin embargo, se deben tener presente restricciones para su uso agrícola, debido a su alto contenido en metales traza, compuestos orgánicos tóxicos y microorganismo patógenos, que podrían lixiviar al nivel freático contaminando el suelo, y pudiendo llegar de esta manera a la cadena trófica al aumentar su biodisponibilidad. El propósito de este estudio, fue evaluar el efecto de la aplicación de biosólidos, en muestras de suelo de la región metropolitana del orden Mollisol, pertenecientes a las series Taqueral y Polpaico, en la fracción biodisponible de algunos metales traza (Cd, Cu, Cr, Ni, Pb y Zn) a través de dos métodos predictivos la técnica de la Gradiente de Difusión en Capa Fina (DGT) y la primera etapa del método de extracción secuencial BCR, ambos validados a través de un ensayo comparativo con plantas de maravilla (*Calendula officinalis*).

Los resultados obtenidos en este estudio, mostraron que la aplicación de biosólido alteró la biodisponibilidad en algunos de los metales estudiados, de esta forma a medida que aumentó la dosis de aplicación de biosólido, aumentó también la concentración de la fracción móvil de los metales traza.

La extracción secuencial BCR, dio cuenta de las formas químicas en que se encontraban los metales traza en el suelo. Todos los metales estudiados se encuentran

mayoritariamente en la fracción residual de los suelos. Con la aplicación de biosólidos se generó un aumento principalmente de la fracción soluble de Zn.

En las plantas de maravilla se, encontró, que la absorción de los metales siguió el siguiente orden  $Zn > Cu > Cr > Ni > Pb > Cd$ , sin embargo con el aumento de la dosis de biosólido, se observó un incremento de la fracción biodisponible principalmente de Zn, en suelo Taqueral y de Zn, Ni y Cr en suelo Polpaico.

Respecto de los métodos predictivos, se encontró que sólo la primera fracción de Zn obtenida a través de método BCR correlacionó con el contenido de éste en la planta, obteniéndose valores de R: 0,916 y 0,925 para suelo Taqueral y Polpaico respectivamente.

La técnica DGT permitió predecir la fracción biodisponible de Ni, Zn, Cd y Cr en suelo Taqueral, obteniéndose, para la correlación entre la concentración efectiva y el contenido total de estos metales en la planta, valores de R: 0,92; 0,83; 0,81; 0,77 respectivamente, en cambio en el suelo Polpaico sólo en el caso de Zn, se encontró una buena correlación con lo encontrado en la planta ( $R=0,92$ ).

DETERMINATION OF THE BIOAVAILABLE FRACTION OF TRACE METALS (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) IN BIOSOLID-TREATED SOILS BY BIOSIMULATION METHODS  
VALIDATED THROUGH ASSAYS WITH SUNFLOWER PLANTS

---

## SUMMARY

The application of wastewater treatment-generated stabilized residues or biosolids in agriculture may be beneficial due to their high content of macro- and micronutrients and to their slow release since they are complexed with the organic fraction of this substrate, which would constitute a long-term source of nutrients for plants. Thus, degraded soils may recover their agricultural quality by improving their fertility. On the other hand their application to soils with this purpose would be an efficient form of recycling these residues. However, some restrictions must be taken into account for their agricultural use, because of their high contents of trace metals, toxic organic compounds and pathogenic microorganisms, which might leach towards the phreatic level and contaminate soil, thus being able to reach the trophic chain by increasing their bioavailability. The purpose of this study was to assess the effect of biosolid application, using soil samples from the Metropolitan Region in the Mollisol order, belonging to the Taqueral and Polpaico series, on the bioavailable fraction of some trace metals (Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, and Zn) through two predictive methods: the technique of diffusion gradient in thin films (DGT) and the first stage of BCR sequential extraction, both validated through a comparative assay with sunflower (*Calendula officinalis*) plants.

The results obtained in this study showed that biosolid application altered the bioavailability of a few the metals under study, thus increasing the application rate of biosolid caused an increase in trace metal concentration.

BCR sequential extraction accounted for the chemical forms in which trace metals are found in soil. All the metals under study are found mainly in the residual fraction of soils. Biosolid application caused an increase mainly in the fraction of acid-soluble Zn.

In the sunflower seedlings it was found that metal absorption followed the  $Zn > Cu > Cr > Ni > Pb > Cd$ . However, increasing the biosolid rate showed an increase in the bioavailable fraction mainly of Zn in the Taqueral soil, and of Zn, Ni, and Cr in the Polpaico soil. As to the predictive methods, it was found that only the first Zn fraction obtained through BCR correlated with the content of this in the plant with respective values of R 0.916 and 0.925 for Taqueral and Polpaico soils.

The DGT technique was effective in predicting the bioavailable fraction of Ni, Zn, Cd, and Cr in the Taqueral soil, giving, for correlation between the effective concentration and total content of these metals in the plant, respective values of R: 0.92, 0.83, 0.81, and 0.77. Instead, in the Polpaico soil, Only Zn showed good correlation with the results in the plant (R= 0.92).

# Índice General de Contenidos

	Página
1. Introducción	14
2. Objetivos	20
2.1 Objetivos Generales	20
2.2 Objetivos Específicos	20
3. Materiales y Métodos	21
3.1 Reactivos	21
3.2 Materiales	21
3.3 Aparatos e Instrumentos	22
3.4 Procedimiento Experimental	23
3.4.1 Caracterización Física y Química de muestras de suelo y biosólido	23
3.4.1.1 Determinación de pH	23
3.4.1.2 Determinación Capacidad de Intercambio Catiónico	23
3.4.1.3 Determinación de contenido de Materia Orgánica (MO)	23
3.4.1.4 Determinación del contenido total de metales Cu, Cd, Ni, Pb, Cr y Zn en suelos y biosólido	24
3.4.1.5 Determinación de la Textura de los suelos	24
3.4.2 Determinación del contenido total de metales traza y asociaciones químicas de suelos, biosólido y mezclas	25
3.4.2.1 Procedimiento para la determinación de Cu, Cd, Ni, Pb, Cr y Zn total en muestras tratadas con biosólidos	25
3.4.2.2 Procedimiento de Extracción Secuencial de Cu, Cd, Ni, Pb, Cr y Zn	25
3.4.3 Determinación de la fracción biodisponible de los metales traza en plantas de Maravilla ( <i>Calendula Officinalis</i> )	27
3.4.4 Determinación de biodisponibilidad de metales traza por DGT	28
3.4.5 Análisis e interpretación de resultados	30
4. Resultados y Discusión	31
4.1 Caracterización química de suelos y biosólido	31
4.2 Determinación del contenido total de metales traza y asociaciones químicas de suelos, biosólido y mezclas	32
4.2.1 Contenido total de metales traza en suelos y biosólido	32
4.2.2 Extracción secuencial de Cr, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn	34
4.3 Biodisponibilidad de metales traza en cultivos de plantas de Maravilla	43
4.4 Determinación de CE a través de la técnica DGT	46
4.5 Comparación entre la fracción biodisponible obtenida a través del cultivo de plantas de Maravilla y la fracción biodisponible estimada a través de los DGT	49
4.5.1 Correlación cultivos de Maravilla y CE	50
4.5.2 Correlación entre la fracción soluble en ácido y cultivo de Maravilla	51

5. Conclusiones	53
6. Referencias	56
7. Anexos	59

## Índice de Tablas

	Página
Tabla1. Concentraciones máximas de metales pesados y metaloides en lodos recomendables para su aplicación benéfica.	15
Tabla 2. Método de fraccionamiento químico BCR optimizado (Sutherland and Tack, 2003).	26
Tabla 3. Características generales de los suelos se las Series Taqueral y Polpaico y biosólido BET2011.	31
Tabla 4. Contenido total de Cu, Cd, Ni, Pb, Cr y Zn en suelo Taqueral, Polpaico y Biosólido Trebal (BET) 2011.	32
Tabla 5. Concentración DGT y concentración en agua de poro, en suelos Taqueral y Polpaico tratados con dosis 0, 30, 90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> de biosólido BET 2011.	47
Tabla 6. Concentración Efectiva (C <sub>E</sub> ) determinada mediante la técnica DGT y la aplicación computacional DIFS, para los suelos Taqueral y Polpaico a dosis 0, 30, 90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> de biosólido BET 2011.	48
Tabla 7. Evaluación de la técnica DGT para estimar la fracción biodisponible de metales traza a través de la correlación (R) entre la concentración efectiva C <sub>E</sub> y el contenido total del metal en la planta.	50
Tabla 8. Contenido total de Cr, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con biosólido en dosis 0, 30, 90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> .	59
Tabla 9. Fracción soluble en ácido de metales en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con dosis de 0, 30, 90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> de biosólido, antes de la incubación.	59
Tabla 10. Fracción reducible de metales en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con dosis de 0, 30, 90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> de biosólido, antes de la incubación.	60
Tabla 11. Fracción oxidable de metales en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con dosis de 0, 30, 90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> de biosólido, antes de la incubación.	60
Tabla 12. Fracción Residual de metales en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con dosis de 0, 30, 90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> de biosólido, antes de la incubación.	61
Tabla 13. Fracción soluble en ácido de metales en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con dosis de 0, 30, 90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> de biosólido, después de la incubación.	61

- Tabla 14. Fracción reducible de metales en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con dosis de 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, después de la incubación. 62
- Tabla 15. Fracción oxidable de metales en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con dosis de 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, después de la incubación. 62
- Tabla 16. Fracción Residual de metales en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con dosis de 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, después de la incubación. 63

## Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Diagramas dispositivo DGT para suelos y fotografías dispositivo DGT y dispositivo desplegado en suelo.	29
Figura 2. Contenido total de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en suelo Taqueral enmendado con biosólido en dosis 0,30,90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> .	33
Figura 3. Contenido total de Cr, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn en suelo Polpaico enmendado con biosólido en dosis 0,30,90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> .	33
Figura 4. Distribución porcentual de Cu extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Taqueral control y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.	35
Figura 5. Distribución porcentual de Cu extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Polpaico y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.	36
Figura 6. Distribución porcentual de Ni extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Taqueral y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.	37
Figura 7. Distribución porcentual de Ni extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Polpaico y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.	37
Figura 8. Distribución porcentual de Pb extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Taqueral y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.	38
Figura 9. Distribución porcentual de Pb extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Polpaico y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.	39
Figura 10. Distribución porcentual de Cr extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Taqueral y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.	40
Figura 11. Distribución porcentual de Cr extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Polpaico y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha <sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.	40

- Figura 12. Distribución porcentual de Zn extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Taqueral y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación. 42
- Figura 13. Distribución porcentual de Zn extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Polpaico y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación. 42
- Figura 14. Contenido de Cu y Zn en cultivos de Maravilla sembrados en suelo Taqueral y enmendado con biosólido en dosis 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup>. 44
- Figura 15. Contenido de Cd, Ni, Pb y Cr en cultivos de Maravilla sembrados en suelo Taqueral y enmendado con biosólido en dosis 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup>. 44
- Figura 16. Contenido de Cu y Zn en cultivos de Maravilla sembrados en suelo Polpaico control y enmendado con biosólido en dosis 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup>. 45
- Figura 17. Contenido de Cd, Ni, Pb y Cr en cultivos de Maravilla sembrados en suelo Polpaico control y enmendado con biosólido en dosis 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup>. 45
- Figura 18. Correlación (R) entre el contenido total del metal en la planta y la primera fracción de la extracción secuencial BCR de los suelos Taqueral. 51
- Figura 19. Correlación (R) entre el contenido total del metal en la planta y la primera fracción de la extracción secuencial BCR de los suelos Taqueral. 52

## 1. Introducción

Los metales pesados, y en general los elementos traza, están presentes en bajas concentraciones ( $< \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) en la corteza terrestre, los suelos y las plantas. La presencia de concentraciones nocivas (anomalías) en los suelos es una degradación especial denominada contaminación.

Los elementos traza en los suelos pueden ser de origen litogénico o biogénico. Los elementos de origen geogénico proceden de la roca madre, de actividad volcánica, o de la lixiviación de productos de meteorización. Los metales pesados antropogénicos derivan de residuos, procedentes de actividades industriales, minería e industria agrícola, y residuos sólidos urbanos. En este contexto, uno de los problemas medioambientales más importantes presentes en la sociedad actual, es la eliminación de estos residuos, tanto de aquellos líquidos y sólidos, como de aquellos procedentes del tratamiento de aguas servidas de origen doméstico e industrial. El tratamiento de aguas residuales produce como resultado la generación de biosólidos, que requieren de una adecuada manipulación, para evitar impactos negativos en la salud de los humanos y el medio ambiente, por lo tanto, estos residuos necesitan ser tratados antes de ser eliminados. Es por esta razón que el destino que actualmente se está dando a los lodos es muy variado, esquemáticamente se podría hablar de varias opciones: vertido controlado, vertido al mar, encapsulación, compostaje, incineración, recuperación de terrenos, aplicación directa en la agricultura, etc. sin embargo, la más potente y mejor opción de reciclaje de biosólidos es su aplicación en suelos agrícolas debido al alto contenido de materia orgánica, en conjunto con macro y micro nutrientes necesarios para el crecimiento de plantas, puede ser ventajosamente utilizado como fertilizante en suelos agrícolas o como reparador de suelos degradados. Sin embargo, los límites para su utilización en suelos agrícolas depende del alto contenido de contaminantes inorgánicos como metales pesados,

además de microorganismos patógenos, los cuales pueden lixiviar al nivel freático, contaminando la fase líquida del suelo y otros cursos de agua; o bien, aumentando su biodisponibilidad y riesgo para la salud, incorporándose de esta manera en la cadena trófica mediante el consumo de cultivos o aguas contaminadas (Ahumada et al., 2010).

Las regulaciones existentes en Chile y otros países están basadas principalmente en el contenido total de metales en suelos, y es ampliamente reconocido que el contenido total de estos metales incluye fracciones que no están disponibles para las plantas, microorganismos o biota del suelo (Zhang et al., 2001). La continua aplicación de lodos en suelos conduce a la acumulación de metales pesados en plantas, siendo la vía principal a través de la cual los metales pesados pueden entrar a la cadena trófica (Eptein, 2003). La Tabla 1, indica los valores máximos permisibles por la CONAMA para la disposición de biosólidos en suelos agrícolas o degradados.

**Tabla 1. Concentraciones máximas de metales pesados y metaloides en lodos recomendables para su aplicación benéfica.**

Tipo de Suelo	Concentración máxima (mg kg <sup>-1</sup> sobre base seca)								
	As	Cd	Cu	Hg	Mo	Ni	Pb	Se	Zn
<b>Suelos Agrícolas</b>	20	8	1000	4	10	80	300	50	2000
<b>Suelos Degradados</b>	40	40	1500	20	20	420	400	100	2800

\* Cr y Co no son considerados ya que en general en los suelos se encuentran dentro de rangos normales.

Los metales pesados están asociados a varios componentes del suelo, dando lugar a diversas formas químicas que determinan su movilidad y disponibilidad (Ahumada et al., 1999). Los complejos que forman los metales con los distintos componentes del

suelo son: estructuras solubles e intercambiables, metales complejados o adsorbidos en la materia orgánica, ocluidos en óxidos, asociados a minerales de arcilla y a minerales primarios del suelo. El metal en las formas de carbonato e intercambiable es considerado lábil y disponible para las plantas. A altos pHs, los metales pesados precipitarían y en este caso se garantizaría su inmovilidad. El Cd y otros metales tienden a quedar adsorbidos por los carbonatos; mientras que los metales incorporados en la red cristalinas de las arcillas parecen ser relativamente inertes. Metales asociados a óxidos e hidróxidos de Fe, Al y Mn, pueden ser considerados potencialmente activos dependiendo de las propiedades físicas del suelo, estos se encuentran finamente diseminados en la masa de suelo por lo que son muy activos. Por su baja cristalinidad y pequeño tamaño de partícula, tienen los metales divalentes una alta capacidad sortiva, especialmente Cu, Pb y en menor extensión Zn, Co, Cr, Mo, Ni y As. Por otro lado, la materia orgánica del suelo interacciona con los metales, formando complejos de intercambio o quelatos. La adsorción puede ser tan fuerte que queden estabilizados, como el caso de Cu o formen quelatos también muy estables, como puede pasar con el Pb y Zn. (Ahumada et al., 2004; Jamali et al., 2007; Galan et al., 2008).

El equilibrio dinámico que se establece entre estas fracciones determina su movilidad y biodisponibilidad, siendo el pH, el potencial redox, capacidad de intercambio catiónico, cantidad y tipo de coloides del suelo (materia orgánica, arcillas y óxidos) los factores edáficos más importantes en su control (Cattani et al., 2006). En concreto, la mayoría de los metales tienden a estar más disponibles a pH ácido, porque son menos adsorbidos, excepto As, Mo, Se y Cr, que son más móviles a pH alcalino. Los suelos de tipo arcilloso retienen más metales por adsorción en el complejo de intercambio de los minerales de la arcilla. Por el contrario, los de tipo arenoso poseen una menor capacidad de fijación, pudiendo lixiviar y contaminar el nivel freático. Cada mineral de arcilla, tiene

una determinada carga superficial específica. Cuanto mayor es la superficie activa de un filosilicato, mayor es su posibilidad de adsorber metales. Esta capacidad de adsorción será máxima, a pH mayores que el punto de carga cero (Sposito, 1989). Sin embargo, la importancia de los minerales de arcilla como adsorbentes, es secundaria cuando en un suelo existe abundante materia orgánica y/o oxihidróxidos de hierro, que son componentes del suelo más competitivos (Galán, 2000).

La capacidad de intercambio catiónico depende del tipo de minerales de la arcilla, de la materia orgánica, de la valencia y del radio iónico hidratado del metal. A mayor tamaño y menor valencia, serán menos retenidos. Además, el potencial de óxido-reducción es responsable de que el metal se encuentre en estado oxidado o reducido y en consecuencia modifique su movilidad (Sposito, 1989).

La peligrosidad de un contaminante, puede ser relacionada a su movilidad o disponibilidad, la que se determina por distintos procedimientos químicos. El contenido total de metales pesados es útil para estimar la contaminación, pero representa un deficiente indicador de la biodisponibilidad, puesto que solo los metales asociados débilmente a la fase sólida del suelo, estarían realmente disponibles para ser absorbidos por las plantas (Fernández et al., 2000). La determinación de la fracción biodisponible es importante en la evaluación de riesgos de contaminación y puede ser estimada a través de un procedimiento de extracción secuencial, que consiste en el uso de diferentes reactivos, concentraciones, temperaturas y tiempos para obtener el fraccionamiento del metal asociado a los distintos componentes del suelo (Nowack et al., 2004; Jamali et al., 2007). La mayoría de la literatura define la biodisponibilidad como la fracción fácilmente extraíble o fracción lábil que podría estar disponible para la absorción por las plantas (Bacon and Davidson, 2008). Los metales unidos a carbonatos, que son los solubles en

ácido, se extraen en la primera etapa del método de fraccionamiento químico de método propuesto por la European Community Bureau of Reference (BCR) (Sutherland and Tack., 2003), la cual es considerada fácilmente móvil, extraíble y disponible para las plantas, la segunda fracción corresponde a la forma reducible del metal, asociados a óxidos de Mn y Fe, mientras que la tercera etapa corresponde a la fracción oxidable, es decir metales unidos a la materia orgánica (Walter et al., 2006; Ahumada et al., 2009).

Por otra parte, en la búsqueda de nuevos, rápidos y más eficientes métodos para estimar la biodisponibilidad de metales trazas en suelos, la técnica de gradiente de difusión en capa fina (DGT) ha sido desarrollada para medir flujos de metales en sedimentos (Harper et al., 1999). Muchos estudios han mostrado que esta técnica es una buena herramienta para evaluar la biodisponibilidad de metales en plantas, ya que imita el principal mecanismo de absorción de una planta mediante la reducción de la concentración local e inducción del suministro difusivo de metales y liberación desde la fase sólida de estos, hacia la solución (Nolan et al., 2005; Lehto et al., 2006; Zhao et al., 2006), causando así reabastecimiento por difusión desde el seno de la solución y desorción de la fase sólida (Davison et al., 2000).

Esta técnica se fundamenta en la capacidad de los metales de difundir a través de un gel de difusión selectivo a complejos orgánicos, biodisponibles, los cuales son finalmente fijados en una resina residente y quelante.

El dispositivo DGT, es capaz de acumular pasivamente especies lábiles desde una solución matriz y que se puede desarrollar in situ, minimizando los problemas asociados a contaminación, colección y filtración de muestras. Este simple dispositivo utiliza una capa de resina Chelex impregnada en un hidrogel que permite acumular los metales. La capa de resina es cubierta por una capa de hidrogel difusivo y un filtro. Los iones pueden

difundir a través del filtro y el gel difusivo hasta alcanzar la capa de resina. La concentración de iones metálicos en el suelo adyacente al dispositivo es baja. Esto puede inducir el suministro de los iones metálicos desde la fase sólida a la solución en las capas de suelo cercanas al dispositivo.

La masa de metal acumulada por el dispositivo DGT es eluída con ácido nítrico, para posteriormente ser determinada, mediante técnicas espectroscópicas como AAS (espectroscopia de absorción atómica) o ICP-MS (espectrometría de masa con plasma inductivamente acoplado). De esta forma se obtiene de una forma fácil y precisa la concentración de la solución muestreada.

Para relacionar la concentración del metal en la resina con la biodisponibilidad es utilizado un modelo, el cual considera flujos y reacciones que ocurren entre el dispositivo y el medio. Para este fin ha sido desarrollado un programa computacional llamado DIFS (DGT Induced Fluxes in Sediments and Soils). Este programa cuantifica la respuesta del DGT en relación a las características de difusión del suelo y la velocidad del suministro desde la fase sólida a la solución (Sochaczewski et al., 2007).

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Estimar la biodisponibilidad de metales traza como Cu, Cr, Cd, Pb, Ni y Zn, en suelos tratados con biosólidos, mediante la aplicación de la técnica de gradiente de difusión en capa fina (DGT) y métodos de extracción secuencial.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Caracterización química y física de dos suelos, Taqueral y Polpaico, un biosólido proveniente de una planta de tratamiento de aguas servidas de la Región Metropolitana, y mezclas suelos-biosólido en cuanto a pH, capacidad de intercambio catiónico (CIC), materia orgánica (MO).
2. Determinación del contenido total de Cu, Cr, Cd, Pb, Ni y Zn y sus asociaciones químicas con los distintos componentes del suelo, biosólidos y mezclas.
3. Estimación de la fracción biodisponible de Cu, Cr, Cd, Pb, Ni y Zn en suelos tratados con biosólido en concentraciones de 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> través de la técnica de DGT y la primera fracción del proceso de extracción secuencial.
4. Determinación de la fracción biodisponible de Cu, Cr, Cd, Pb, Ni y Zn en cultivos de plantas de maravilla (*Calendula officinalis*).
5. Análisis e interpretación de resultados.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 Reactivos

##### ◆ Ácidos

Ácido acético glacial 100%; Merck p.a,  $\text{CH}_3\text{COOH}$

Ácido nítrico 65%; Merck p.a,  $\text{HNO}_3$

Ácido clorhídrico fumante 37%; Merck p.a,  $\text{HCl}$

Ácido sulfúrico 96%; Merck p.a,  $\text{H}_2\text{SO}_4$

Ácido fluorhídrico 48%; Merck p.a,  $\text{HF}$

##### ◆ Sólidos

Acetato de amonio; Merck p.a,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$

Acetato de sodio anhidro; Merck p.a,  $\text{CH}_3\text{COONa}$

Dicromato de sodio dihidrato; Merck p.a,  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Clorhidrato de hidroxilamina; Merck p.a,  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$

##### ◆ Solventes

Agua milli-Q [18,0  $\mu\Omega$ ]

Agua destilada

Peróxido de Hidrógeno 30%; Merck p.a,  $\text{H}_2\text{O}_2$

#### 3.2 Materiales

Vasos de precipitado 50 ,100 , 1000 mL

Matraces Erlenmeyer 125 mL

Matraces de aforo 10, 25, 50, 100, 1000, 2000 mL

Pipetas de aforo 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 20, 25 mL

Micropipetas [10-100  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L]

Puntas [10-100  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L]

Probetas 50 y 100 mL

Espátulas

Celdas de cuarzo de 1cm de paso óptico

Magnetos

Vasos plásticos

Tubos de centrifuga Falcon 50 mL

Frascos de plástico de 20 mL

Jeringas 10 mL

Baquetas

Papel filtro Advantec MFS N°1 y 2

Parafilm

Filtros de membrana de celulosa 0,45  $\mu$ m

Dispositivos DGT

### **3.3 Aparatos e Instrumentos**

Balanza analítica, Swiss Quality 125 A

Balanza digital, Adam AQT-2600

Balanza granataria, PJ precisa junior 5000

pH metro

Centrífuga varifuge 3.0, Heraeus Sepatech

Plancha calefactora

Baño de agua, GLF

Agitador Mecánico

Ultrasonido, Power Sonic 410

Espectrofotómetro UV-Visible , Unicam

Digestor de Microondas , Millestone MLS 1200 mega

Espectrofotómetro de Absorción Atómica, Perkin Elmer 1100

### **3.4 Procedimiento Experimental**

#### **3.4.1. Caracterización Física y Química de Muestras de Suelo y Biosólido:**

##### ***3.4.1.1 Determinación de pH***

El pH de los suelos, biosólido y mezcla suelo-biosólido, se midió potenciométricamente en el sobrenadante de una suspensión, en una proporción de 1:2,5 (suelo:agua), con un electrodo de vidrio-calomelano (Sadzawka, 2006 ).

##### ***3.4.1.2 Determinación Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC)***

La CIC se determinó por saturación con acetato de sodio a pH 7,0, el sodio adsorbido se intercambió por amonio. El sodio se determinó por espectroscopía de emisión atómica (Sadzawka, 2006 ).

##### ***3.4.1.3 Determinación de contenido de Materia Orgánica (MO)***

Para la determinación de materia orgánica se pesaron entre 1 y 2 g de muestra seca en matraces erlenmeyer, incluyendo dos blancos y seis matraces con 1 mL de la serie de estándares de sacarosa (0-50 mg sacarosa/mL solución), a cada muestra se agregó 10 mL de solución de  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0,5 M y 20 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  agitando la suspensión evitando puntos localizados de ebullición, se dejó reposar sobre una plancha aislante bajo campana durante 30 minutos, terminado este el tiempo de reposo, se agregó 70 mL de

H<sub>2</sub>O milli-Q y se dejó reposar durante la noche para finalmente realizar la determinación del analito en el sobrenadante a 600 nm en espectrofotómetro UV-Vis (Sadzawka, 2006 ).

#### ***3.4.1.4 Determinación del contenido total de metales Cu, Cd, Ni, Pb, Cr y Zn en suelos y biosólido***

Para la determinación del contenido total de metales traza, se pesaron 200 mg de muestra, los cuales se digirieron por microondas luego de agregar 4 mL de HNO<sub>3</sub> 65%, y 4 mL HF 32% y 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 37%. Se utilizó un programa de microondas de tres etapas: 5 minutos a 250 W, 5 minutos a 400 W y 10 minutos a 500 W con 1 minuto de ventilación. Una vez terminado el programa, las muestras digeridas fueron arrastradas con agua destilada a cápsulas de teflón, donde se eliminó el HF por evaporación en una plancha calefactora, hasta la salida de vapores blancos y posteriormente se transfirieron a matraces aforados de 10 mL con HCl 1M. Finalmente, fueron filtradas y almacenadas en frascos de polietileno bajo refrigeración, para su análisis posterior mediante espectrofotometría de Absorción Atómica con llama.

#### ***3.4.1.5 Determinación de la Textura de los Suelos***

La determinación de textura se realizó a través del método del hidrómetro (Bouyoucos). Este consistió en pesar 50 g de suelo y agregar alrededor de 700 mL de agua y 20 mL de hexametáfosfato de sodio (o polifosfato de sodio) al 10%. Se agitó por 15 minutos para luego trasvasijar en una probeta de 1 L y aforar con agua. Esta probeta se tapó y agitó por 1 minuto y luego se dejó reposar 4 minutos, tiempo en el cual se midió la temperatura y la lectura del hidrómetro. Se dejó reposar 2 horas más y se repitió el proceso de lectura de temperatura y lectura de hidrómetro. A través de estas lecturas se obtuvieron los porcentajes de arena, arcilla y limo.

### **3.4.2 Determinación contenido total de metales traza y asociaciones químicas de suelos, biosólido y mezclas**

#### ***3.4.2.1 Procedimiento para la determinación de Cu, Cd, Ni, Pb, Cr y Zn total en muestras tratadas con biosólidos.***

Para la determinación del contenido total de metales traza, se pesaron 200 mg de muestra tratada con biosólido en distintas concentraciones 0, 30, 90 y 200 Mgha<sup>-1</sup> en triplicado, las cuales se digirieron por microondas luego de agregar 1,5 mL de HNO<sub>3</sub> 65%, y 4,5 mL HCl 37%. El programa de microondas utilizado fue el mismo que se describió antes en la sección 3.4.1.4. Las muestras digeridas se trasladaron cuantitativamente a matraces de 10 mL con agua destilada para luego ser filtradas. Finalmente se analizaron por Espectrometría de Absorción Atómica con llama (AAS), Las curvas de calibración de cada elemento se prepararon por dilución de un multiestándar de 1000 ± 10 mg·L<sup>-1</sup>, en HNO<sub>3</sub> 1 M.

#### ***3.4.2.2 Procedimiento de Extracción Secuencial de Cu, Cd, Ni, Pb, Cr y Zn***

Para determinar las asociaciones de los metales con los distintos componentes del suelo o biosólido, las muestras de suelo con distintas concentraciones de biosólido 0, 30, 90 y 200 Mgha<sup>-1</sup>, se extrajeron secuencialmente a través del método propuesto por la BCR optimizado (Sutherland and Tack, 2003), y en triplicado, el cual considera una fracción soluble en ácidos (metal unido a carbonato), fracción reducible (metal asociado a MnO<sub>x</sub>/FeO<sub>x</sub>), fracción oxidable (metal enlazado a MO) y por último una fracción residual. Para extraer cada fracción se siguió el procedimiento de la Tabla 2.

**Tabla 2. Método de fraccionamiento químico BCR optimizado (Sutherland and Tack, 2003).**

Etapa	Extractante	Tratamiento	Suelo : Solución
Fracción Soluble en Ácidos	CH <sub>3</sub> COOH 0,11 M	Agitación por 16 horas a 22±5°C, centrifugar por 20 minutos a 2500 rpm.	1:20
Fracción Reducible	NH <sub>2</sub> OH·HCl 0,5 M + HNO <sub>3</sub> 2 M	Agitación por 16 horas a 22±5°C, centrifugar por 20 minutos a 2500 rpm.	1:20
Fracción Oxidable	a) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%  b) NH <sub>4</sub> OAc 1M	a) 1 h a temp. ambiente, 1 h en baño de agua a 85±2°C. Volver a agregar H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , y calentar 1h baño de agua a 85±2°C  b) Agitación por 16 horas a 22±5°C, centrifugar 20 minutos a 2500 rpm.	a) 1:10  b) 1:25

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

Los metales traza se determinaron por Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA) con llama.

### **3.4.3 Determinación de la fracción biodisponible de los metales traza en plantas de Maravilla (*Calendula officinalis*).**

Se utilizaron macetas plásticas, en las cuales se puso en el fondo, una malla plástica como soporte para el cuarzo, que tiene como objetivo impedir la pérdida de la muestra. Posteriormente, en cada maceta se dispusieron las muestras de suelo y mezclas suelo-biosólido en las distintas dosis, 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup>, para los dos suelos en triplicado. Se regaron a capacidad de campo por siete días a temperatura ambiente. En cada maceta se sembraron 20 semillas de plantas de maravilla. Desde el primer día de siembra se instaló la iluminación automática del invernadero de manera de cumplir con periodos de luz en una relación de 14/10 hrs (día/noche), con una variación de temperatura  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ . El período de cultivo fue aproximadamente entre 30 a 35 días.

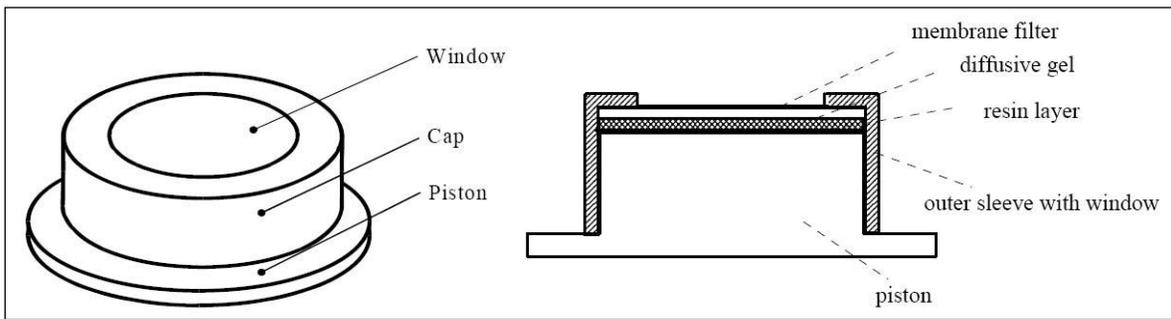
Se controló el cultivo diariamente regando con agua destilada a un 60-70% de la capacidad de campo del suelo. Cumplido el tiempo de cultivo, las plantas de maravilla fueron retiradas de sus macetas y lavadas con agua destilada. Las raíces y parte aérea de la planta fueron separadas y secadas en estufa a 70°C durante 48 horas. Para conocer el contenido de metales traza en las plantas se pesaron 500 mg (peso seco) de muestra de parte aérea y alrededor de 200 mg de raíces, se agregaron 4mL de HNO<sub>3</sub> 65%, 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 37% y se realizó una digestión en horno microondas utilizando un programa de cinco etapas: 1 minuto a 250 W, 1 minuto a 0 W, 5 minutos a 250 W, 5 minutos a 400 W, 5 minutos a 650 W y 1 minuto de ventilación. Una vez concluido el

programa las muestras se aforaron en matraces de 20 mL con agua milli-Q y filtraron para su posterior análisis mediante Espectroscopía de Absorción Atómica o ICP-MS según su concentración.

#### **3.4.4 Determinación de biodisponibilidad de metales traza por DGT**

Se pesaron el equivalente a 150 g de muestras de suelo con concentración de biosólido 0, 30, 90 y 200  $\text{Mg ha}^{-1}$  en triplicado, las cuales se dispusieron en recipientes de plástico, se agregó agua hasta formar una pasta de saturación, la que se estabilizó por 3 días en incubadora a 25°C. Al finalizar los 3 días se repuso la humedad perdida.

El sistema DGT se preparó colocando en el dispositivo el disco de resina Chelex 100, seguido un disco de gel difusivo y por último un filtro de membrana. Luego se colocó la tapa superior que posee una ventana que queda expuesta a la muestra. Los dispositivos se pusieron en contacto con cada muestra y se incubaron a 25°C por 24 horas. En la Figura 1 se muestran fotografías y esquemas del dispositivo DGT. Después del tiempo indicado, el DGT fue removido, lavado con agua milli-Q y secado. A continuación, se recuperó la resina Chelex 100 rompiendo la tapa del DGT. Esta resina se puso en un tubo plástico con 5 mL de ácido nítrico 1M, dejándolo en agitación por 24 horas a 60 rpm. La determinación del contenido de metales traza se realizó por ICP-Masa. Además se determinaron los metales traza en la pasta de saturación de suelo que quedó luego de desplegar los DGT, para ello la pasta se centrifugó a 2000 rpm por 20 min, luego el sobrenadante se retiró con una jeringa y filtró, determinándose el contenido de metales traza por ICP-Masa.



**Figura 2.** Diagramas dispositivo DGT para suelos y fotografías dispositivo DGT y dispositivo desplegado en suelo.

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:

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

Donde  $C_{elut}$ : 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:  $\Delta g$ : 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 interface 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 ( $\phi$ ).

### 3.4.5 Análisis e interpretación de resultados

El análisis estadístico de resultados se realizó a través del programa computacional Statgraphics. Se utilizó el test de correlación simple entre la fracción biodisponible obtenida a través del cultivo de plantas de maravilla y la fracción biodisponible estimada a través de los DGT.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Caracterización química de suelos y biosólido

En la Tabla 3 se muestran las características generales del biosólido y de los suelos estudiados. Los suelos corresponden a las Series Taqueral y Polpaico, ambas correspondientes a suelos pertenecientes al Orden Mollisol, cuyas texturas corresponden a franco-limosa y franca respectivamente. El pH del suelo Polpaico y del biosólido es neutro, sin embargo el pH del suelo Taqueral es básico. La materia orgánica del biosólido es mucho mayor en comparación a los dos suelos en estudio. La capacidad de intercambio catiónico es mucho mayor en el biosólido que en los suelos, lo que mostraría un mayor contenido de sales solubles.

**Tabla 3. Características generales de los suelos de las Series Taqueral y Polpaico y biosólido BET2011**

	Método	Unidad	Suelo		Biosólido BET 2011
			Taqueral	Polpaico	
<b>pH</b>	Suelo:Agua 1:2,5	-	8,21	7,21	6,97
<b>MO</b>	Digestión ácida	%	2,45	3,12	47,9
<b>CIC</b>	Saturación con NH <sub>4</sub> OAc 1 M a pH 7.0	cmol·kg <sup>-1</sup>	22,3	39,2	71,6
<b>Textura</b>	Bouyoucos	-	Franco limosa	Franca	-

## 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 suelos y biosólido.

En la Tabla 4 se muestran los contenidos de metales traza presentes en los suelos y el biosólido (BET2011).

**Tabla 4. Contenido total de Cu, Cd, Ni, Pb, Cr y Zn en suelo Taqueral, Polpaico y Biosólido Trebal (BET) 2011.**

<b>Suelo (Mg/ha)</b>	<b>Cu (mg/Kg)</b>	<b>Cd (mg/Kg)</b>	<b>Ni (mg/Kg)</b>	<b>Pb (mg/Kg)</b>	<b>Cr (mg/Kg)</b>	<b>Zn (mg/Kg)</b>
<b>Taqueral</b>	79,5	ND	16,5	23,4	17,1	26,0
<b>DER %</b>	0,3	-	6,1	19,7	2,1	17,9
<b>Polpaico</b>	79,9	2,20	20,1	36,4	11,5	58,2
<b>DER %</b>	1,0	15,1	5,6	3,1	5,1	15,3
<b>Biosólido</b>	508,0	3,5	112,0	84,3	558,0	1879,0
<b>DER %</b>	3,2	1,3	5,4	0,1	3,5	2,0

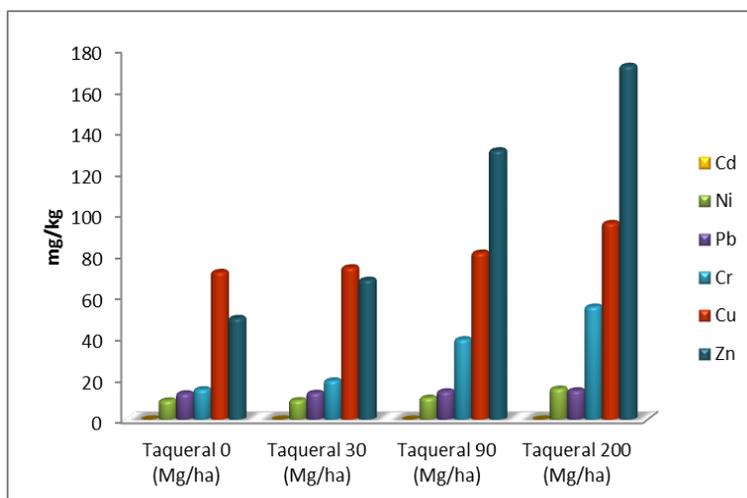
**ND:** No Detectable

**DER:** Desviación Estándar Relativa

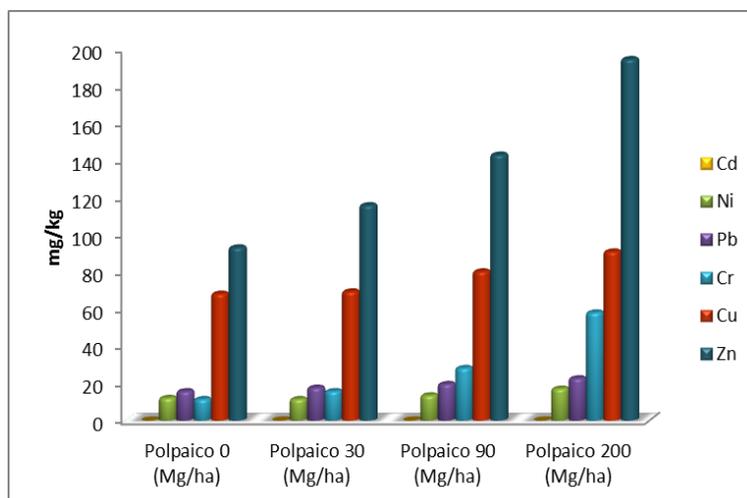
El contenido de metales totales en el biosólido indica que este puede ser utilizado en suelos agrícolas como forma de disposición final de este, ya que las concentraciones de metales se encuentran bajo los límites permitidos por la norma chilena (DS-4, 2009), los cuales se presentan en la Tabla 1.

La concentración de metales en el suelo Taqueral aumenta en el siguiente orden: Ni < Cr < Pb < Zn < Cu, Cd no fue detectado en dicho suelo. Por otra parte la concentración de metales en el suelo Polpaico aumenta en el siguiente orden; Cd < Cr < Ni < Pb < Zn < Cu.

También se realizó la determinación de estos metales en suelos enmendados con biosólidos en distintas concentraciones. En las Figuras 2 y 3 se muestra el contenido total de metales pesados en suelos mezclados con biosólido en concentraciones de 0,30, 90 y 200 Mg/ha.



**Figura 2.** Contenido total de Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en suelo Taqueral enmendado con biosólido en dosis 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup>.



**Figura 3.** Contenido total de Cr, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn en suelo Polpaico enmendado con biosólido en dosis 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup>.

En el suelo Taqueral se observa que la concentración de Cr, Cu y Zn aumenta significativamente con el aumento de la concentración de biosólido, sin embargo la concentración de Ni y Pb se mantiene relativamente constante a medida que aumenta la concentración de biosólido, por otro lado la concentración de Cd, se encuentra bajo el límite de detección de la técnica.

En el suelo Polpaico se observa para todos los metales que a medida que aumenta la concentración de biosólido, aumenta también la concentración de estos, al igual que en suelo Taqueral la concentración de Cd, se encuentra bajo el límite de detección.

En la Tabla 8, adjuntada en anexo se pueden observar los valores numéricos y desviación estándar relativa obtenidas para el contenido total de Cr, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con biosólido en dosis 0,30,90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup>.

#### **4.2.2 Extracción secuencial de Cr, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn**

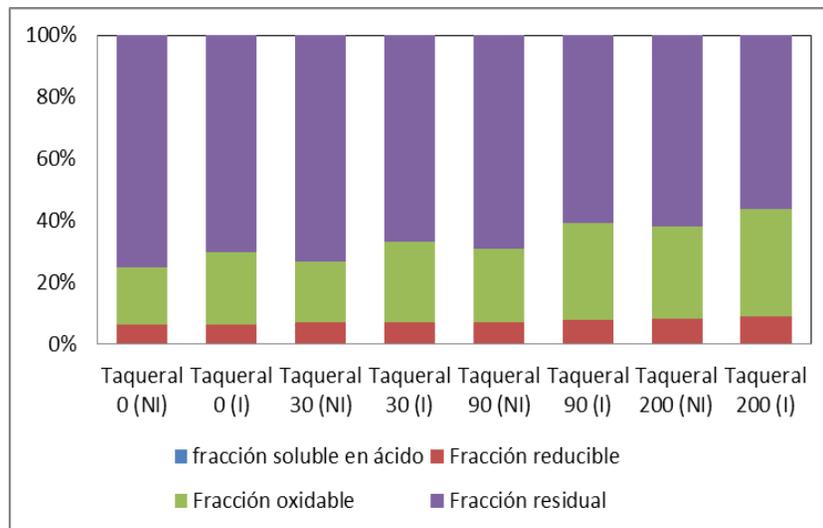
La extracción secuencial BCR, nos entrega información sobre las formas químicas en que se encuentran los metales traza en el suelo, definiéndose cuatro fracciones: soluble en ácido (1º fracción), reducible (2º fracción), oxidable (3º fracción) y residual (4º fracción). En las Figuras que siguen en esta sección (Figura 4 – Figura 13) 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 incremento con la aplicación de biosólidos (Ahumada, 2007).

## ❖ Cobre

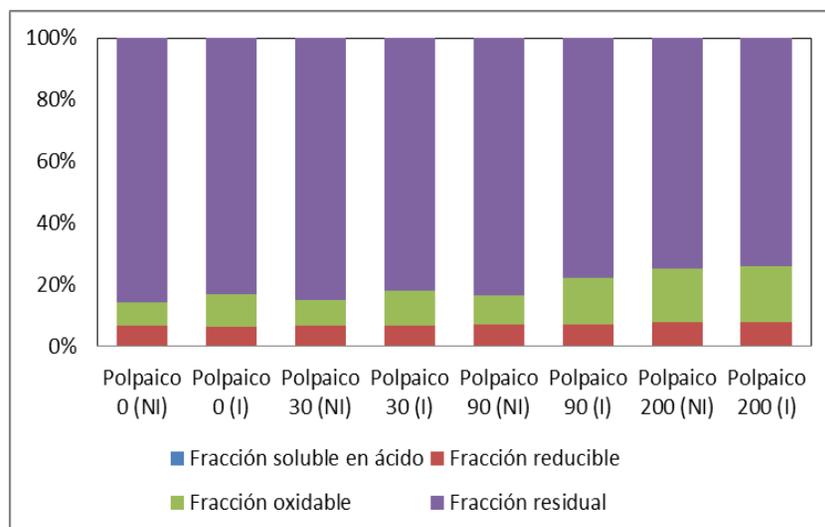
En las Figuras 4 y 5 se observa la distribución porcentual de Cu en los suelos Taqueral y Polpaico respectivamente, tratados con las distintas dosis de biosólido, antes y después de la incubación.

En ambos suelos Taqueral y Polpaico se observa que tanto la fracción reducible como la fracción oxidable aumentan su distribución porcentual al ser sometidos a una incubación, como consecuencia de esto, la fracción residual se ve disminuida después de cada incubación, debido a que los metales, por efecto de los microorganismos y condiciones reguladas cambian su forma química y se redistribuyen en otras fracciones.

La fracción soluble en ácido no es detectable.



**Figura 4.** Distribución porcentual de Cu extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Taqueral control y enmendado con dosis de 30, 90 y 200  $Mg ha^{-1}$  de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.

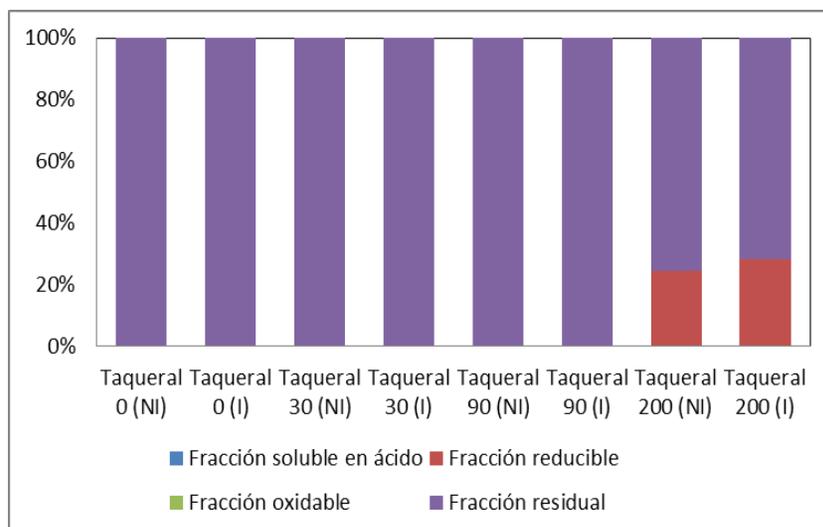


**Figura 5.** Distribución porcentual de Cu extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Polpaico y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.

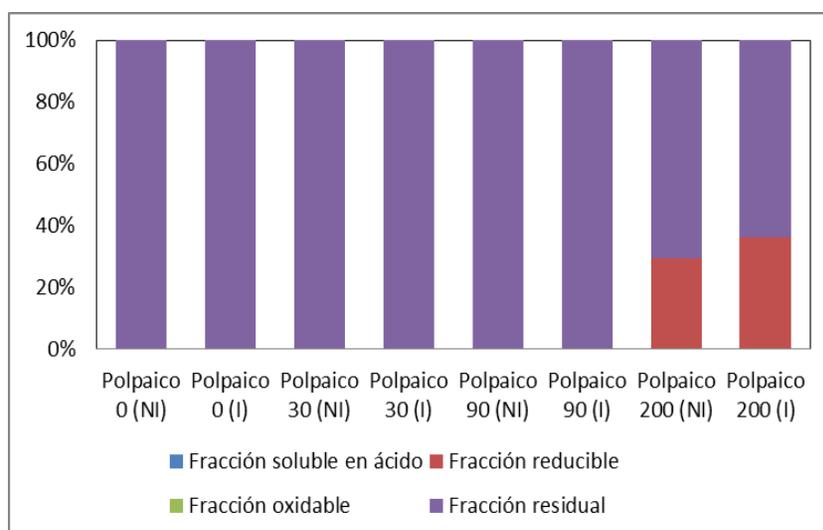
#### ❖ **Níquel**

En la Figura 6 y 7, se muestra la distribución porcentual de Ni en suelo Taqueral y Polpaico 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 cuando la dosis es la más alta (200 Mg ha<sup>-1</sup>) y aumenta la fracción reducida (2<sup>o</sup> fracción). Al incubar los suelos, se observa que la fracción residual disminuye aún más en los suelos tratados con 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, y por lo tanto aumenta en la misma proporción la fracción reducida del metal. La fracción lábil (soluble en ácido) y oxidable no son detectables.



**Figura 6.** Distribución porcentual de Ni extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Taqueral y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.



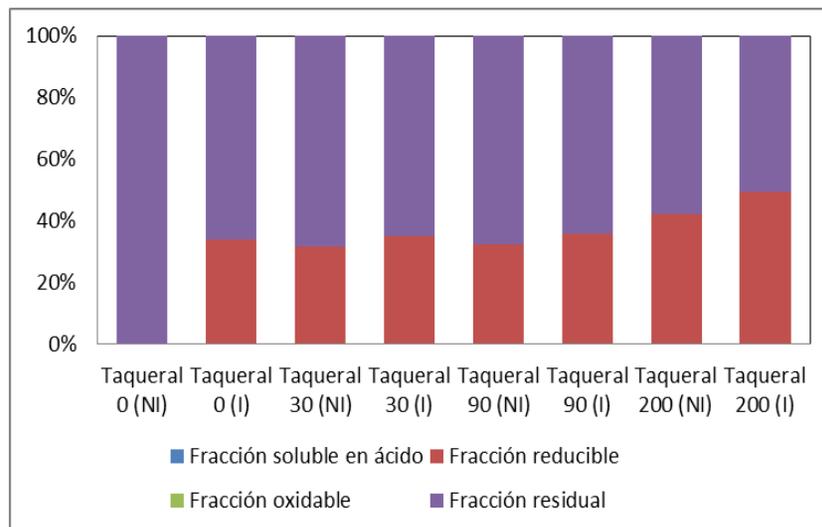
**Figura 7.** Distribución porcentual de Ni extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Polpaico y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.

## ❖ **Plomo**

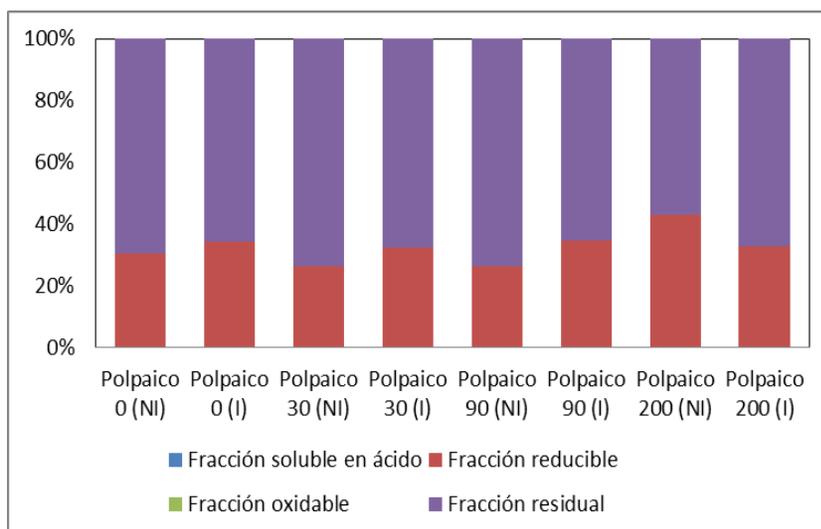
Las Figuras 8 y 9 muestran la distribución porcentual de Pb en suelos Taqueral y Polpaico respectivamente, a diferentes dosis de aplicación de biosólido y en condiciones antes y después de la incubación.

La fracción más importante es la residual, seguida de la fracción reducible. Con respecto a la aplicación de biosólidos en ambos suelos la fracción reducible de Pb, aumenta con el aumento de la dosis de biosólido aplicada, reduciéndose la fracción residual. Con respecto a la incubación de los suelos, la fracción residual disminuye aun más, aumentando la fracción reducible de Pb, con algunas excepciones poco significativas.

Las fracciones soluble en ácido y oxidable no son detectables.



**Figura 8.** Distribución porcentual de Pb extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Taqueral y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.



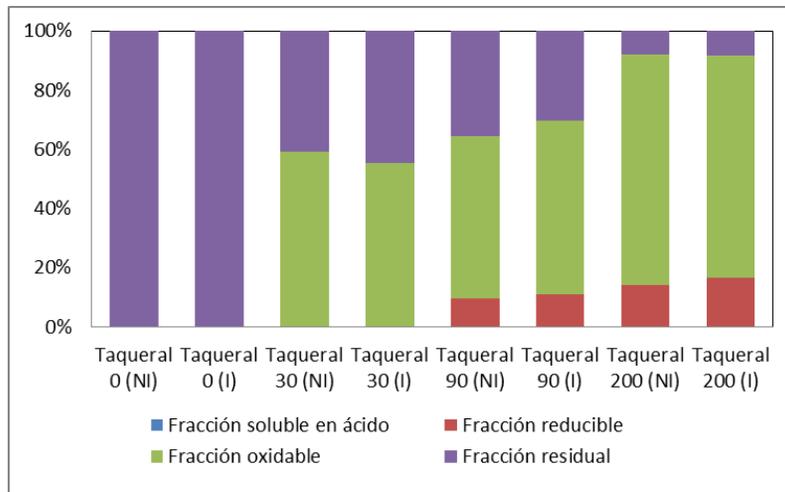
**Figura 9.** Distribución porcentual de Pb extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Polpaico y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.

#### ❖ Cromo

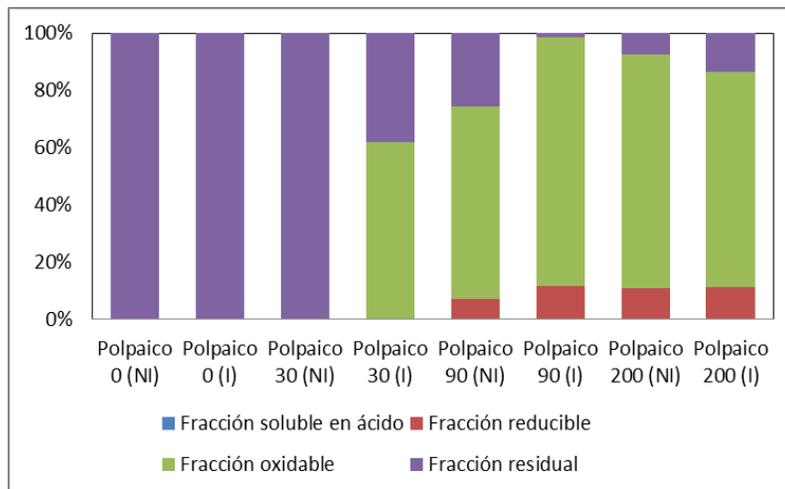
En la Figura 10 y 11 se puede ver la distribución porcentual de Cr en los suelos Taqueral y Polpaico respectivamente, tratados con las distintas dosis de biosólido, antes y después de la incubación.

En ambos suelos se puede observar que la fracción predominante es la residual a bajas concentraciones de biosólido. Esta fracción generalmente disminuye al aumentar la dosis de biosólido aplicado. En ambos suelos, con el incremento en las dosis de biosólidos aplicado, se observa un aumento significativo de las fracciones de Cr reducible y oxidable, sobre todo de esta última, que correspondería a los metales asociados a la materia orgánica.

En general, como consecuencia de la incubación de los suelos se produce una disminución en la fracción residual, y un aumento en la fracción reducible, sin embargo no existe una tendencia clara con respecto al aumento o disminución de la fracción oxidable, a pesar de ello los cambios nos son significativos. La fracción soluble en ácido no es detectable.



**Figura 10.** Distribución porcentual de Cr extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Taqueral y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.



**Figura 11.** Distribución porcentual de Cr extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Polpaico y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.

## ❖ **Zinc**

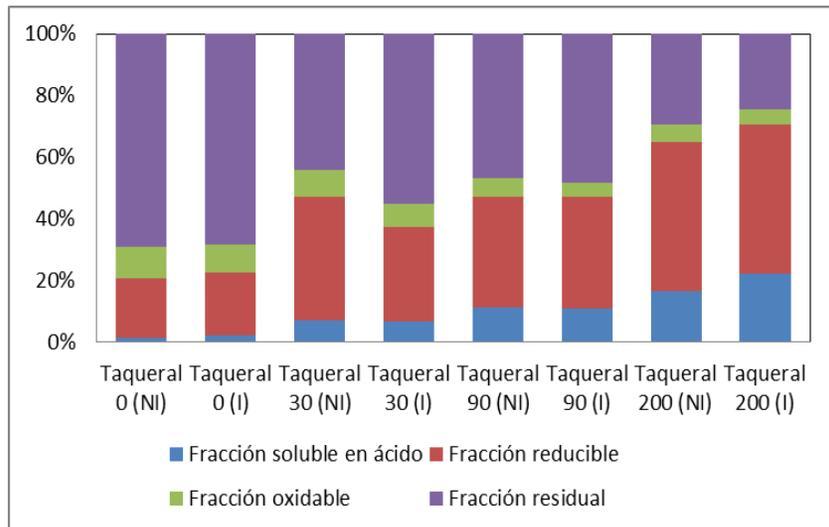
La Figura 12 y 13 muestran la distribución porcentual de Zn en suelo Taqueral y Polpaico respectivamente, y el efecto de la aplicación de biosólido, antes y después de la incubación.

En ambos suelos la fracción dominante es la residual, la cual disminuye al aumentar la dosis de biosólido. En ambos casos, se puede apreciar que el contenido de Zn en la fracción residual disminuye después de la incubación.

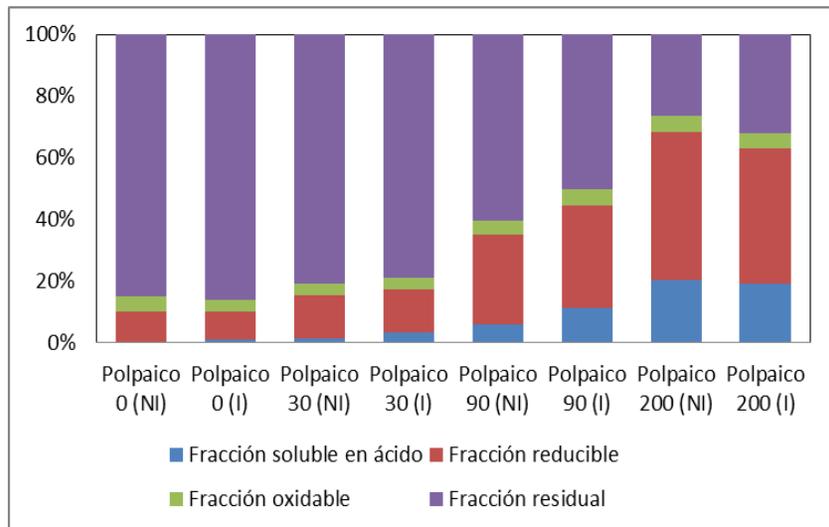
Ambos suelos muestran un incremento de la disponibilidad de Zn, representada por el aumento del metal en la fracción soluble en ácido. La fracción soluble en ácido aumenta significativamente con la aplicación de biosólido, principalmente con la dosis  $30 \text{ Mg ha}^{-1}$ , para luego aumentar con las dosis más altas. En ambos suelos después de la incubación, esta fracción aumenta respecto al suelo control.

En ambos suelos la fracción de Zn reducible, presentan una dependencia directa con la aplicación de dosis crecientes de biosólidos. Con respecto a la incubación de los suelos, no se observa una tendencia clara, sin embargo en la mayoría de los casos esta fracción disminuye luego de la incubación.

Con respecto a la fracción oxidable, esta no presenta cambios significativos con respecto al aumento de la dosis de biosólido aplicada y la incubación de los suelos, es decir se mantiene relativamente constante en ambos suelos.



**Figura 12.** Distribución porcentual de Zn extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Taqueral y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.



**Figura 13.** Distribución porcentual de Zn extraído secuencialmente al utilizar el método BCR en suelo Polpaico y enmendado con dosis de 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, antes (NI) y después de (I) de la incubación.

En las Tablas 9-16 presentadas en anexo se pueden observar los valores de las concentraciones de los diferentes metales en estudio obtenidas para el fraccionamiento de los suelos antes y después de la incubación.

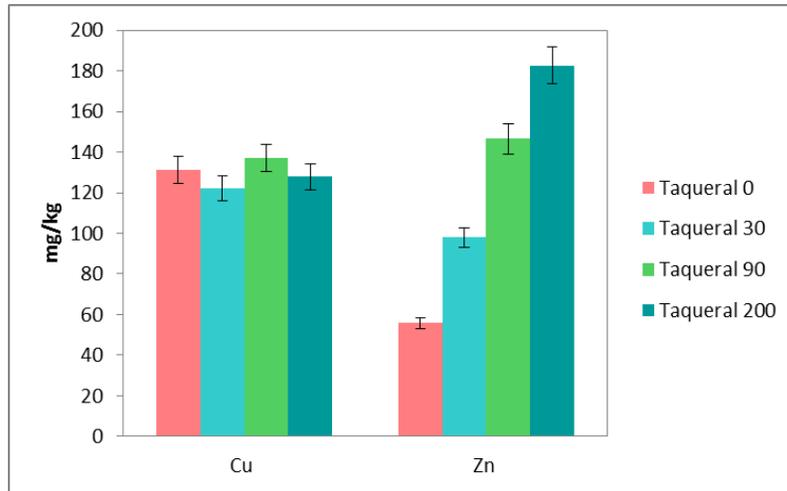
#### **4.3 Biodisponibilidad de metales traza en cultivos de plantas de Maravilla**

En las Figuras 14 y 15 se muestra el contenido total de metales trazas en plantas de maravilla cultivadas en suelos enmendados con distintas dosis de biosólido.

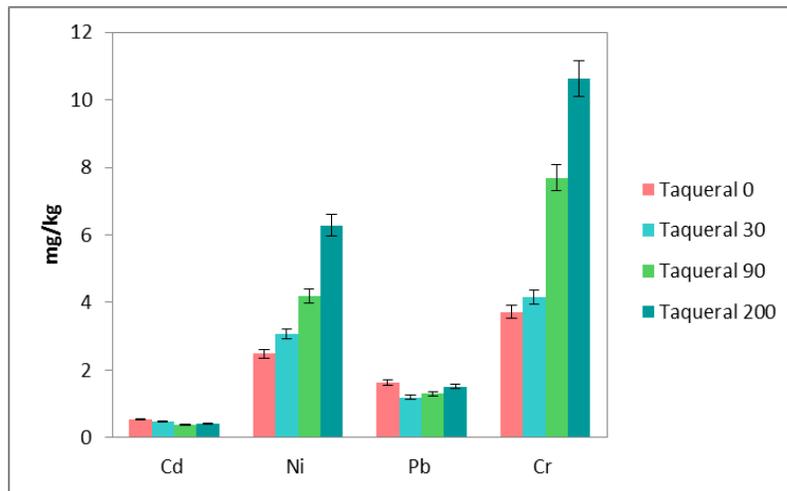
Se encontró que Cu y Zn son los metales más absorbidos por las plantas, lo cual concuerda con que estos metales, son los que se encuentran en mayor cantidad tanto en los suelos, como en el biosólido. La biodisponibilidad de Zn aumenta a medida que aumenta la dosis de biosólido en el suelo, sin embargo en el caso del Cu no hay una tendencia regular. La biodisponibilidad de Cd y Pb es baja, lo cual concuerda con el bajo contenido de estos metales en ambos suelos, y por ende no hay una tendencia regular de la concentración de estos metales absorbidos por las plantas.

Por otro lado Cr y Ni, fueron absorbidos por las plantas en forma similares, observándose una tendencia clara en el suelo Taqueral, ya que a medida que aumenta la dosis de biosólido aplicado al suelo, aumenta la absorción de estos metales, sin embargo en el suelo Polpaico, la concentración máxima de Cr y Ni absorbida por las plantas alcanza un máximo en el suelo enmendado con  $90 \text{ Mg ha}^{-1}$  y luego disminuye su concentración en el suelo enmendado con  $200 \text{ Mg ha}^{-1}$ , lo cual podría deberse a un mecanismo de defensa de la planta a nivel rizosférico, para disminuir la absorción de éste elemento, ya que el biosólido también aporta Ni y Cr, y sumado a lo que contiene en el suelo, podría sobrepasar el límite de tolerancia de la planta para absorber estos metales.

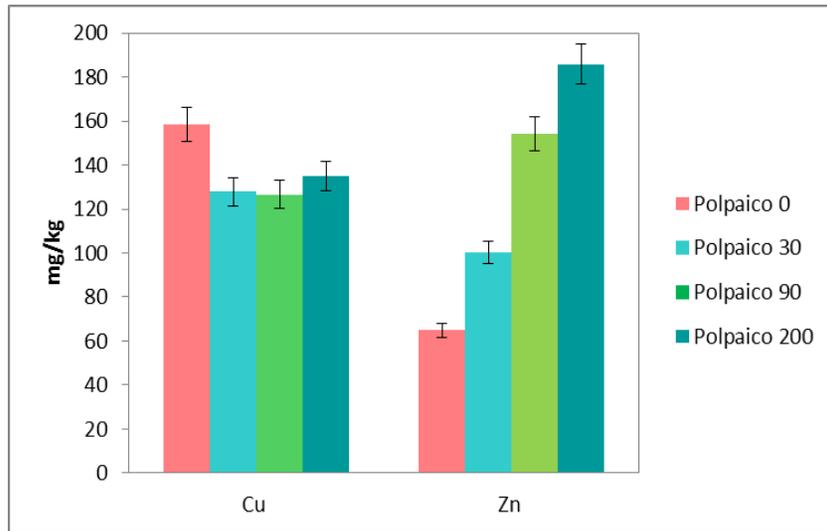
En consecuencia la biodisponibilidad de estos metales en ambos suelos sigue el siguiente orden  $Zn > Cu > Cr > Ni > Pb > Cd$ .



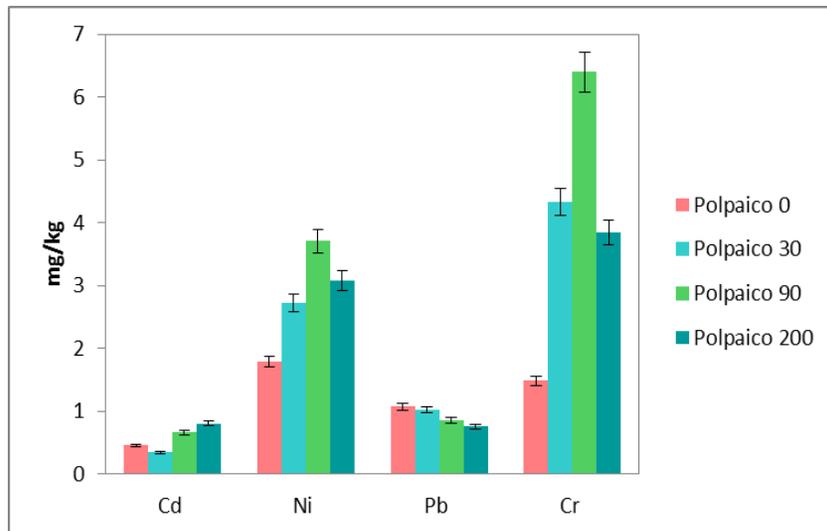
**Figura 14.** Contenido de Cu y Zn en cultivos de Maravilla sembrados en suelo Taqueral y enmendado con biosólido en dosis 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup>.



**Figura 15.** Contenido de Cd, Ni, Pb y Cr en cultivos de Maravilla sembrados en suelo Taqueral y enmendado con biosólido en dosis 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup>.



**Figura 16.** Contenido de Cu y Zn en cultivos de Maravilla sembrados en suelo Polpaico control y enmendado con biosólido en dosis 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup>.



**Figura 17.** Contenido de Cd, Ni, Pb y Cr en cultivos de Maravilla sembrados en suelo Polpaico control y enmendado con biosólido en dosis 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup>.

#### 4.4 Determinación de $C_E$ a través de la técnica DGT

En la Tabla 5, se muestra los valores obtenidos para la concentración del metal encontrada por medio del dispositivo DGT ( $C_{DGT}$ ) y la concentración del metal en el agua de poro ( $C_{do}$ ) calculadas respectivamente a partir de la concentración de metal absorbida por la resina Chelex del dispositivo DGT y del metal disuelto en el agua sobrenadante de cada pasta de saturación de suelo a distintas dosis de biosólido. Con estos valores, se calculó la concentración efectiva ( $C_E$ ) del metal, la cual se correlacionó con la fracción biodisponible del metal para las plantas de maravilla.

Se encontró en ambos suelos, que Zn, Cr y Ni tanto en  $C_{DGT}$  como en  $C_{do}$  incrementaron su concentración a medida que aumentó la dosis de biosólido en el suelo. Cobre en cambio, no mostró una tendencia muy clara para  $C_{DGT}$  en suelo Taqueral, sin embargo en suelo Polpaico este parámetro se mantuvo constante respecto de las diferentes dosis de biosólido aplicado al suelo, mientras que  $C_{do}$  en ambos suelos incrementó su valor, con el aumento de la dosis de biosólido. Por otro lado, Cd y Pb en ambos suelos, presentaron valores de  $C_{DGT}$  y  $C_{do}$  muy pequeños y bajo los límites de detección.

Al igual que lo encontrado en el estudio de biodisponibilidad con plantas de Maravilla, respecto de las concentraciones de metales en éstas, los valores de  $C_{DGT}$  en ambos suelos siguieron el siguiente orden: Zn > Cu > Ni > Cr > Pb > Cd.

**Tabla 5. Concentración de los metales en el DGT y en el agua de poro, en suelos Taqueral y Polpaico tratados con dosis 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido BET 2011.**

Dosis	Cu		Cd		Ni		Pb		Cr		Zn	
	C <sub>DGT</sub> μg/L	C <sub>do</sub> ηmol/cm <sup>3</sup>										
<b>Suelo Taqueral</b>												
<b>0</b>	5,5	0,8	ND	ND	1,0	0,1	0,1	ND	0,2	0,1	5,4	0,1
<b>30</b>	2,0	0,6	ND	ND	2,7	0,7	0,1	ND	0,5	0,5	5,4	0,3
<b>90</b>	2,1	0,9	ND	ND	10,7	2,0	0,1	ND	1,1	1,1	13,2	0,4
<b>200</b>	3,0	1,3	ND	ND	23,9	4,1	0,1	ND	1,9	1,9	20,0	0,5
<b>Suelo Polpaico</b>												
<b>0</b>	3,2	0,3	ND	ND	1,4	0,1	ND	ND	0,2	0,1	2,9	ND
<b>30</b>	3,3	0,4	0,1	ND	3,2	0,6	ND	ND	0,3	0,3	4,4	0,1
<b>90</b>	3,2	1,0	0,1	ND	8,7	1,5	ND	ND	0,5	0,5	11,4	0,5
<b>200</b>	4,0	1,7	ND	ND	14,5	3,3	0,1	ND	0,9	0,9	22,2	1,3

**ND:** no detectable

En la Tabla 6, se observan los valores obtenidos en la determinación de la biodisponibilidad de elementos trazas en suelos mediante la técnica DGT.

Se observó para ambos suelos que, al incrementar la dosis de biosólido aumenta el valor de la C<sub>E</sub> para Zn, Ni, y Cr. Los metales Cd y Pb mantienen un valor relativamente

constante a medida que se incrementó la dosis de biosólido, sin embargo para Cu, la tendencia es completamente irregular para ambos suelos.

Al igual que en el estudio de biodisponibilidad, la  $C_E$  de metales para ambos suelos sigue el mismo orden decreciente de concentración: Zn > Cu > Cr > Ni > Pb > Cd.

**Tabla 6. Concentración Efectiva ( $C_E$ ) determinada mediante la técnica DGT y la aplicación computacional DIFS, para los suelos Taqueral y Polpaico tratado con biosólido en dosis 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup>.**

Dosis	Cu		Cd		Ni		Pb		Cr		Zn	
Mg ha <sup>-1</sup>	$C_E$	DER	$C_E$	DER	$C_E$	DER	$C_E$	DER	$C_E$	DER	$C_E$	DER
	µg/L	%	µg/L	%	µg/L	%	µg/L	%	µg/L	%	µg/L	%
<b>Suelo Taqueral</b>												
<b>0</b>	126	12	0,835	0,1	23,4	4,3	1,75	6,4	5,49	10,4	136	6,2
<b>30</b>	50,7	4,0	0,550	0	64,8	2,6	2,31	0,2	11,6	3,1	149	17,5
<b>90</b>	45,8	7,0	0,541	23,6	257	3,9	1,60	10	25,61	1,9	324	3,8
<b>200</b>	70,8	4,1	0,450	0,0	572	2,2	1,80	6,1	41,4	2,4	490	1,2
<b>Suelo Polpaico</b>												
<b>0</b>	76,9	0,3	0,519	0	49,7	26,7	1,10	4,9	4,06	21,6	68,6	1,3
<b>30</b>	71,8	12,3	1,12	10,9	72,8	1,5	0,86	6,1	5,54	6,0	102	3,6
<b>90</b>	56,0	7,7	1,20	0	199	1,8	1,12	0,2	10,4	2,5	275	5,1
<b>200</b>	93,9	0,2	0,98	6,1	330	1,4	1,41	7,4	18,6	5,8	518	7,0

**DER:** Desviación Estándar Relativa

#### ***4.5 Comparación entre la fracción biodisponible obtenida a través del cultivo de plantas de maravilla y la fracción biodisponible estimada a través de la técnica DGT.***

La biodisponibilidad puede ser medida por métodos químicos utilizando agentes quelantes como EDTA o DTPA, los cuales quelan todo ión metálico que se encuentre en la solución del suelo (Kabata-Pendias, 2000; Reichaman, 2002). Otra forma de estimar la biodisponibilidad de los metales pesados es determinando la absorción de cada metal a través de ensayos con plantas. Los ensayos de invernadero ofrecen una buena alternativa, son de corta duración y permiten controlar las variables de temperatura y humedad. Por otro lado la estimación de la biodisponibilidad de metales pesados por medio de extracción secuencial constituye una herramienta utilizada para entender la química de los metales pesados y metaloides del suelo. Está basada en una solubilización secuencial de los metales, utilizando reactivos químicos que van incrementando su capacidad de extracción en cada etapa sucesiva del fraccionamiento (Keller y Védy, 1994). La información que proporciona este procedimiento es potencialmente útil para predecir la disponibilidad y movilidad de los metales pesados en suelos agrícolas y suelos contaminados (Miller et al., 1986). La técnica DGT es una buena herramienta para evaluar la biodisponibilidad de metales en plantas, ya que imita el principal mecanismo de absorción de la planta, reduciendo localmente la concentración en la solución de suelo, incluyendo el reabastecimiento desde la fase sólida. Por lo tanto es posible la comparación entre las tres técnicas antes mencionadas (Nowal et al., 2004). De esta manera, los resultados obtenidos de los métodos estimativos de la fracción biodisponible: fracción soluble en ácido de la extracción secuencial de los suelos y la CE determinada por DGT-DIFS, se relacionaron con el contenido de metales en plantas de Maravilla, a través de un análisis de regresión simple, para evaluar la eficiencia de estas técnicas en la estimación de la fracción biodisponible de metales.

#### 4.5.1 Correlación de la concentración de los metales en plantas de Maravilla y $C_E$

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

**Tabla 7. Evaluación de la técnica DGT para estimar la fracción biodisponible de metales traza a través de la correlación (R) entre la concentración efectiva  $C_E$  y el contenido total del metal en la planta.**

Metal	Suelo Taqueral			Suelo Polpaico		
	R <sup>a</sup>	ES <sup>b</sup> (%)		R	ES (%)	
<b>Pb</b>	-0,50	15		-0,017	41	
<b>Cd</b>	0,81	17	***	0,38	32	*
<b>Zn</b>	0,83	3,7	***	0,92	3,4	***
<b>Cu</b>	0,11	50		0,19	26	
<b>Ni</b>	0,92	4,1	***	0,43	73	*
<b>Cr</b>	0,77	25	***	0,26	57	*

<sup>a</sup> : Coeficiente de correlación

<sup>b</sup> : Error estándar

\* : Estadísticamente significativo a nivel de 90%

\*\* : Estadísticamente significativo a nivel de 95%

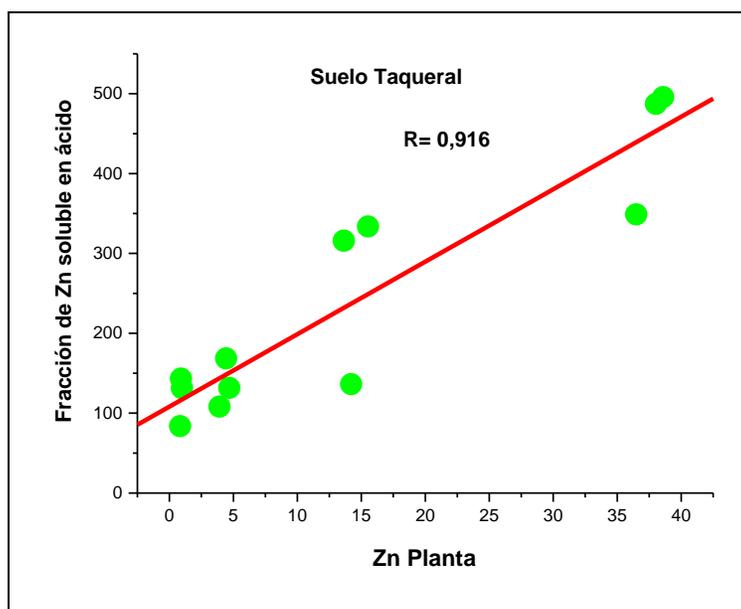
\*\*\* : Estadísticamente significativo a nivel de 99%

La Técnica DGT, permitió predecir la fracción biodisponible de Ni, Zn, Cd, Cr en el suelo Taqueral, mientras que para Cu y Pb no se encontró correlación. Esto posiblemente se debe a que a medida que se incrementa la dosis de biosólido no hay un-aumento de  $C_E$ , lo cual coincidiría con lo observado en el ensayo con plantas, ya que la fracción biodisponible de estos dos metales disminuyó cuando la aplicación de biosólido fue mayor.

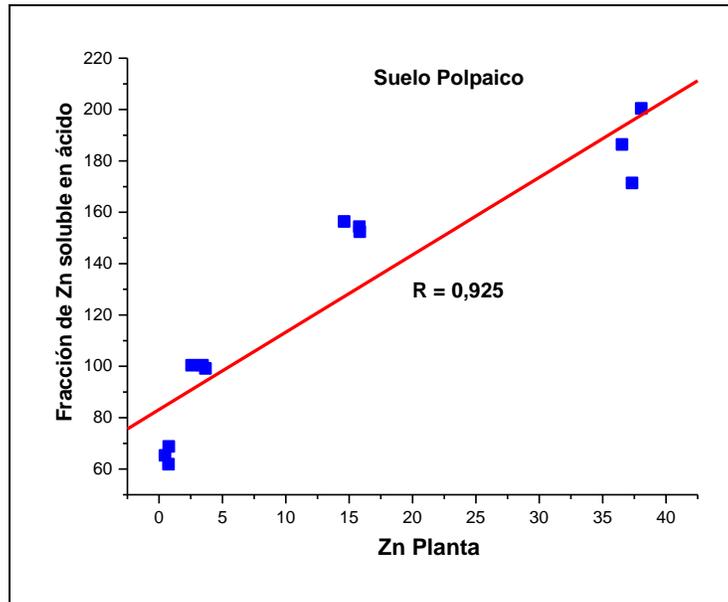
Por otro lado, para el suelo Polpaico sólo fue posible la predicción de la fracción biodisponible de Zn, ya que para los demás metales Cu, Cd, Ni Pb y Cr no se obtuvieron valores significativos para el coeficiente de correlación, esto podría deberse a que  $C_E$  varía aleatoriamente con el aumento de la dosis de biosólido aplicado al suelo.

#### **4.5.2 Correlación entre la fracción soluble en ácido y contenido de metales en plantas de Maravilla**

Las Figuras 18 y 19 muestran que sólo se encontró una correlación directa entre la fracción lábil de Zn en los suelos y el contenido total de Zn en las plantas de Maravilla. Con valores de R: de 0,916 y 0,925 para suelo Taqueral y Polpaico respectivamente. Lo cual coincidiría con los resultados encontrados a través de la primera fracción de la extracción secuencial, ya que sólo para este metal se encontró un aumento de la fracción lábil o disponible con la dosis de biosólido aplicado.



**Figura 18.** Correlación ( $R$ ) entre el contenido total del metal en la planta y la primera fracción de la extracción secuencial BCR de los suelos Taqueral.



**Figura 19.** Correlación ( $R$ ) entre el contenido total del metal en la planta y la primera fracción de la extracción secuencial BCR de los suelos Polpaico.

## 5. Conclusiones

- ❖ El orden del contenido total de los metales en el biosólido fue: Zn > Cr > Cu > Ni > Pb > Cd. Las concentraciones encontradas en este sustrato se encontraron bajo los límites definidos por la norma chilena de aplicación de biosólidos a suelos agrícolas.
- ❖ La aplicación de biosólido produjo un aumento en el contenido total de metales traza en los suelos, lo cual fue más significativo para Cr, Cu y Zn. En ambos suelos, Cd, se encuentra bajo el límite de detección de la técnica. Las concentraciones de todos los metales en estudio se encuentran dentro de los límites fijados por la norma chilena, por lo tanto podría utilizarse biosólido como enmienda.
- ❖ Todos los metales estudiados se encuentran mayoritariamente en la fracción residual de los suelos. Con la aplicación de biosólidos se genera un aumento principalmente de la fracción soluble en ácido sólo para Zn, en la fracción reducible para Cu, Ni, Pb, Cr y Zn y en la fracción oxidable para el caso de Cu y Cr. Estos incrementos por tanto, provocan una disminución de la fracción residual.
- ❖ La incubación en los suelos produjo un aumento de Cu, Ni, Pb, y Cr en la fracción reducible de ambos suelos. Solo Cu presentó un incremento en la fracción oxidable, los otros metales mantuvieron relativamente constante su concentración. Cinc incrementó su concentración en la fracción soluble en ácido. Según lo descrito anteriormente se puede concluir que la incubación activa a los microorganismos permitiendo, bajo condiciones reguladas, que los metales cambien su forma química y se redistribuyan en otras fracciones.

- ❖ Los metales más absorbidos por las plantas fueron Cu y Zn, mientras que Cd fue en de menor concentración. Al aplicar biosólido al suelo en dosis crecientes, el contenido de Zn presente en las plantas aumentó, en cambio en el caso de Cu, la fracción biodisponible de éste disminuyó. En el suelo Taqueral las concentraciones de Ni y Cr aumentaron a medida que aumentó la dosis de biosólido, mientras que Cd y Pb no presentaron variación. En el suelo Polpaico, Cr y Ni llegaron a una concentración máxima y luego decrecen al aplicar la dosis máxima de biosólido al igual que Pb, que disminuyó su biodisponibilidad al aumentar la dosis de biosólido.
- ❖ La eficiencia de la técnica DGT en la determinación de biodisponibilidad de los metales traza en los suelos, que fue evaluada a través del modelo matemático de correlación simple entre las variables,  $C_E$  y el contenido de metales en los cultivos de Maravilla, no dieron buenos resultados en todos los casos estudiados. Sólo se pudo predecir la fracción biodisponible para Ni, Zn, Cd y Cr en suelo Taqueral, obteniéndose respectivamente valores de R: 0,92; 0,83; 0,81; 0,77. Para el suelo Polpaico sólo se pudo obtener correlaciones para Zn, encontrándose un valor significativo de R de 0,92. Sin embargo, no fue posible correlacionar ambas variables para el resto de los metales.
- ❖ A través del ajuste de un modelo de regresión simple, se encontró en general que la fracción soluble en ácido contribuyó positivamente a la absorción de Zn en las plantas cultivadas.
- ❖ Los resultados obtenidos con la técnica DGT fueron satisfactorios para la predicción de la biodisponibilidad de metales traza en suelos, sólo para Ni y Zn, en suelo Taqueral y Polpaico respectivamente.

- ❖ El sistema DGT constituye una herramienta confiable, simple, que emplea tiempos menores de experimentación, para poder estimar la biodisponibilidad de metales pero dependería de la naturaleza de éstos y del tipo de suelo.

## 6. Referencias

- ◆ Ahumada I., Escudero P., Carrasco A., Castillo G., Ascar, L., and Fuentes, E.. 2004. Use of sequential extraction to asses the influence of sewage sludge amendment of metal mobility in Chilean soils. *J. Environmental Monitoring*. 5: 327-334.
- ◆ Ahumada, I., O. Gudenschwager, M.A. Carrasco, G. Castillo, L. Ascar and P. Richter. 2009. Copper and Zinc bioavailabilities to ryegrass (*Lolium perenne* L.) and subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) grown in biosólido treated Chilean soils. *J. Environ. Manage.* 90: 2665 – 2671.
- ◆ Ahumada I., Ascar L., Pedraza C., Vásquez V., Carrasco A., Richter P., and Brown S. 2011. Determination of the Bioavailable Fraction of Cu and Zn in Soils Amended with Biosolids as Determined by Diffusive Gradients in Thin Films (DGT), BCR Sequential Extraction, and Ryegrass Plant. *Water Air Soil Pollut.* 219: 225 - 237.
- ◆ Bacon J.R, Davidson C.M. 2008. Is there a future for sequential chemical extraction?, *Critical Review. Analyst*, 133: 25-46.
- ◆ Cattani I., Fragoulis G., Bocelli R., Capri E. 2006. Copper bioavailability in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) grown in two Italian soils. *Chemosphere*. 64:1972-1979.
- ◆ Davison, W., Hooda, P., Zhang, H., & Edwards, A. C. 2000. DGT measured fluxes as surrogates for metal by plants. *Advances in Environ. Res.*, 3: 550–555,

- ◆ Zhang, H.; Zhao, F.J.; Sun, B.; Davison, W.; McGrath, S.P. 2001. A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environ. Sci. & Technol.* 35: 2602-2607.
  
- ◆ H. Zhang. 2003 DGT—for measurements in waters, soils and sediments. University of Lancaster. <http://www.dgtresearch.com/dgtresearch/dgtresearch.pdf>.
  
- ◆ DS-4, 2009. República de Chile. Reglamento para el manejo de lodos generados en plantas de tratamiento de aguas servidas.
  
- ◆ Harper, M.P., Davison, W., Tych, W., 2000. DIFS – a modelling and simulation tool for DGT induced trace metal remobilisation in sediments and soils. *Environ. Modell. Software.* 15, 55–66.
  
- ◆ Jamali, M. K., Kazi, T. G., Arain, M. B., Afridi, H. I., Jalbani N., Memon A.R. and Shah, A. 2007. Heavy metals from soil and domestic sewage sludge and their transfer to Sorghum plants. *Environ. Chem. Lett.* 5:209-218.
  
- ◆ Nolan, A. L., Zhang, H., & McLaughlin, M. J. 2005. Prediction of zinc, cadmium, lead, and copper availability to wheat in contaminated soils using chemical speciation, diffusive gradients in thin films, extraction, and isotopic dilution techniques. *J. Environ. Qual.* 34: 496–507.
  
- ◆ Nowack B., Koehler S., Schulin R. 2004. Use of diffusive gradients in thin films (DGT) in undisturbed field soils. *Environ. Sci. Technol.* 38: 1133-1138.

- ◆ Sadzawka M.A. et al. Métodos de Análisis Recomendados para Suelos de Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Serie Actas INIA-N°34, Santiago, Chile. 2006.
- ◆ Sochaczewski L., Tych W., Davison B., Zhang H. 2007. 2D DGT induced fluxes in sediments and soils (2D DIFS). Environmental Modelling & Software. 22:14-23.
- ◆ Sutherland, R.A., and F.M.G. Tack. 2002. Determination of Al, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn in certified reference materials using the optimized BCR sequential extraction procedure. Analytica Chimica Acta 454:249 – 257.
- ◆ Zhang H., Zhao, F. J., Sun B., Davison W. and McGrath S.P. 2001. A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. Environ. Sci. Technol. 35: 2602-2607.

## 7. Anexo

**Tabla 8. Contenido total de Cr, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con biosólido en dosis 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup>**

Suelo (Mg/ha)	Cu (mg/Kg suelo)	DER %	Cd (mg/Kg suelo)	DER %	Ni (mg/Kg suelo)	DER %	Pb (mg/Kg suelo)	DER %	Cr (mg/Kg suelo)	DER %	Zn (mg/Kg suelo)	DER %
Taqueral 0	71,68	0,2	ND	-	9,26	5,7	12,70	0,5	14,69	1,6	49,32	0,5
Taqueral 30	73,91	2,5	ND	-	9,39	1,2	12,98	4,2	18,98	1,7	67,90	5,5
Taqueral 90	81,08	1,5	ND	-	10,60	0,8	13,68	0,3	39,01	9,1	130,77	8,1
Taqueral 200	95,48	7,7	ND	-	15,02	1,0	14,19	0,3	54,85	1,7	171,80	0,3
Polpaico 0	68,22	3,0	ND	-	12,14	0,6	15,73	1,7	11,51	3,1	93,15	0,9
Polpaico 30	69,45	0,8	ND	-	11,53	0,9	17,66	0,4	15,78	9,0	115,86	7,4
Polpaico 90	80,24	3,0	ND	-	13,53	1,5	19,65	0,9	28,26	7,0	143,09	5,0
Polpaico 200	90,95	0,5	ND	-	17,15	1,8	22,71	6,8	58,14	4,0	194,52	3,6

DER: Desviación Estándar Relativa

### ❖ Fraccionamiento de suelo y mezclas de suelo-biosólido antes de incubar

**Tabla 9. Fracción soluble en ácido de metales en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con dosis de 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, antes de la incubación.**

Suelo (Mg/ha)	Cu (mg/Kg suelo)	DER %	Cd (mg/Kg suelo)	DER %	Ni (mg/Kg suelo)	DER %	Pb (mg/Kg suelo)	DER %	Cr (mg/Kg suelo)	DER %	Zn (mg/Kg suelo)	DER %
Taqueral 0	ND	-	0,70	8,3								
Taqueral 30	ND	-	4,84	8,5								
Taqueral 90	ND	-	14,46	9,6								
Taqueral 200	ND	-	28,59	1,4								
Polpaico 0	ND	-	0,41	10,9								
Polpaico 30	ND	-	1,58	14,5								
Polpaico 90	ND	-	8,73	4,2								
Polpaico 200	1,86	1,5	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	39,64	0,7

DER: Desviación Estándar Relativa

**Tabla 10. Fracción reducible de metales en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con dosis de 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, antes de la incubación.**

Suelo (Mg/ha)	Cu (mg/Kg suelo)	DER %	Cd (mg/Kg suelo)	DER %	Ni (mg/Kg suelo)	DER %	Pb (mg/Kg suelo)	DER %	Cr (mg/Kg suelo)	DER %	Zn (mg/Kg suelo)	DER %
Taqueral 0	4,60	0,6	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	9,53	10,5
Taqueral 30	5,35	0,9	ND	-	ND	-	4,12	0,8	ND	-	27,21	4,2
Taqueral 90	5,82	4,0	ND	-	ND	-	4,42	6,3	3,79	2,2	47,22	1,3
Taqueral 200	7,66	1,7	ND	-	3,68	3,3	5,99	0,1	7,71	3,4	82,99	2,3
Polpaico 0	4,60	3,6	ND	-	ND	-	4,80	1,1	ND	-	8,90	5,3
Polpaico 30	4,63	5,0	ND	-	ND	-	4,68	0,2	ND	-	16,14	7,4
Polpaico 90	5,54	1,4	ND	-	ND	-	5,17	1,7	1,98	0,8	41,49	5,2
Polpaico 200	7,08	1,5	ND	-	5,06	0,9	9,75	2,2	6,31	1,0	93,27	0,6

DER: Desviación Estándar Relativa

**Tabla 11. Fracción oxidable de metales en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con dosis de 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, antes de la incubación.**

Suelo (Mg/ha)	Cu (mg/Kg suelo)	DER %	Cd (mg/Kg suelo)	DER %	Ni (mg/Kg suelo)	DER %	Pb (mg/Kg suelo)	DER %	Cr (mg/Kg suelo)	DER %	Zn (mg/Kg suelo)	DER %
Taqueral 0	13,12	2,2	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	5,04	0,9
Taqueral 30	14,47	0,7	ND	-	ND	-	ND	-	11,21	3,1	5,78	3,2
Taqueral 90	19,07	5,4	ND	-	ND	-	ND	-	21,38	2,3	7,82	4,6
Taqueral 200	28,72	2,0	ND	-	ND	-	ND	-	42,75	1,0	9,73	4,3
Polpaico 0	5,09	0,8	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	4,50	0,1
Polpaico 30	5,68	1,1	ND	-	ND	-	ND	-	6,74	9,7	4,57	2,8
Polpaico 90	7,70	1,7	ND	-	ND	-	ND	-	19,07	2,7	6,30	3,8
Polpaico 200	15,53	2,0	ND	-	ND	-	ND	-	47,49	2,5	9,92	6,2

DER: Desviación Estándar Relativa

**Tabla 12. Fracción Residual de metales en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con dosis de 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, antes de la incubación.**

Suelo (Mg/ha)	Cu (mg/Kg suelo)	DER %	Cd (mg/Kg suelo)	DER %	Ni (mg/Kg suelo)	DER %	Pb (mg/Kg suelo)	DER %	Cr (mg/Kg suelo)	DER %	Zn (mg/Kg suelo)	DER %
Taqueral 0	53,96	1,4	ND	-	9,50	5,7	12,70	0,5	14,69	1,6	34,06	6,6
Taqueral 30	54,09	0,8	ND	-	9,39	1,2	8,86	0,8	7,77	3,1	30,07	5,3
Taqueral 90	56,19	4,7	ND	-	10,60	0,8	9,26	6,3	13,83	2,3	61,27	5,2
Taqueral 200	59,11	1,9	ND	-	11,34	3,3	8,20	0,1	4,39	2,2	50,50	2,7
Polpaico 0	58,54	2,2	ND	-	12,14	0,6	10,93	1,1	11,51	3,1	79,35	5,4
Polpaico 30	59,15	3,1	ND	-	11,53	0,9	12,98	0,2	9,04	9,7	93,56	8,2
Polpaico 90	67,00	1,6	ND	-	13,53	1,5	14,48	1,7	7,21	1,8	86,57	4,1
Polpaico 200	66,48	1,7	ND	-	12,09	0,9	12,96	2,2	4,34	1,8	51,71	2,5

DER: Desviación Estándar Relativa

❖ **Fraccionamiento después de 30 días de incubación de suelo y mezclas suelo-biosólido**

**Tabla 13. Fracción soluble en ácido de metales en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con dosis de 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, después de la incubación.**

Suelo (Mg/ha)	Cu (mg/Kg suelo)	DER %	Cd (mg/Kg suelo)	DER %	Ni (mg/Kg suelo)	DER %	Pb (mg/Kg suelo)	DER %	Cr (mg/Kg suelo)	DER %	Zn (mg/Kg suelo)	DER %
Taqueral 0	ND	-	0,99	7,1								
Taqueral 30	ND	-	4,64	3,8								
Taqueral 90	ND	-	14,00	2,9								
Taqueral 200	ND	-	38,40	1,0								
Polpaico 0	ND	-	0,84	1,6								
Polpaico 30	ND	-	3,62	4,3								
Polpaico 90	ND	-	15,90	0,1								
Polpaico 200	ND	-	37,38	1,4								

DER: Desviación Estándar Relativa

**Tabla 14. Fracción reducible de metales en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con dosis de 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, después de la incubación.**

Suelo (Mg/ha)	Cu (mg/Kg suelo)	DER %	Cd (mg/Kg suelo)	DER %	Ni (mg/Kg suelo)	DER %	Pb (mg/Kg suelo)	DER %	Cr (mg/Kg suelo)	DER %	Zn (mg/Kg suelo)	DER %
Taqueral 0	4,53	2,5	ND	-	ND	-	4,29	2,2	ND	-	10,23	1,9
Taqueral 30	5,19	3,0	ND	-	ND	-	4,45	1,1	ND	-	20,78	1,1
Taqueral 90	6,45	4,3	ND	-	ND	-	4,87	0,1	4,32	4,3	47,84	1,3
Taqueral 200	8,61	0,2	ND	-	4,21	2,5	6,99	4,1	9,13	8,0	82,72	5,2
Polpaico 0	4,28	0,6	ND	-	ND	-	5,42	4,0	ND	-	8,43	4,1
Polpaico 30	4,70	2,1	ND	-	ND	-	5,70	6,9	ND	-	16,31	2,3
Polpaico 90	5,73	2,8	ND	-	ND	-	6,82	2,9	3,29	2,9	47,53	1,8
Polpaico 200	6,98	0,1	ND	-	6,19	2,0	7,46	2,1	6,60	2,6	85,50	0,1

DER: Desviación Estándar Relativa

**Tabla 15. Fracción oxidable de metales en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con dosis de 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, después de la incubación.**

Suelo (Mg/ha)	Cu (mg/Kg suelo)	DER %	Cd (mg/Kg suelo)	DER %	Ni (mg/Kg suelo)	DER %	Pb (mg/Kg suelo)	DER %	Cr (mg/Kg suelo)	DER %	Zn (mg/Kg suelo)	DER %
Taqueral 0	16,67	2,4	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	4,47	1,7
Taqueral 30	19,17	1,5	ND	-	ND	-	ND	-	10,53	5,7	5,09	0,6
Taqueral 90	25,34	2,2	ND	-	ND	-	ND	-	22,82	2,2	5,73	4,3
Taqueral 200	33,24	2,7	ND	-	ND	-	ND	-	41,16	1,2	8,39	1,8
Polpaico 0	7,15	1,1	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	3,50	5,9
Polpaico 30	7,71	0,6	ND	-	ND	-	ND	-	9,78	3,8	4,25	5,9
Polpaico 90	12,05	5,6	ND	-	ND	-	ND	-	24,51	2,1	7,93	3,0
Polpaico 200	16,60	5,8	ND	-	ND	-	ND	-	43,74	7,2	9,03	0,6

DER: Desviación Estándar Relativa

**Tabla 16. Fracción Residual de metales en suelos Taqueral y Polpaico enmendado con dosis de 0, 30, 90 y 200 Mg ha<sup>-1</sup> de biosólido, después de la incubación.**

Suelo (Mg/ha)	Cu (mg/Kg suelo)	DER %	Cd (mg/Kg suelo)	DER %	Ni (mg/Kg suelo)	DER %	Pb (mg/Kg suelo)	DER %	Cr (mg/Kg suelo)	DER %	Zn (mg/Kg suelo)	DER %
<b>Taqueral 0</b>	50,48	2,5	ND	-	9,50	5,7	8,41	2,2	14,69	1,6	33,64	3,6
<b>Taqueral 30</b>	49,54	2,3	ND	-	9,39	1,2	8,25	1,1	8,46	5,7	37,39	1,8
<b>Taqueral 90</b>	49,29	3,3	ND	-	10,60	0,8	8,81	0,1	11,87	3,3	63,20	2,8
<b>Taqueral 200</b>	53,64	1,5	ND	-	10,81	2,5	7,20	4,1	4,56	4,6	42,31	2,7
<b>Polpaico 0</b>	56,79	0,9	ND	-	12,14	0,6	10,32	4,0	11,51	3,1	80,39	3,9
<b>Polpaico 30</b>	57,04	1,4	ND	-	11,53	0,9	11,96	6,9	6,00	3,8	91,67	4,2
<b>Polpaico 90</b>	62,46	4,2	ND	-	13,53	1,5	12,83	2,9	0,46	2,5	71,73	1,6
<b>Polpaico 200</b>	67,37	3,0	ND	-	10,96	2,0	15,25	2,1	7,80	4,9	62,61	0,6

**DER:** Desviación Estándar Relativa