

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**EVALUACIÓN DE *Carpobrotus aequilaterus* Y APLICACIÓN DE ÁCIDO
FÚLVICO EN RELAVES MINEROS COMO ESTRATEGIA DE
FITORREMEDIACIÓN**

AMPARO SOFÍA DAZA CASTAÑÓN

Santiago, Chile

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**EVALUACIÓN DE *Carpobrotus aequilaterus* Y APLICACIÓN DE ÁCIDO
FÚLVICO EN RELAVES MINEROS COMO ESTRATEGIA DE
FITORREMEDIACIÓN**

**ASSESSMENT OF *Carpobrotus aequilaterus* AND FULVIC ACID APPLICATION IN
MINE TAILINGS AS A PHYTOREMEDIATION STRATEGY**

AMPARO SOFÍA DAZA CASTAÑÓN

Santiago, Chile

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**EVALUACIÓN DE *Carpobrotus aequilaterus* Y APLICACIÓN DE ÁCIDO
FÚLVICO EN RELAVES MINEROS COMO ESTRATEGIA DE
FITORREMEDIACIÓN**

Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniero Agrónomo.

AMPARO SOFÍA DAZA CASTAÑÓN

	Calificaciones
Profesor Guía	
Yasna Tapia F. Ingeniero en Alimentos, Dra.	6,5
Profesores Evaluadores	
Cristian Kremer F. Ingeniero Agrónomo, Ph.D.	6,7
Eduardo Loyola M. Ingeniero Agrónomo Enólogo, Dr.	6,4

Santiago, Chile

2017

AGRADECIMIENTOS

Dedico esta memoria de título principalmente a mis padres, Amparo Castañón y Eduardo Daza, que sin su apoyo y confianza no hubiera sido posible el término de esta etapa y de este proyecto. Ustedes a lo largo de mi vida han estado presentes, preocupados siempre por mi bienestar y educación, motivándome y acompañándome en todo momento. También dedico este proyecto a mi familia, quienes siempre me han dado su apoyo y su amor, entre ellos, mis abuelos, quienes son un ejemplo de vida.

Además quisiera agradecer a mi pareja, Erich Schmidt, quién durante los últimos 5 años ha sido un pilar fundamental en mi vida, otorgándome su cariño y estabilidad para enfrentar diversas situaciones en mi vida.

Agradezco a mi profesora guía, Yasna Tapia, por darme la oportunidad de realizar este proyecto con ella, manteniendo una excelente disposición a las dudas y consultas, facilitando todos sus conocimientos para lograr este trabajo.

Para finalizar, agradezco a mis amigas y amigos, también a mis compañeros de carrera durante mis años de Universidad, parte fundamental de mis años en Agronomía, quienes fueron un gran aporte para el logro de esta etapa de mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Objetivo general	4
Objetivos específicos.....	4
MATERIALES Y MÉTODOS	5
Lugar de estudio	5
Relave minero.....	5
Material vegetal.....	6
Ensayo en macetas y tratamientos.....	6
Caracterización física y química del relave minero	8
Análisis de agua de riego.....	9
Propiedades químicas de los ácidos fúlvicos.....	10
Evaluación del material vegetal	10
Análisis estadístico	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
Caracterización inicial del relave minero	13
Concentración de metales en plantas.....	15
Cobre.....	16
Hierro.....	17
Manganeso.....	19
Zinc	20
Discusión	21
Generación de biomasa	23
Índices de fitorremediación.....	27
Discusión	31
Caracterización final del relave minero.....	32
CONCLUSIONES	35
BIBLIOGRAFÍA	36
ANEXOS	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Caracterización inicial de <i>Carpobrotus aequilaterus</i>	6
Cuadro 2. Tratamientos de relaves mineros.....	7
Cuadro 3. Características químicas del agua de riego utilizada en el ensayo.....	9
Cuadro 4. pH y conductividad eléctrica de la solución de ácidos fúlvicos.....	10
Cuadro 5. Principales propiedades químicas de relave minero de Tranque Ovejería.....	13
Cuadro 6. Concentración de metales (mg kg^{-1}) por extracción por DTPA en relaves mineros.....	14
Cuadro 7. Concentración de cobre (mg kg^{-1}) en tejidos de <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tratamiento, después de 120 días de ensayo.....	17
Cuadro 8. Concentración de cobre (mg kg^{-1}) en tejidos de <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tiempo.....	17
Cuadro 9. Concentración de hierro (mg kg^{-1}) en tejidos de <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tratamiento y tiempo.....	18
Cuadro 10. Concentración de hierro (mg kg^{-1}) en parte aérea de <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tratamiento, después de 120 días de ensayo.....	18
Cuadro 11. Concentración de hierro (mg kg^{-1}) en parte aérea de <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tiempo.....	18
Cuadro 12. Concentración de manganeso (mg kg^{-1}) en tejidos de <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tratamiento, después de 120 días de ensayo.....	19
Cuadro 13. Concentración de manganeso (mg kg^{-1}) en tejidos de <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tiempo.....	20
Cuadro 14. Concentración de zinc (mg kg^{-1}) en tejidos de <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tratamiento, después de 120 días de ensayo.....	20
Cuadro 15. Concentración de zinc (mg kg^{-1}) en tejidos de <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tiempo.....	21
Cuadro 16. Materia seca (g) en parte aérea y raíces en <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tratamiento y tiempo.....	24
Cuadro 17. Materia seca (g) en parte aérea y raíces en <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tratamiento, después de 120 días de ensayo.....	25
Cuadro 18. Materia seca (g) en parte aérea y raíces en <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tiempo.....	25
Cuadro 19. Modelos ajustados para crecimiento en altura de <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , durante 120 días de ensayo en función de los tratamientos.....	26
Cuadro 20. Índices de fitorremediación de Cu en <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tratamiento, después de 120 días de ensayo.....	27
Cuadro 21. Índices de fitorremediación de Cu en <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tiempo.....	28
Cuadro 22. Índices de fitorremediación de Fe en <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según	

tratamiento y tiempo.	28
Cuadro 23. Factor de bioconcentración de Fe en <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tratamiento, después de 120 días de ensayo.....	29
Cuadro 24. Factor de bioconcentración de Fe en <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tiempo.	29
Cuadro 25. Índices de fitorremediación de Mn en <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tratamiento, después de 120 días de ensayo.....	30
Cuadro 26. Índices de fitorremediación de Mn en <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tiempo.	30
Cuadro 27. Índices de fitorremediación de Zn en <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tratamiento, después de 120 días de ensayo.....	30
Cuadro 28. Índices de fitorremediación de Zn en <i>Carpobrotus aequilaterus</i> , según tiempo.	31
Cuadro 29. Concentraciones de elementos traza metálicos en relave minero para tratamientos T0 y T1, frente a concentración inicial (Ci) después de 120 días de ensayo. .	33
Cuadro 30. Valores de pH y conductividad eléctrica en los tratamientos 0 y 1.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación del lugar de extracción del relave minero. Tranque de Relave ‘Ovejería’, Región Metropolitana, Chile.	5
Figura 2. Concentración de Cu, Fe, Mn y Zn (mg kg ⁻¹), en tejidos de <i>Carpobrotus aequilaterus</i> a los 60 días del ensayo. Barras sobre columnas indican desviación estándar (n=3).....	15
Figura 3. Concentración de Cu, Fe, Mn y Zn (mg kg ⁻¹), en tejidos de <i>Carpobrotus aequilaterus</i> a los 120 días del ensayo. Barras sobre columnas indican desviación estándar (n=3).....	16
Figura 4. Materia seca de parte aérea y raíces (g) de <i>Carpobrotus aequilaterus</i> a los 60 días (izquierda) y 120 días (derecha) de ensayo. Barras sobre columnas indican desviación estándar (n=3).	24
Figura 5. Curvas de crecimiento en altura ajustadas (n=3) de <i>Carpobrotus aequilaterus</i> durante un periodo de 120 días, en función de los tratamientos. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05, LSD de Fisher).	26

RESUMEN

La minería genera una gran cantidad de residuos, llamados relaves mineros, que pueden presentar altos contenidos de metales, siendo un potencial riesgo para el medioambiente. Una de las estrategias que se pueden utilizar para disminuir o mitigar la alta concentración de metales, es la fitorremediación, la cual utiliza plantas tolerantes a metales, que a través de su crecimiento y absorción de estos elementos, los retienen en sus tejidos, evitando la dispersión por el viento o lixiviación. Dentro de la estrategia de fitorremediación, se distinguen dos tipos, la fitoestabilización, donde la planta acumula metales preferentemente en la raíz y la fitoextracción, donde la planta acumula metales preferentemente en la parte aérea. Además, la fitorremediación puede ser complementada con la adición de enmiendas orgánicas, para favorecer el desarrollo de las plantas y la absorción de metales.

El objetivo general del trabajo es evaluar la especie *Carpobrotus aequilaterus* como cubierta vegetal en el relave minero y el efecto de la aplicación de ácidos fúlvicos como estrategia de fitorremediación.

El estudio se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la U. de Chile, mediante un ensayo en macetas de 2,5 litros, en condiciones de exterior, entre los meses de enero a mayo 2015. Se aplicó como enmienda los ácidos fúlvicos en dosis total 1: 7 mg maceta⁻¹ y dosis total 2: 14 mg maceta⁻¹. Las dosis fueron aplicadas en forma parcializada y disueltas en el agua de riego. Los tratamientos fueron los siguientes, T0: relave minero + dosis 1; T1: relave minero + dosis 2; T2: relave minero + doca; T3: relave minero + doca + dosis 1; T4: relave minero + doca + dosis 2. Al final del ensayo, se determinaron las concentraciones de metales (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn) en las plantas y la biomasa de parte aérea y raíz. En los relaves mineros, no se observaron concentraciones totales particularmente altas de metales, excepto para Cu, que también presentó mayor disponibilidad. Estos relaves carecen de fertilidad en relación a bajos niveles de N, P, K disponibles y materia orgánica. El pH fue ligeramente ácido y la conductividad eléctrica indica que el relave minero es no salino. Los metales Cd, Cr, Ni y Pb se encontraron bajo los límites de detección del instrumento de medición, por lo cual no fueron evaluados.

La adición de ácidos fúlvicos, no mostró ningún efecto en la absorción de Cu y Zn en planta, a los 60 y 120 días de ensayo. Sólo en raíz, los ácidos fúlvicos con dosis 1, aumentaron los niveles de Fe y Mn. Respecto a la generación de biomasa, la adición de ácidos fúlvicos no contribuyó a un mayor crecimiento. Se observó un índice de transporte de metales a la parte aérea menor a 1 para Cu y Fe, a los 60 y 120 días de ensayo, esto indica que la planta presentó una mayor concentración en las raíces, mostrando una capacidad de fitoestabilización de estos elementos. En contraste, para Mn y Zn, los valores del índice de transporte fueron mayores a 1, lo que indica una capacidad de fitoextracción de estos elementos. Respecto al factor de bioconcentración los resultados obtenidos fueron menores a 1 para todos los elementos, excepto para el Mn, lo que permite declarar a *Carpobrotus aequilaterus* como una planta potencialmente acumuladora de este elemento.

Palabras claves: Doca, sustancias húmicas, fitoextracción, fitoestabilización, metales.

ABSTRACT

Mining generates a large amount of wastes, called mine tailings, which can present high metal contents, being a potential risk to the environment. One of the strategies that can be used to decrease or mitigate the high concentration of metals is called phytoremediation, which uses plants that are tolerant to metals, that through their growth and absorption of these elements could retain them in their tissues, avoiding the dispersion by wind or leaching. Within the phytoremediation strategy, two types are distinguished, phytostabilization, where the plant accumulates metals preferably in the root and phytoextraction, where the plant accumulates metals preferably in the aerial part. In addition, phytoremediation can be complemented with the addition of organic amendments, to stimulate the development of plants and the absorption of metals.

The general objective of the work is evaluate the species *Carpobrotus aequilaterus* as a vegetation cover in mine tailings and the effect of the application of fulvic acids as a phytoremediation strategy.

The study was carried out in the Faculty of Agronomic Sciences of the U. of Chile, by an assay of pots of 2,5 liters, in external conditions between the months of January to May of 2015. Fulvic acids was applied like amendment in total dose 1: 7 mg pot⁻¹ and total dose 2: 14 mg pot⁻¹. The doses were applied partially and dissolved in the irrigation water. The treatments were the following, T0: mine tailings + dose 1; T1: mine tailings + dose 2; T2: mine tailings + plant; T3: mine tailings + plant + dose 1. At the end of the assay, the concentrations of metals (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn) in the plants and the biomass of shoot and root were determined. In the mine tailings, were not observed particularly high total concentrations of metals, except Cu, which was also the most available. These mine tailings lack fertility relative to low levels of available N, P, K and organic matter. The pH was slightly acid and the electrical conductivity indicates that the mine tailings are non-saline. The Cd, Cr, Ni and Pb metals were found under the detection limits of the measuring instrument and therefore were not evaluated.

The addition of fulvic acids did not show any effect on the uptake of Cu and Zn in plant at 60 and 120 days of the assay. Only in root, the fulvic acids, with dose 1, increased the levels of Fe and Mn. Regarding the biomass generation, the addition of fulvic acids did not contribute to a greater growth. It was observed a transport rate of metals to the aerial part less than 1 for Cu and Fe at 60 and 120 days of test, indicating that the plant showed a higher concentration in the roots, showing a phytostabilization capacity of these elements . In contrast, for Mn and Zn, the air transport index values were greater than 1, indicating a phytoextraction capacity of these elements. Regarding the bioconcentration factor, the results obtained were less than 1 for all the elements, except for Mn, which allows to declare *Carpobrotus aequilaterus* as a potentially accumulating plant of this element.

Key words: Doca, humic substances, phytoextraction, phytostabilization, metals.

INTRODUCCIÓN

Una de las principales actividades económicas de Chile es la minería del cobre. Esta actividad genera un importante volumen de residuos llamados relaves mineros, que se depositan en presas artificiales denominadas tranques de relaves. Los relaves consisten en un sólido finamente molido, que se descarta en operaciones mineras (Santibañez et al., 2008; SERNAGEOMIN, 2017). Aproximadamente el 80% del total de los residuos son provenientes del material de descarte de las mineras, las cuales contienen metales, como por ejemplo Cd, Cu, Mo, Ni, Pb, Zn y algunos metaloides como As, los cuales mediante un mal manejo o la gestión inadecuada del proceso, se pueden generar altos riesgos ambientales (Santibañez et al., 2012).

Los relaves están compuestos principalmente por roca molida (fina), que contiene diversos metales en su composición, y es posible mediante el viento, causar la dispersión y la liberación de estas partículas a los distintos ecosistemas que se encuentren cerca del lugar, pudiendo llegar a la cadena alimentaria, contaminando los alimentos de los animales y/o humanos. Sin embargo, también son capaces de sufrir transformaciones, que derivan de reacciones químicas secundarias, generando el drenaje de las partículas hacia distintos afluentes (Santibañez et al., 2008; Lee et al., 2014). Los relaves mineros son un sustrato inerte, por lo cual es necesario proporcionarle fertilidad para permitir el buen desarrollo de las plantas y mejorar las propiedades físicas (Calza et al., 2014; Santibañez et al., 2012). Las limitaciones físicas y químicas de los relaves mineros son alto contenido de sales, carencia de nutrientes para la cubierta vegetal, relativamente altos contenidos de metales, baja retención de agua y falta de estructura (Wong, 2003).

La capacidad de ciertas plantas para crecer en sustratos con alta concentración de metales, ha sido utilizada para establecer estrategias de fitorremediación. Las plantas pueden retener el contaminante en sus raíces, estrategia llamada fitoestabilización o los contaminantes pueden ser transportados preferentemente a la parte aérea, mediante el proceso de fitoextracción (Conesa et al., 2007). Dentro de la fitorremediación, existen algunos factores que permiten conocer la capacidad de las plantas para absorber y transportar los elementos traza metálicos, desde el suelo a los órganos aéreos de las plantas. Entre estos factores se encuentran *IT* y *FBC*, los cuales se clasifican como el índice de transporte a la parte aérea o *IT*, definido como el cociente entre la concentración del metal en parte aérea y la raíz; y el Factor de Bioconcentración o *FBC*, que se define como el cociente entre la concentración de metales en la parte aérea de la planta y el suelo. Como complemento a la fitorremediación, existen diversas enmiendas orgánicas de bajo peso molecular que se pueden aplicar al suelo, llamadas LMWOAs (low-molecular-weight organic acids), como el ácido cítrico y tartárico, los cuales son originados de exudados de las raíces, secreciones microbianas y descomposición de la materia orgánica. También existen enmiendas provenientes de la materia orgánica del suelo, como son los ácidos húmicos y fúlvicos, que interactúan con los metales traza, formando quelatos y controlando la distribución de éstos en el medio ambiente natural, impactando en la movilidad, biodisponibilidad y toxicidad, lo que la adición de sustancias húmicas se transforma en un complemento para la

fitorremediación (Pérez-Esteban et al., 2013; Najeeb et al., 2009; Xiong et al., 2015).

Los ácidos fúlvicos no han sido muy estudiados en procesos de fitorremediación inducida en comparación a otras enmiendas orgánicas. Éstos forman compuestos solubles con los metales y permanecen en solución en medios ácidos y básicos, también tienen un menor peso molecular, alta acidez, mejor actividad biológica y aplicación en la agricultura (Wang et al., 2015; Zhou et al., 2005). Además, al ser un agente quelante natural, tienen la capacidad de formar complejos con iones de metales, aumentando su movilidad en el suelo y su disponibilidad para la planta. De esta manera, se facilita la absorción de elementos traza y se aumenta la extracción del suelo, disminuyendo su concentración en relaves mineros (Hayes et al., 2008; Kabata-Pendias, 2011; Pastor et al., 2005; Sparks, 2003).

En la estrategia de fitorremediación de relaves mineros, la cubierta vegetal establecida debe tener ciertas características para que se pueda desarrollar, de las cuales, las raíces deben profundizar el suelo, y las plantas deben generar gran cantidad de biomasa (Santibañez et al., 2008). En algunos casos de fitoextracción, se utilizan plantas a las cuales se les denominan hiperacumuladoras. Estas cubiertas vegetales son definidas como especies que acumulan metales en concentraciones 10-100 veces mayor a lo normalmente presente en plantas. Además, el criterio de hiperacumulación de algunos metales es el siguiente: por lo menos 100 mg kg⁻¹ de Cd; 1000 mg kg⁻¹ para Cu, Cr o Pb y 10000 mg kg⁻¹ para Zn, Mn o Ni (Alcantara et al., 2015).

Una especie nativa de Chile, interesante para la estrategia de fitorremediación, es *Carpobrotus aequilaterus* (Haw.) N.E.Br, de nombre común doca, especie muy suculenta, usada principalmente como cobertura vegetal en zonas industriales o para contener la erosión del suelo por la pendiente. Esta especie se ha recomendado para suelos afectados por relaves mineros (Orchard et al., 2009). Esta planta es de crecimiento rápido, muy invasiva, de bajo requerimiento de agua y nutrientes, y no requiere de especial manejo.

Existen autores que han estudiado especies vegetales del género *Carpobrotus*, como *Carpobrotus rossii* y *Carpobrotus edulis*, las cuales han sido exitosas en la absorción de metales, además de una adecuada adaptación en sustratos contaminados (Chiban et al., 2011; Zhang et al., 2014). A pesar de estos estudios, no existen publicaciones científicas relacionadas con *Carpobrotus aequilaterus* cultivada en relaves mineros con la aplicación de ácidos fúlvicos.

Objetivo general

Evaluar la especie *Carpobrotus aequilaterus* como cubierta vegetal en relave minero y el efecto de la aplicación de ácidos fúlvicos como estrategia de fitorremediación.

Objetivos específicos

- Evaluar la concentración de metales Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn de *Carpobrotus aequilaterus* en parte aérea y raíz cultivadas en relaves mineros con aplicación de ácidos fúlvicos.
- Comparar el factor de bioacumulación de metales e índice de transporte de metales en las plantas con y sin aplicación de ácidos fúlvicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El ensayo se realizó en el invernadero de investigación de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicada en la comuna de La Pintana, provincia de Santiago, Región Metropolitana ($33^{\circ}40'$ latitud Sur y $70^{\circ}38'$ longitud Oeste). Los análisis de tejidos de las plantas y del relave minero se realizaron en el Laboratorio de Química de Suelos y Aguas ubicado en la misma Facultad de Ciencias Agronómicas.

Relave minero

Las muestras de relaves mineros fueron obtenidos del Tranque de Relave 'Ovejería' (331973 m E, 6342532 m S), de la empresa minera CODELCO División Andina ubicada a en el pueblo de Huechún, comuna de Til Til, Región Metropolitana (Figura 1).

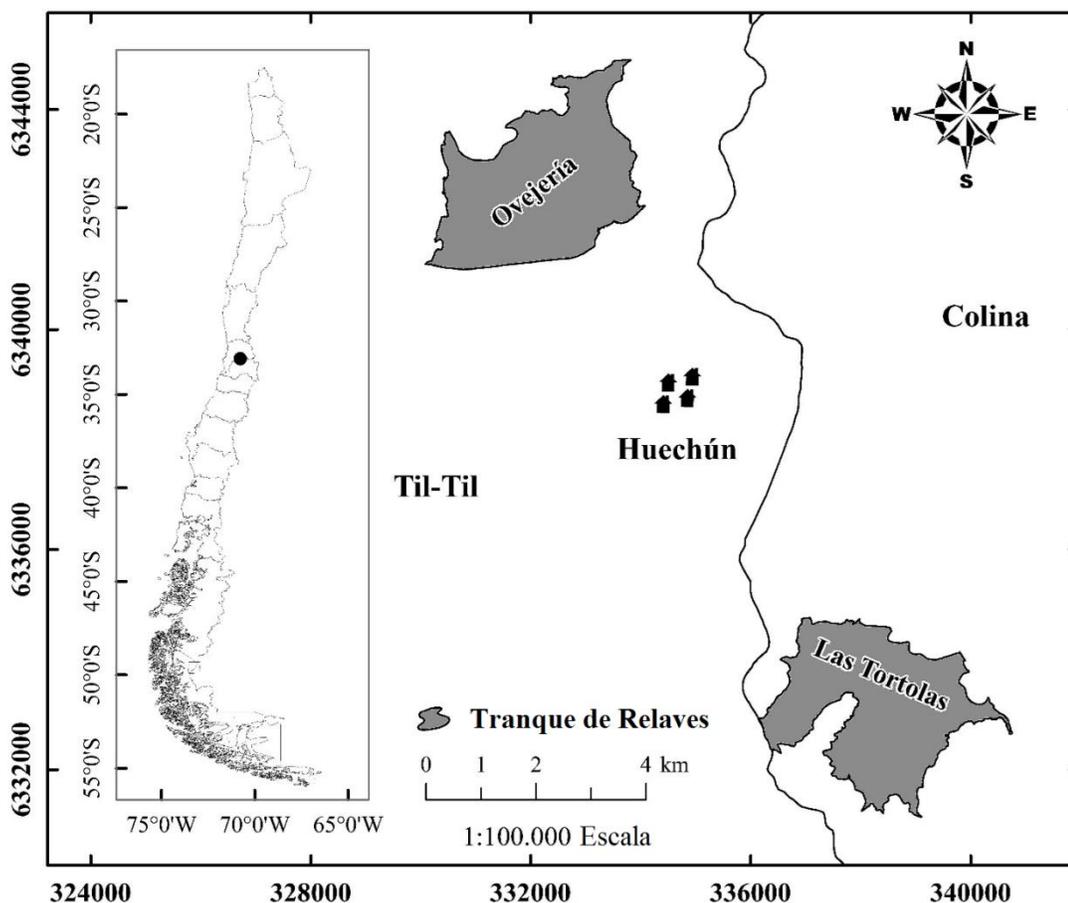


Figura 1. Ubicación del lugar de extracción del relave minero. Tranque de Relave 'Ovejería', Región Metropolitana, Chile.

Material vegetal

La especie vegetal que se utilizó fue *Carpobrotus aequilaterus* (Haw.) N.E.Br., de nombre común doca. Las plantas se adquirieron en el vivero Jardín de San Francisco ubicado en la comuna de Buin, Región Metropolitana, y fueron trasplantadas en relaves mineros utilizando macetas de plástico de 17 cm de diámetro y 11 cm de alto (volumen aproximado de 2,5 litros), con un promedio de raíces estimado entre 4 a 6 cm.

Ensayo en macetas y tratamientos

El ensayo se realizó con 22 plantas, de las cuales 4 ejemplares se usaron para la caracterización inicial (Cuadro 1) y 18 ejemplares fueron sometidas a los distintos tratamientos (6 plantas por tratamiento). Se realizaron dos ensayos destructivos, a los 60 y 120 días. Se utilizaron 3 plantas de cada tratamiento para cada ensayo destructivo y se determinó la concentración de Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn en los tejidos de las plantas. Los ensayos destructivos fueron realizados seleccionando macetas de manera aleatoria por tratamiento.

Cuadro 1. Caracterización inicial de *Carpobrotus aequilaterus*.

	Unidades	Parte aérea (hoja + tallo)	Raíz
Materia Seca	(g)	2,10 ± 0,70	0,30 ± 0,04
Cd	(mg kg ⁻¹)	nd	nd
Cr	(mg kg ⁻¹)	nd	nd
Cu	(mg kg ⁻¹)	7,60 ± 0,60	10,2 ± 2,20
Fe	(mg kg ⁻¹)	84,2 ± 30,6	840 ± 185
Mn	(mg kg ⁻¹)	280 ± 80,0	211 ± 130
Ni	(mg kg ⁻¹)	8,40 ± 3,10	nd
Pb	(mg kg ⁻¹)	nd	1054 ± 420
Zn	(mg kg ⁻¹)	7,50 ± 3,10	20,8 ± 11,5

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=4). nd: no detectado.

En el Cuadro 2, se describen los tratamientos que constituyeron este estudio. Para los tratamientos T0 y T1, se realizaron tres repeticiones con la finalidad de comparar algunas propiedades químicas del relave minero al adicionar dos dosis diferentes de ácido fúlvico, al igual que para los tratamientos T2, T3 y T4, se realizaron tres repeticiones para cada ensayo destructivo (60 y 120 días).

Los tratamientos fueron aplicados durante el mes de enero hasta mayo del 2015.

El ensayo se realizó en el sector de invernaderos de la Facultad de Ciencias Agronómicas en condiciones de exterior y protegido de la lluvia. La temperatura media fue de 19,5°C y la humedad relativa de 58,1% durante los 120 días de ensayo (Estación meteorológica INIA, La Platina).

Cuadro 2. Tratamientos de relaves mineros.

Tratamientos	Repeticiones	Descripción de tratamientos
T0	3	Relave minero + riego con aplicación de ácido fúlvico dosis 1 (0,7 mg L ⁻¹).
T1	3	Relave minero + riego con aplicación de ácido fúlvico dosis 2 (1,4 mg L ⁻¹).
T2	6	Relave minero + Doca + riego con agua de invernadero.
T3	6	Relave minero + Doca + riego con aplicación de ácido fúlvico dosis 1 (0,7 mg L ⁻¹).
T4	6	Relave minero + Doca + riego con aplicación de ácido fúlvico dosis 2 (1,4 mg L ⁻¹).

Como fuente de ácido fúlvico se utilizó el producto comercial Fultival Plus[®] WSP. El ácido fúlvico es un polvo fino (ácido fúlvico soluble de alta concentración), de origen alemán, proveniente de la empresa Humintech y comercializado en Chile por AMecological. El fabricante declara que el uso de este producto genera un aumento en la capacidad de intercambio catiónico, además de estimular y aumentar la actividad microbiana en el suelo, como también estimular el crecimiento de la planta y mitigar las deficiencias nutricionales de acuerdo a las características del producto, el cual aporta micronutrientes al suelo como Cu, Fe, Mg, Mn y Zn (Anexo 1).

La dosis recomendada por el fabricante está presente en la ficha técnica del producto, la cual es de 5 kg ha⁻¹ (dosis comercial), que se debe parcializar durante toda la temporada. En base a esta dosis, se calculó por maceta la dosis total 1, de 7 mg maceta⁻¹ de ácidos fúlvicos y la dosis total 2, de 14 mg maceta⁻¹. La dosis de aplicación de ácido fúlvico se estimó mediante la parcialización del riego durante toda la temporada en 120 días. Se calculó la dosis total de ácido fúlvico y posteriormente se dividió por cada riego existente en los 120 días de ensayo (Anexo 2). De esta manera la primera dosis es de 0,7 mg L⁻¹ y la segunda dosis de 1,4 mg L⁻¹. El ácido fúlvico se aplicó disuelto en el agua de riego durante 120 días. Para la preparación de las dosis de la solución, se pesó el ácido fúlvico, y posteriormente se adicionó agua proveniente del invernadero, mezclando hasta diluir completamente el producto en el agua.

La frecuencia de riego de las macetas fue de 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes) con agua del invernadero, de acuerdo al contenido volumétrico del relave entre capacidad de campo y punto de marchitez permanente (humedad aprovechable), lo cual es aproximadamente de 250 mL. Sin embargo, se optó por regar con 200 mL de agua, ya que el riego en exceso puede causar el lavado del ácido fúlvico, disminuyendo su efectividad en el relave minero.

Caracterización física y química del relave minero

Se realizó una caracterización inicial del relave minero. Los análisis químicos se realizaron mediante la metodología que propone Sadzawka et al., (2006) para suelos. Se midió pH en agua, en una relación 1:2,5 mediante el método potenciométrico, con un medidor de pH o pHmetro (HANNA Instruments, HI3221); la conductividad eléctrica (CE) se midió en el extracto de saturación mediante el uso de un conductivímetro (Oakton, CON 510). El N disponible se determinó mediante extracción con KCl y posterior destilación; el P disponible, se determinó mediante el método de Olsen, por determinación colorimétrica con $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$; el K disponible se obtuvo a partir de una extracción con $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1M a pH 7. La capacidad de intercambio catiónico se evaluó por el método de Chapman (1965), mediante el uso de acetato de sodio (CH_3COONa) y acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) con posterior determinación de Na mediante EAA (Espectrofotometría de absorción atómica, Perkin Elmer 310). El carbono y la materia orgánica se determinaron por oxidación con ácido sulfúrico y dicromato de sodio, mediante curva de sacarosa.

Para la evaluación de los cationes extraíbles (Ca, K, Mg, Na), se pesaron 5 g de muestra secada al aire, de < 2 mm, en un frasco plástico de 150 mL. Se incluyeron dos blancos y una muestra de referencia (suelo de la Facultad de Ciencias Agronómicas). Se agregaron 50 mL de solución de acetato de amonio. Posteriormente se agitaron durante 30 minutos en un agitador a 180 golpes min^{-1} con una temperatura de 25°C. Las muestras se filtraron, y a continuación, se mezcló 1 mL del filtrado con 9 mL de solución de La, con una concentración de 1,1 g L^{-1} (relación 1:10). Finalmente en un EAA y calibrado con la serie de estándares de Ca, Mg, K y Na, se leyeron las concentraciones de los cationes.

Para la evaluación de azufre extraíble (disponible) en los relaves mineros, se estimó la concentración de sulfato en el extracto de saturación (concentración estimada de SO_4^{-2} ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) = CE ($\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$) * 10 – CO_3 – HCO_3 – Cl). Se calculó la alícuota de extracto de saturación, y se transfirió con 5 mL de la serie de estándares (0-1-2-3-4-5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfato) a matraces aforados de 50 mL. Se diluyó con agua hasta un volumen de 25 mL. Posteriormente, se agregó 1,2 mL de solución de amoníaco 2,5 mol L^{-1} y se mezcló. A continuación, se agregó 5 mL de solución de BaCrO_4 (dilución de 65 mL de HCl 37% en 750 mL de agua, se agregó 6,35 g de cromato de bario (BaCrO_4) y enrasó a 1 L). Posteriormente se agregó 1,0 mL de solución de amoníaco 2,5 mol L^{-1} , se mezcló y enrasó con agua. Se filtró con el papel filtro y se midió la absorbancia a 372 nm.

La extracción de micronutrientes con DTPA, se realizó de la siguiente manera: se pesaron 10 g de suelo en un frasco agitable, incluyendo dos blancos. Se agregaron 20 mL de solución de DTPA- CaCl_2 -TEA tamponada a pH 7,3, se tapó el frasco y agitó durante exactamente dos horas. Se filtró a través de un disco filtro equivalente a Whatman N°42. Posteriormente en el filtrado se midieron las concentraciones de Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn por EAA con los estándares apropiados.

Con respecto a la concentración de elementos traza metálicos (ETM) Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn, se determinaron mediante digestión ácida (Dold y Fontboté, 2001). Se pesó 1 g de relave minero, incluyendo dos blancos y una muestra de referencia (suelo de la Facultad de Ciencias Agronómicas), las cuales se colocaron en vasos de teflón con tapa. Bajo campana, se agregaron 10 mL de ácido fluorhídrico concentrado, dejándolo toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se calentaron los vasos semi tapados en la placa calefactora hasta sequedad de las muestras (315°C, durante 1 hora). Se adicionó 10 mL de ácido nítrico y 5 mL de ácido perclórico concentrados, y se calentó lentamente hasta sequedad (200°C durante 1 hora, 250°C por 1 hora y 300 °C por una hora). Finalmente, se le agregó 10 mL de agua destilada al residuo y se trasvasijó a un matraz de aforo de 25 mL, donde se enrasó a 25 mL con agua destilada, y se determinaron los ETM mediante EAA.

Con respecto a los análisis físicos del relave minero, realizados al inicio del ensayo, la textura se determinó mediante el método del hidrómetro de Bouyoucos (Sandoval et al., 2012).

Al finalizar el ensayo, a los 120 días, se realizó nuevamente la caracterización del relave minero para los tratamientos T0 y T1, para la determinación de pH, CE y concentración de elementos traza metálicos (Cu, Fe, Mn, Zn) mediante EAA.

Análisis de agua de riego

En el Cuadro 3 se presenta el análisis del agua de invernadero. Para este análisis se usó la metodología para agua de riego que propone Sadzawka (2006).

En el caso del agua de riego utilizada en el ensayo, se observa una salinidad leve a moderada o que puede tener efectos perjudiciales en cultivos sensibles (NCh 1333). Además, según el grado de dureza y las concentraciones de Ca y Mg, el agua es clasificada como dura (Cadahía et al., 2005) y presenta un pH óptimo.

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

Parámetro	Unidad	Agua de Riego
pH	-	7,5
CE	(dS m ⁻¹)	1,39
Ca ⁺²	(mg L ⁻¹)	161
K ⁺	(mg L ⁻¹)	21,5
Mg ⁺²	(mg L ⁻¹)	1,64
Na ⁺	(mg L ⁻¹)	89,5
Cl ⁻	(mg L ⁻¹)	116
HCO ₃ ⁻	(mg L ⁻¹)	40,3
SO ₄ ⁼	(mg L ⁻¹)	235
Dureza ¹	(grados hidrométricos franceses)	41,01

Fuente: Tesis de Magíster Edouard Acuña (2016).

¹Dureza = $\text{mg L}^{-1} \text{Ca} * 2,5 + \text{mg L}^{-1} \text{Mg} * 4,12$ (Cadahía et al., 2005).

Propiedades químicas de los ácidos fúlvicos

En el Cuadro 4, se muestran los resultados de pH y conductividad eléctrica en las soluciones de riego que contienen los ácidos fúlvicos, las que fueron preparadas con el agua de riego descrita en el Cuadro 3.

Cuadro 4. pH y conductividad eléctrica de la solución de ácidos fúlvicos.

Muestra	pH	CE (dS m ⁻¹)
AF (0,7 mg L ⁻¹)	6,5 ± 0,11	1,31 ± 0,01
AF (1,4 mg L ⁻¹)	6,7 ± 0,04	1,33 ± 0,03

Valores corresponden a promedios ± desviación estándar (n=3). AF: ácido fúlvico. CE: conductividad eléctrica (dS m⁻¹).

Evaluación del material vegetal

Se efectuó una evaluación inicial de la materia seca (MS) de las plantas al inicio del ensayo (Cuadro 1). El ensayo fue establecido durante enero de 2015 a mayo del mismo año. Al cabo de 60 y 120 días, luego de haber aplicado los tratamientos, las plantas fueron cosechadas. Cada planta, fue extraída y analizada en forma individual. Primero, se lavaron las plantas completas con agua potable para quitar restos de relave minero. Inmediatamente, se procedió a lavar con agua destilada, procurando sacar la máxima cantidad de relave minero que pudo quedar adherido a las raíces. Las plantas, posteriormente se dividieron en parte aérea y raíces para finalmente, secar las muestras en bolsas de papel en estufa a 65°C durante una semana. Se realizó la determinación de MS de las muestras individuales, mediante evaluaciones destructivas para todos los tratamientos.

En forma mensual se determinó la altura de las plantas. Para ello se consideró la altura desde la primera hoja hasta la punta de la última.

Para medir la concentración de metales en parte aérea y raíces se realizó una digestión ácida. Para ello, las muestras se molieron, pasando por un tamiz de 0,5 mm y se pesaron 0,5 g, para un proceso de digestión con 10 mL de agua destilada, 3 mL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado y 2 mL de agua oxigenada (H₂O₂) (Moreno-Jiménez et al., 2010). Los frascos se agitaron en forma manual suavemente. Posteriormente los frascos se dejaron en reacción toda la noche bajo campana de extracción de gases.

A continuación, las muestras se digirieron en autoclave a 125°C y 1,5 kg cm⁻² durante 35 minutos.

Una vez frías las muestras, se filtraron y se enrasó a 25 mL con agua destilada, donde a continuación se midieron los ETM mediante EAA.

Con los valores obtenidos de la concentración de metales, se procedió al cálculo de los siguientes índices de fitorremediación (IF) para los elementos traza:

- Factor de bioacumulación (*FBC*).

- Índice de transporte del metal a la parte aérea (*IT*).

Para el cálculo de los índices de fitorremediación, se utilizaron las siguientes formulas:

Cálculo del factor de bioacumulación (McGrath y Zhao, 2003; Ahmadpour et al., 2012):

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

Cálculo del índice de transporte a la parte aérea (Hsiao et al., 2007; Ma et al., 2016):

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

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño en bloques completamente aleatorizado (DBCA) para los resultados obtenidos a los 60 y 120 días (concentración de elementos traza metálicos y materia seca), donde el factor de bloqueo es la altura de las plantas. Se realizó un análisis de varianza mediante modelos generales lineales del software estadístico INFOSTAT (versión 2008). Se determinó la existencia de interacción entre los factores “Tratamiento” y “Tiempo”, cuando se observaron diferencias significativas entre tratamientos, los datos se sometieron a una prueba de comparación múltiple de medias (PCM) mediante el test LSD de Fisher, considerando un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. Cuando no existió interacción entre los factores evaluados, se procedió a analizar cada uno de forma separada. El resto de los parámetros fueron analizados mediante un análisis de varianza a través de modelos generales lineales, determinando el efecto de los tratamientos a los 120 días de evaluación. En lo que respecta a la altura de las plantas, se realizó un ajuste (polinómico cuadrático), $p \leq 0,05$, para la representación de las curvas de crecimiento durante todo el periodo estudiado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización inicial del relave minero

Las principales características químicas y físicas del relave minero en estudio, previo a la realización del experimento, se presentan en el Cuadro 5.

De acuerdo al muestreo del relave minero, el pH se clasifica como moderadamente ácido. Los valores medidos de conductividad eléctrica clasifican al relave minero como ligeramente salino (CIREN, 1996; Jones, 2003). El relave minero presenta muy bajo contenido de materia orgánica, de N disponible, P Olsen y K disponible (Riquelme et al., 2004). El P tiene una concentración más baja que el rango encontrado en los relaves mineros (Hossner y Shahandeh, 2005), mientras que el K disponible se encuentra dentro de los rango presentes en relaves. De acuerdo a la clasificación textural del suelo de la FAO, basado en la clasificación de USDA según el tamaño de las partículas, la textura del relave minero, es franco gruesa.

Cuadro 5. Principales propiedades químicas y físicas del relave minero del Tranque Ovejería.

	Unidades	Relave Ovejería	Rango encontrados en relaves mineros
pH	-	6,3 ± 0,1	1,8-9,4
Conductividad eléctrica	(dS m ⁻¹)	3,8 ± 0,1	0,1-22,4
Materia orgánica	(%)	0,31 ± 0,05	0,02-25
Nitrógeno disponible	(mg kg ⁻¹)	6,6 ± 1,8	-
Fósforo Olsen	(mg kg ⁻¹)	0,4 ± 0,01	1-400
Potasio disponible	(mg kg ⁻¹)	9,3 ± 0,41	1-564
Azufre soluble	(mg L ⁻¹)	1243 ± 27,8	-
As total	(mg kg ⁻¹)	19,7 ± 0,01	-
Cd total	(mg kg ⁻¹)	7,5 ± 0,01	2-280
Cr total	(mg kg ⁻¹)	18,7 ± 3,4	-
Cu total	(mg kg ⁻¹)	1999 ± 223	1-750
Fe total	(mg kg ⁻¹)	46250 ± 0,25	0,4-57
Mn total	(mg kg ⁻¹)	716,3 ± 70,3	0,01-4,0
Ni total	(mg kg ⁻¹)	110,6 ± 16,8	10-546
Pb total	(mg kg ⁻¹)	17,5 ± 2,5	0,3-2810
Zn total	(mg kg ⁻¹)	141,3 ± 7,8	1-5000
Arena	(%)	85	1-97
Limo	(%)	13	0-96
Arcilla	(%)	2,0	0-40

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

Con respecto a los análisis de metales en suelos, diversos autores como Bohn et al. (2001), Bowen (1979) y Sparks (2003) han establecido rangos óptimos o normales para suelos. Los ETM evaluados en el relave, como el As, Cr, Fe, Ni, Pb y Zn se encuentran entre los niveles que se consideran como suelos no contaminados. Según Hossner y Shahandeh (2009) estos elementos están dentro de los niveles de ETM encontrados en relaves mineros.

En el caso del Cd, el nivel observado en el relave es más elevado en comparación con los rangos de suelos no contaminados que van de 0-7 mg kg⁻¹ (Bohn et al., 2001; Bowen, 1979 y Acevedo et al., 2005). Ocurre la misma situación en Cu, el cual posee un nivel de 1999 mg kg⁻¹ en el relave minero, superando notoriamente los máximos niveles referenciados por Jones (2003) y Sparks (2003).

Respecto al Mn, Jones (2003) y Sparks (2003) establecen concentraciones máximas de este elemento con un valor de 7000 mg kg⁻¹, lo que indica que los niveles de Mn en el relave del estudio se encuentran dentro de los rangos de suelos que no son considerados contaminantes. Asimismo, de acuerdo a Acevedo et al. (2005) los niveles de Mn encontrados en Chile presentan un valor de 1000 mg kg⁻¹, al igual que los valores encontrados a nivel mundial (Sparks, 2003), por consiguiente los niveles presentes en el relave minero se encuentran en los rangos de suelos no contaminados.

Según la disponibilidad de elementos en el relave minero, presentes en el Cuadro 6, el Cu es el elemento más disponible en el relave, seguido por Fe, Zn, Mn, Pb y finalmente Cd, Cr y Ni. Mileusnić et al. (2014) menciona que del 1 al 10% de metales presentes en las fracciones intercambiables y en la fracción ligada a carbonatos, respecto a la concentración total, indica un bajo riesgo de contaminación por metales. En el relave minero, el Cd, Cr, Cu, Pb y Zn, se encuentran entre el 1 y 10%, presentando un bajo riesgo de contaminación. También Fe, Mn y Ni, no presentan riesgos de contaminación de acuerdo a su disponibilidad en el relave.

Cuadro 6. Concentración de metales (mg kg⁻¹) por extracción por DTPA en relaves mineros.

Extracción-DTPA de metales en Relave Ovejería	
mg kg ⁻¹	
As	-
Cd	0,20 ± 0,01
Cr	0,20 ± 0,01
Cu	20,8 ± 2,5
Fe	9,20 ± 0,63
Mn	1,55 ± 0,10
Ni	0,20 ± 0,10
Pb	1,40 ± 0,16
Zn	2,35 ± 0,45

Valores corresponden a promedios ± desviación estándar (n=3).

Concentración de metales en plantas

Al comparar las concentraciones de Cu, Fe, Mn y Zn en parte aérea de *Carpobrotus aequilaterus*, a los 60 y 120 días de tratamientos (Anexo 3), se observó sólo para T3, un aumento de las concentraciones de éstos en el tiempo, es decir, la menor dosis de ácido fúlvico muestra un mayor efecto quelante. Respecto a T2 y T4, sólo el Mn mostró un aumento de su concentración en parte aérea y raíz durante todo el periodo de evaluación (figura 2 y 3).

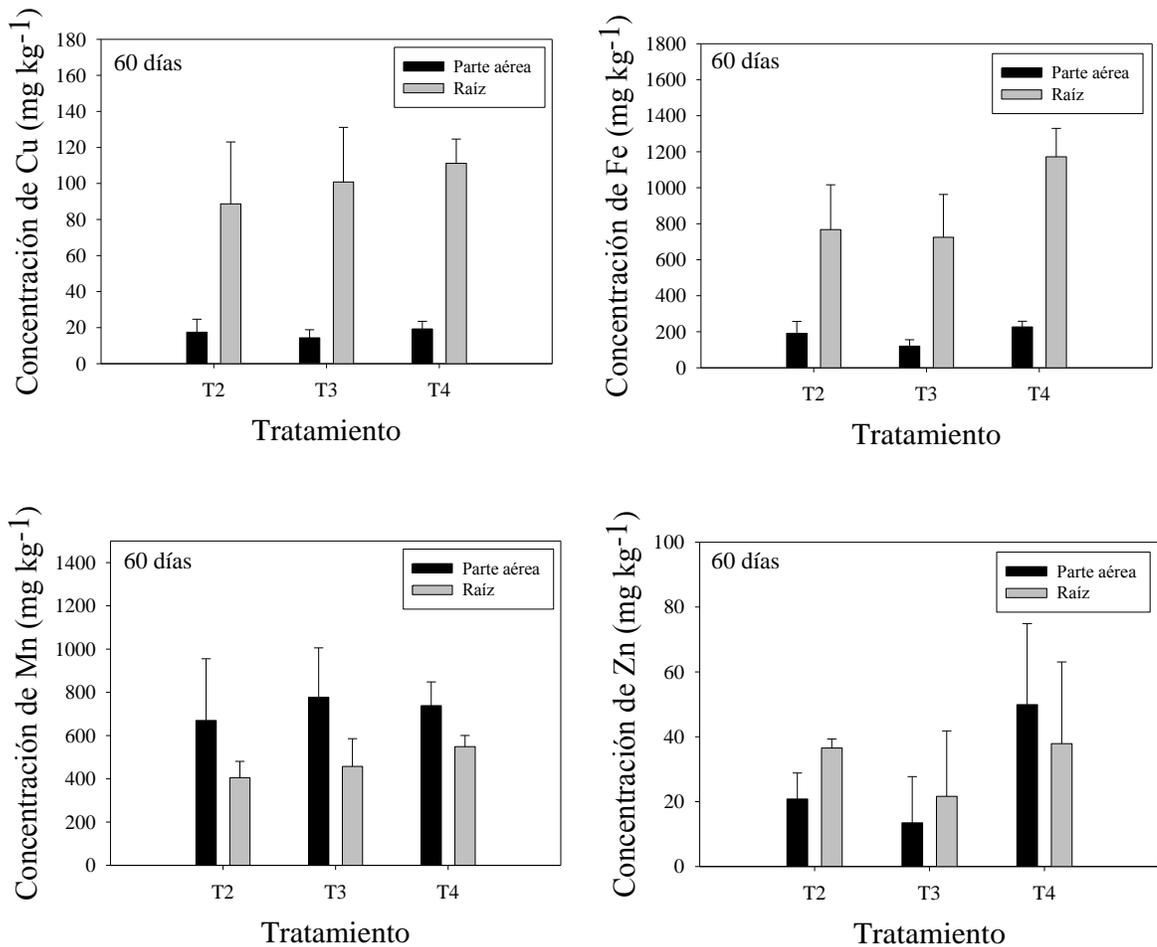


Figura 2. Concentración de Cu, Fe, Mn y Zn (mg kg⁻¹), en tejidos de *Carpobrotus aequilaterus* a los 60 días del ensayo. Barras sobre columnas indican desviación estándar (n=3).

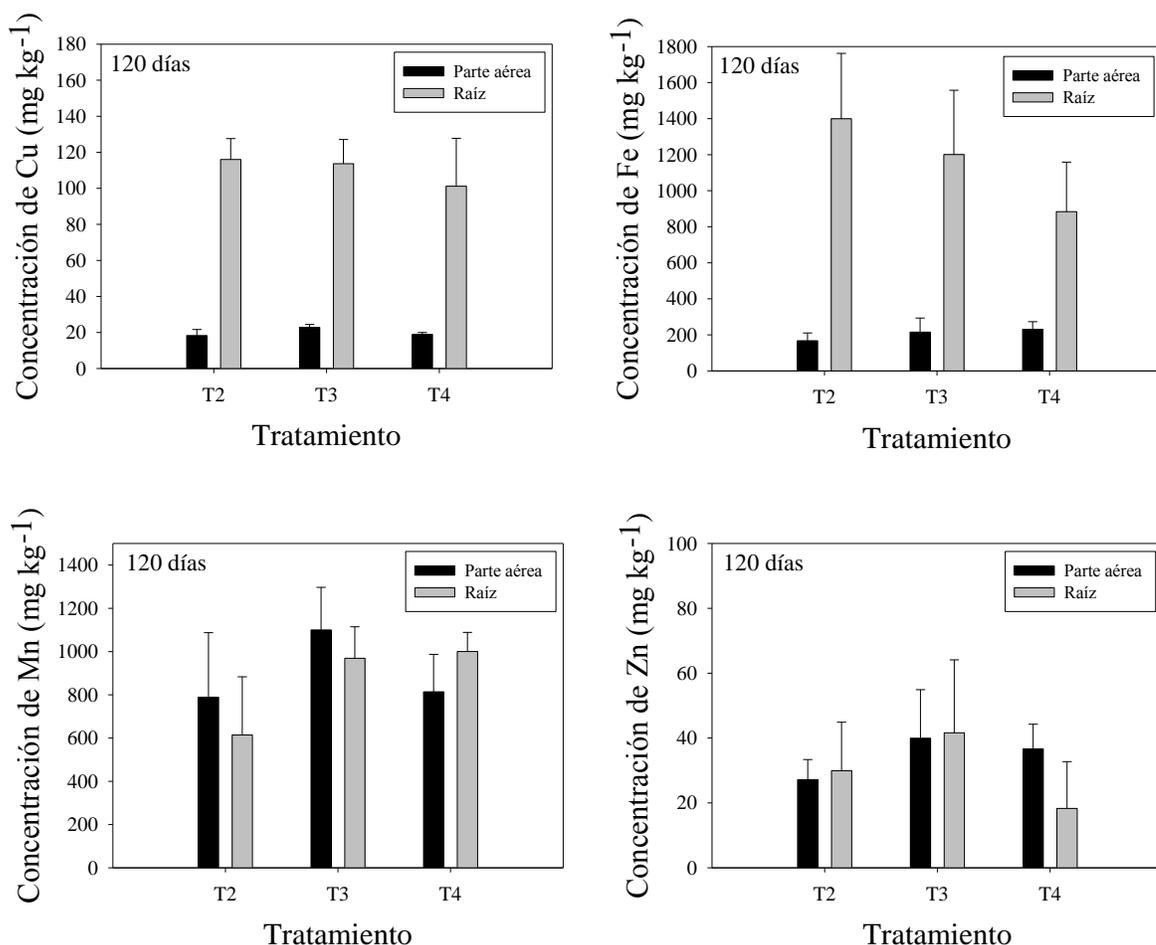


Figura 3. Concentración de Cu, Fe, Mn y Zn (mg kg⁻¹), en tejidos de *Carpobrotus aequilaterus* a los 120 días del ensayo. Barras sobre columnas indican desviación estándar (n=3).

Se analizó estadísticamente para los metales (Cu, Fe, Mn, Zn) la interacción entre los factores 'Tratamiento' y 'Tiempo'. En la concentración de Cu, Mn y Zn en parte aérea y raíz, no se observó interacción entre los factores 'Tratamiento' y 'Tiempo', por lo que ambos factores fueron analizados de forma separada (cuadro 7 a cuadro 15). Para los metales Cd, Cr, Ni y Pb las concentraciones fueron muy bajas o menores al límite de detección del instrumento de medición (Anexo 3), razón por la cual no se realizaron los análisis estadísticos.

Cobre

La absorción de Cu en la parte aérea y en la raíz no aumentó con la adición de ácido fúlvico. No se observaron diferencias significativas en los distintos factores ('Tratamiento' y 'Tiempo') ($p \leq 0,05$).

Sin embargo, a pesar de no existir diferencias significativas en Cu, en el factor ‘Tratamiento’ (Cuadro 7), T4 mostró una mayor concentración de Cu en parte aérea, seguido por T3 y T2. Mientras que en raíz, el tratamiento que mostró una mayor concentración fue el T3 (107 mg kg^{-1}), seguido de T4 (106 mg kg^{-1}) y T2 (102 mg kg^{-1}).

Cuadro 7. Concentración de cobre (mg kg^{-1}) en tejidos de *Carpobrotus aequilaterus*, según tratamiento, después de 120 días de ensayo.

Tratamiento	Parte aérea	Raíz
	Cu (mg kg^{-1})	
T2	$17,9 \pm 5,0 \text{ a}$	$102 \pm 15,0 \text{ a}$
T3	$18,6 \pm 5,5 \text{ a}$	$107 \pm 19,4 \text{ a}$
T4	$19,2 \pm 2,7 \text{ a}$	$106 \pm 30,6 \text{ a}$
Valor P*	0,8753	0,2916

Valores corresponden a promedio \pm desviación estándar (n=6). *Valor P corresponde al factor ‘Tratamiento’. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Cuadro 8. Concentración de cobre (mg kg^{-1}) en tejidos de *Carpobrotus aequilaterus*, según tiempo.

Tiempo (días)	Parte aérea	Raíz
	Cu (mg kg^{-1})	
60	$17,0 \pm 5,2 \text{ a}$	$100 \pm 26,4 \text{ a}$
120	$20,0 \pm 2,8 \text{ a}$	$110 \pm 17,3 \text{ a}$
Valor P*	0,1555	0,3592

Valores corresponden a promedio \pm desviación estándar (n=9). *Valor P corresponde al factor ‘Tiempo’. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

En el factor ‘Tiempo’, a pesar de no existir diferencias significativas, en la parte aérea se obtuvo mayor concentración de Cu a los 120 días, presentando la misma situación en raíz (Cuadro 8).

Según Kabata-Pendias (2011), los valores normales de Cu en hojas se encuentran entre $5 - 30 \text{ mg kg}^{-1}$, por lo cual los distintos tratamientos del ensayo se encuentran en los rangos suficientes de este elemento, sin presentar deficiencias ni toxicidad.

Hierro

La concentración de Fe en parte aérea y raíz se muestra en el Cuadro 9. Al analizar estadísticamente el efecto de los factores ‘Tratamiento’ y ‘Tiempo’, se mostró interacción entre estos dos factores en raíces. Las concentraciones de Fe más elevadas se encontraron en T2 y T3 a los 120 días, y en T4 a los 60 días. Los tratamientos T2 y T3 a los 60 días,

presentaron la menor concentración de Fe, incluyendo a T4 a los 120 días. Debido a las altas concentraciones de este elemento en raíces y en el relave, una proporción de este elemento queda absorbido dentro de la raíz y otro porcentaje queda adsorbido en la raíz.

Cuadro 9. Concentración de hierro (mg kg^{-1}) en tejidos de *Carpobrotus aequilaterus*, según tratamiento y tiempo.

Tratamiento	Tiempo (días)	Parte aérea	Raíces
		Fe (mg kg^{-1})	
T2	60	191 ± 66,0 a	767 ± 245 b
	120	167 ± 42,8 a	1399 ± 248 a
T3	60	120 ± 35,7 a	724 ± 181 b
	120	215 ± 78,1 a	1200 ± 328 ab
T4	60	226 ± 31,2 a	1171 ± 755 ab
	120	231 ± 41,8 a	883 ± 181 b
Valor P*		0,083	0,0339

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=3). *Valor P corresponde interacción entre factor ‘Tratamiento’ y ‘Tiempo’. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

En parte aérea, no se observó interacción entre los factores ‘Tratamiento’ y ‘Tiempo’, por lo que ambos factores fueron evaluados de forma separada.

Según los factores evaluados, no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 10), a los 60 y 120 días del ensayo (Cuadro 11). Sin embargo, se puede apreciar que la concentración de Fe en la parte aérea, presentó un mayor valor en T4 y a los 120 días de iniciado el ensayo, con 229 mg kg^{-1} y 204 mg kg^{-1} , respectivamente.

Cuadro 10. Concentración de hierro (mg kg^{-1}) en parte aérea de *Carpobrotus aequilaterus*, según tratamiento, después de 120 días de ensayo.

Tratamiento	Parte aérea
	Fe (mg kg^{-1})
T2	179 ± 51,4 a
T3	167 ± 75,2 a
T4	229 ± 33,0 a
Valor P*	0,2362

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=6). *Valor P corresponde al factor ‘Tratamiento’. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Cuadro 11. Concentración de hierro (mg kg^{-1}) en parte aérea de *Carpobrotus aequilaterus*, según tiempo.

Tiempo (días)	Parte aérea Fe (mg kg^{-1})
60	$179 \pm 62,2$ a
120	$204 \pm 56,9$ a
Valor P*	0,0689

Valores corresponden a promedio \pm desviación estándar ($n=9$). *Valor P corresponde al factor 'Tiempo'. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Respecto a los rangos óptimos de Fe en hojas, estos varían de 50 a más de 250 mg kg^{-1} (Navarro, 2003), por lo que en este caso las plantas se encuentran en los valores normales.

Manganeso

En el Cuadro 12 y Cuadro 13 se muestra la concentración de Mn según el factor 'Tratamiento' y el factor 'Tiempo', respectivamente. Para los distintos tratamientos no se presentaron diferencias significativas en la concentración de este elemento en parte aérea. En raíces se presentan diferencias estadísticamente significativas en los dos factores ('Tratamiento' y 'Tiempo'), siendo los tratamientos con adición de ácido fúlvico (T3 y T4) los que mostraron una mayor concentración durante todo el ensayo.

Cuadro 12. Concentración de manganeso (mg kg^{-1}) en tejidos de *Carpobrotus aequilaterus*, según tratamiento, después de 120 días de ensayo.

Tratamiento	Parte aérea	Raíz
	Mn (mg kg^{-1})	
T2	729 ± 269 a	509 ± 303 b
T3	938 ± 260 a	713 ± 315 a
T4	776 ± 136 a	774 ± 237 a
Valor P*	0,2836	0,0247

Valores corresponden a promedio \pm desviación estándar ($n=6$). *Valor P corresponde al factor 'Tratamiento'. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Sin embargo, aunque estadísticamente no hay diferencias en la parte aérea de *C. aequilaterus*, los tratamientos que obtuvieron mayor concentración de este elemento fueron los mismos que en raíz, con un valor de parte aérea en T3 de 938 mg kg^{-1} y de 776 mg kg^{-1} en T4. Según lo presentado anteriormente, los valores en parte aérea de *C. aequilaterus* son excesivos o tóxicos para la planta en todos los tratamientos a lo largo del ensayo (Kabata-Pendias, 2011), presentando mayores concentraciones en comparación a los otros metales evaluados en el proyecto (concentración de Mn óptimo en la planta varía de 30-300 mg kg^{-1}

y los niveles tóxicos o excesivos varían de 400-1000 mg kg⁻¹).

Cuadro 13. Concentración de manganeso (mg kg⁻¹) en tejidos de *Carpobrotus aequilaterus*, según tiempo.

Tiempo (días)	Parte aérea	Raíz
	Mn (mg kg ⁻¹)	
60	728 ± 196 a	470 ± 180 b
120	901 ± 248 a	861 ± 235 a
Valor P*	0,1349	0,0002

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=9). *Valor p corresponde al factor 'tiempo'. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Los resultados obtenidos en el factor 'Tiempo' se muestran en el Cuadro 13. Se presentaron diferencias significativas en raíces, donde a los 120 días se observa una mayor concentración de Mn (861 mg kg⁻¹) en comparación a los 60 días de transcurrido el ensayo (470 mg kg⁻¹). En la parte aérea de la planta, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, aunque hay que tomar en cuenta, que al igual que en raíces, a los 120 días se observa una mayor concentración de Mn en la planta, presentando valores de toxicidad (Kabata-Pendias, 2011).

Zinc

El Zn no presentó interacción entre los factores 'Tratamiento' y 'Tiempo', como tampoco para su análisis en forma separada. A pesar de esto, para la evaluación del factor 'Tratamiento', existe una mayor concentración de este metal en la parte aérea de *C. aequilaterus* principalmente para T4. En cambio, para raíz el tratamiento que obtuvo mayor concentración de Zn fue el T2, seguido por T3 y T4 (Cuadro 14). Para el caso del factor 'Tiempo', a los 60 días se ve una mayor concentración de este elemento en las raíces (Cuadro 15).

Cuadro 14. Concentración de zinc (mg kg⁻¹) en tejidos de *Carpobrotus aequilaterus*, según tratamiento, después de 120 días de ensayo.

Tratamiento	Parte aérea	Raíz
	Zn (mg kg ⁻¹)	
T2	23,9 ± 7,3 a	33,2 ± 16,6 a
T3	26,7 ± 19,5 a	31,6 ± 15,2 a
T4	43,3 ± 18,1 a	27,5 ± 21,3 a
Valor P*	0,0749	0,8835

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=6). *Valor P corresponde al factor 'Tratamiento'. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Cuadro 15. Concentración de zinc (mg kg^{-1}) en tejidos de *Carpobrotus aequilaterus*, según tiempo.

Tiempo (días)	Parte aérea	Raíz
	Zn (mg kg^{-1})	
60	28,07 \pm 22,4 a	32,02 \pm 14,2 a
120	34,57 \pm 10,7 a	29,96 \pm 21,3 a
Valor P*	0,3115	0,8152

Valores corresponden a promedio \pm desviación estándar (n=9). *Valor P corresponde al factor 'Tiempo'. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

No obstante, los valores obtenidos de Zn en parte aérea para los distintos tratamientos, se encuentran en los rangos normales de concentración en tejido vegetal, los cuales varían de 27 a 150 mg kg^{-1} (Kabata-Pendias, 2011).

Discusión

Según los resultados obtenidos en Cu, Mn y Zn, no se observó interacción entre los factores 'Tratamiento' y 'Tiempo'. Tampoco se presentaron diferencias significativas en los factores evaluados para Cu, Fe, Mn y Zn en parte aérea. En las raíces, sólo el Mn presentó diferencias significativas en el factor 'Tratamiento' y en 'Tiempo'. Sin embargo, según el fabricante, el ácido fúlvico (Anexo 1) aumenta la capacidad de absorción por las raíces, por lo que se podría esperar que se observaran diferencias entre tratamientos durante los 120 días de ensayo. Además, el ácido fúlvico es un producto que aporta Cu, Fe, Mn y Zn, como micronutrientes, aún así, la planta no absorbe cantidades significativas de estos elementos. Los ácidos fúlvicos actúan como agente quelante, los cuales principalmente tienen la capacidad de incrementar la absorción de elementos traza metálicos por la planta, por su habilidad de aumentar la solubilidad del metal y así facilitar la fitoextracción (Ghorí et al., 2015). En este estudio, las concentraciones de Cu, Fe, Mn y Zn en parte aérea y raíz, fueron similares entre la planta control y los tratamientos con adición de ácido fúlvico, lo que indica que la adición de este producto al relave minero, a las dosis recomendadas por el fabricante como corrector de micronutrientes, no muestran un efecto en estos relaves mineros. Brady y Weil (2008) establece una concentración de ácido fúlvico entre 50-300 mg L^{-1} , para mejorar el crecimiento de las plantas. También Tapia et al. (2013b) en ensayos con *Atriplex halimus* y *Rosmarinus officinalis* utilizó dosis de ácido cítrico de 4 g L^{-1} , presentando un aumento en la solubilidad de Fe y Mn mediante la aplicación de esta enmienda. Esto indica que para una mayor absorción de metales, el ácido fúlvico utilizado en este ensayo, podría aplicarse en una dosis más alta que la recomendada por el fabricante. Sin embargo, hay que considerar que la adición de sustancias húmicas como productos comerciales, podría aumentar la salinidad.

Desde el punto de vista de movilidad de metales en el relave, lo esperado, era una mayor concentración de Zn en la planta, ya que según Kabata-Pendias (2011) este elemento es muy móvil en el suelo y fácilmente bioacumulable por las plantas, en cambio Cu, Fe y Mn

son menos móviles en el suelo en comparación al Zn. Respecto a la afinidad de la materia orgánica con los metales, Stevenson (1994) señala que existe un orden de afinidad para metales divalentes, este orden es el siguiente: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$. Esto quiere decir, que con la adición de ácido fúlvico, el Cu sería el principal elemento que podría ligarse y formar quelatos para ser absorbidos por la planta, seguido de Zn, Fe y Mn. Por otro lado, Naidu et al. (2001) comenta que la mayoría de los metales están asociados con la materia orgánica y óxidos de Fe y Al en suelos, los cuales son afectados por el pH, componentes de la solución del suelo, su concentración y la afinidad por los metales. Sin embargo, en el ensayo, por la adición de las dos dosis de ácido fúlvico, el elemento que fue mayormente absorbido por la planta fue el Mn, a pesar de ser el elemento menos disponible en el relave minero, en comparación a los otros metales, de los cuales Cu y Fe, son los elementos que más se encuentran disponibles para ser absorbidos (Cuadro 4).

Un mayor nivel de Mn en *C. aequilaterus* podría atribuirse a que la planta presenta afinidad por este elemento. Además, los niveles de Mn en *C. aequilaterus* presentaron valores indicados como tóxicos en parte aérea de la mayoría de las plantas (niveles tóxicos varían de 400 a 1000 mg kg⁻¹). Sin embargo no se observaron síntomas de toxicidad por presentar concentraciones elevadas de Mn. Por lo tanto, la planta podría ser declarada como acumuladora de Mn, en referencia a lo que propone Alvarenga et al. (2003) para *Cistus ladanifer* L, que superó en sus tejidos los niveles presentes en suelos contaminados por la minería, alcanzando niveles de 830 mg kg⁻¹ de Mn, para suelos de 257 mg kg⁻¹.

La posibilidad que las plantas puedan absorber metales del suelo depende de diversos factores, como el pH, contenido de agua, sustancias orgánicas y de la disponibilidad de los ETM en el suelo (Ghori et al., 2015). Según Jones (2003), el pH puede influir significativamente en el crecimiento de la planta afectando la composición de la solución del suelo y por ende la disponibilidad de los elementos. Para el caso de los elementos evaluados y con el pH 6,3 de los relaves mineros, el cual se clasifica como ligeramente ácido, los elementos que estarían en mayor concentración disponible serían el Fe, Cu, Zn y Mn. También Brady y Weil (2008) señalan que los micronutrientes están más disponibles o solubles en el suelo en condiciones de acidez (pH menor a 6,0). En suelos con elevada acidez, el Cu, Mn y Zn se encuentran en concentraciones que pueden ser tóxicas para la plantas por su disponibilidad. Jones (2003) también señala que las condiciones del suelo limitan la absorción de elementos, ya que si el suelo se encuentra seco o con baja humedad cerca de las raíces, se verá reflejada en una mala absorción.

Por otro lado, la literatura muestra que hay plantas que tienen mayor afinidad por algunos elementos que por otros (Kabata-Pendias, 2011). Por ejemplo, en el ensayo realizado por Zhang et al. (2014), *Carpobrotus rossii* fue utilizada para evaluar su tolerancia hacia dos metales, Cd y Zn. De acuerdo a los resultados obtenidos, para Zn se obtuvo mayor concentración en hojas que en raíces, en cambio para Cd, la tendencia fue contraria. También Alvarenga et al. (2003) evaluó distintos metales en *Cistus ladanifer* L. En esta planta se puede apreciar que obtuvieron concentraciones entre 347 a 1200 mg kg⁻¹ de Mn en los distintos suelos evaluados, varias de estas concentraciones son similares a lo obtenido en *C. aequilaterus*, la cual durante todo el periodo mostró concentraciones de este

elemento entre 728,66 a 901,12 mg kg⁻¹ en parte aérea (Cuadro 12). En Cu, *Cistus ladanifer* L. presentó valores de 5 a 27 mg kg⁻¹, similares a los valores presentados en parte aérea para *C. aequilaterus* (Cuadro 7). Este autor muestra que este particular arbusto puede sobrevivir en distintos tipos de suelos, aunque presente altas concentraciones de distintos elementos, similar a lo ocurrido con *C. aequilaterus*, la cual al absorber elementos como el Cu, Fe, Mn y Zn, que son elementos de vital importancia o esenciales para el desarrollo vegetal, en concentraciones elevadas pueden producir toxicidad en las plantas (Havlin et al., 2014).

Recientes investigaciones han utilizado plantas nativas de diferentes lugares como Australia o Sudáfrica, del mismo género y familia que *C. aequilaterus*. Estas plantas se caracterizan por ser suculentas y ser posibles plantas fitoextractoras (Zhang et al., 2014). Además en los estudios realizados por Chiban et al. (2011) han descubierto que especies del género *Carpobrotus*, como *C. edulis* presentan alta cantidad de aminoácidos y taninos, lo cual genera que esta planta sea morfológicamente adecuada para la absorción de iones metálicos.

Respecto a la absorción de Fe, según Brady (1984) este elemento es más atraído por algunos agentes quelantes que otros micronutrientes. La mayor absorción y acumulación de Fe en las raíces, se podría deber a que es el segundo elemento que se encuentran más disponible en el relave minero (Cuadro 6). Navarro (2003) comenta que el estado disponible del Fe para ser absorbido es en forma de Fe⁺² o como quelatos de hierro, por lo tanto con la adición de ácido fúlvico, se vio favoreció su absorción y retención en raíces. También, de acuerdo a lo mencionado anteriormente, *C. aequilaterus* pudo haber mostrado más afinidad con este elemento para retenerlo en raíces respecto a Cu y Zn (Kabata-Pendias, 2011), como también el pH pudo ser más favorable para la absorción de este metal (Jones, 2003). Por otro lado, según la dinámica del Fe en el suelo, debido a su interacción con otros elementos, este elemento puede influir en la disponibilidad de otros micronutrientes (Navarro, 2003), y así favorecer su absorción.

Respecto al Cu, cuando se encuentra en exceso en las plantas, provoca una disminución de la concentración de otros elementos como el Fe, Mn y Zn (Adrees et al., 2015). *C. aequilaterus* al tener una concentración de Cu óptima en la parte aérea de la planta, no influyó en la absorción de otros elementos.

Generación de biomasa

Respecto a la generación de biomasa de *C. aequilaterus*, se observa un aumento de los niveles de materia seca (parte aérea, raíz y total) en el tiempo (Figura 4), sin diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 16).

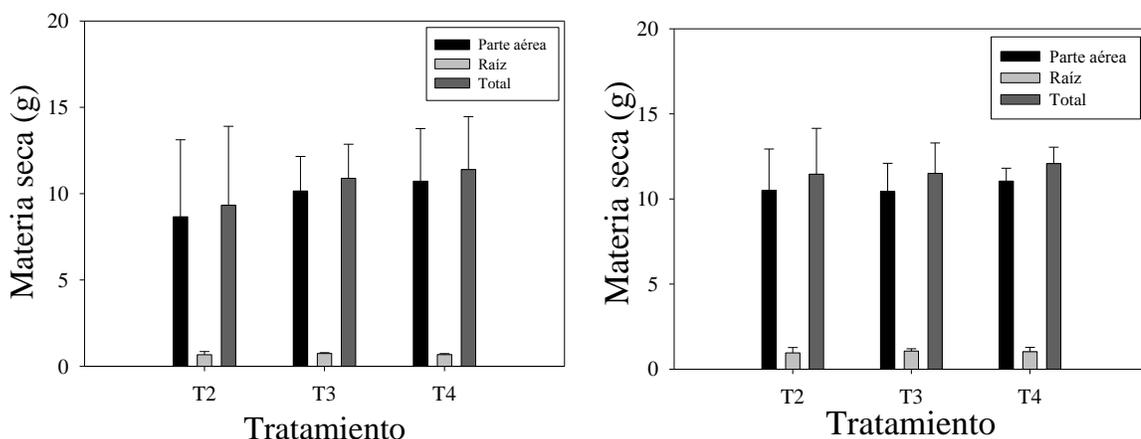


Figura 4. Materia seca de parte aérea y raíces (g) de *Carpobrotus aequilaterus* a los 60 días (izquierda) y 120 días (derecha) de ensayo. Barras sobre columnas indican desviación estándar (n=3).

La materia seca no mostró interacción entre los factores evaluados en *C. aequilaterus* (Cuadro 16), por lo que se procedió a determinar el efecto ‘Tratamiento’ y ‘Tiempo’ de forma separada.

Cuadro 16. Materia seca (g) en parte aérea y raíces en *Carpobrotus aequilaterus*, según tratamiento y tiempo.

Tratamiento	Tiempo (días)	Materia seca		
		Parte aérea	Raíz	Total
T2	60	8,70 ± 4,5 a	0,7 ± 0,2 a	9,30 ± 4,6 a
	120	10,5 ± 2,4 a	0,9 ± 0,3 a	11,5 ± 2,7 a
T3	60	10,2 ± 2,0 a	0,7 ± 0,1 a	10,9 ± 2,0 a
	120	10,4 ± 1,7 a	1,1 ± 0,1 a	11,5 ± 1,8 a
T4	60	10,7 ± 3,0 a	0,7 ± 0,1 a	11,4 ± 3,1 a
	120	11,1 ± 0,8 a	1,0 ± 0,3 a	12,1 ± 1,0 a
Valor P*		0,6178	0,9743	0,6319

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=3). *Valor P corresponde interacción entre factor ‘Tratamiento’ y ‘Tiempo’. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Según el factor ‘Tratamiento’ no se encontraron diferencias estadísticamente significativas durante el período en que se evaluó la materia seca de *C. aequilaterus* (Cuadro 17). Esto indica, que no se generaron diferencias entre los tratamientos con aplicación de ácido fúlvico (T3 y T4) respecto a la planta control (T2).

La materia seca producida en raíces fue mucho menor en comparación a la parte aérea. Según Zhang et al. (2014) ocurre la misma situación en raíces en una planta nativa de

Australia, *C. rossii* (Haw.), presentando biomasa de raíces entre 0-1 g, donde no se encontraron diferencias significativas, excepto cuando la adición de Zn es mayor a 1800 mg kg⁻¹, lo que indica que la planta presenta alta tolerancia a los metales.

También se observó, a pesar de que la biomasa no fue significativamente diferente entre los tratamientos, un mayor crecimiento en parte aérea y raíz en T4, respecto a los otros dos tratamientos.

Cuadro 17. Materia seca (g) en parte aérea y raíces en *Carpobrotus aequilaterus*, según tratamiento, después de 120 días de ensayo.

Tratamiento	Parte aérea	Raíz	Total
MS (g)			
T2	9,58 ± 3,4 a	0,81 ± 0,3 a	10,39 ± 3,6 a
T3	10,30 ± 1,7 a	0,90 ± 0,2 a	11,20 ± 1,7 a
T4	10,89 ± 2,0 a	0,85 ± 0,3 a	11,73 ± 2,1 a
Valor P*	0,3689	0,4739	0,3451

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=6). *Valor P corresponde al factor 'Tratamiento'. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

De acuerdo al factor 'Tiempo', en el Cuadro 18, se observa a los 120 días un crecimiento significativo en raíces de *C. aequilaterus*, respecto a los 60 días de evaluación.

Respecto a la parte aérea, no se presentaron diferencias significativas durante todo el periodo. Cabe destacar, que las plantas no detuvieron su crecimiento durante el ensayo, aumentando su materia seca en parte aérea y raíz, lo cual puede deberse a que la planta se adaptó a las condiciones del relave minero, a pesar de las condiciones iniciales de este sustrato, considerando el bajo porcentaje de materia orgánica, al igual que los bajos niveles de N, P y K disponibles. Además, es importante señalar que las plantas al no presentar síntomas de toxicidad, podría ser una especie como indicadora para la toxicidad de los metales (Najeeb et al., 2009).

Cuadro 18. Materia seca (g) en parte aérea y raíces en *Carpobrotus aequilaterus*, según tiempo.

Tiempo (días)	Hoja	Raíz	Total
MS (g)			
60	9,84 ± 3,0 a	0,69 ± 0,1 b	10,53 ± 3,1 a
120	10,66 ± 1,5 a	1,02 ± 0,2 a	11,68 ± 1,7 a
Valor P*	0,2808	0,0018	0,1413

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=9). *Valor P corresponde al factor 'Tiempo'. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Existen otras enmiendas más utilizadas en ensayos recientes, como el ácido cítrico, el cual

es usado como agente quelante para aumentar la biodisponibilidad de los metales. En maíz por ejemplo, se utilizó esta enmienda, la cual provocó el aumento en el crecimiento y biomasa de este cereal (Zaheer et al., 2015). Hay otra investigación de Najeeb et al. (2011), en la cual se documenta que la adición de ácido cítrico aumenta el crecimiento y la materia seca bajo estrés de ETM, en *Juncus effuses*. Sin embargo, la continua aplicación de ácido cítrico ha provocado compactación en los sustratos (Lesage et al., 2005), mientras que las sustancias húmicas en general mejoran la estructura del suelo (Ouni et al., 2014).

En la Figura 5 se muestra el crecimiento *C. aequilaterus* durante todo el período del ensayo. Se puede apreciar que las plantas presentaron un aumento en altura para los tres tratamientos durante todo el período.

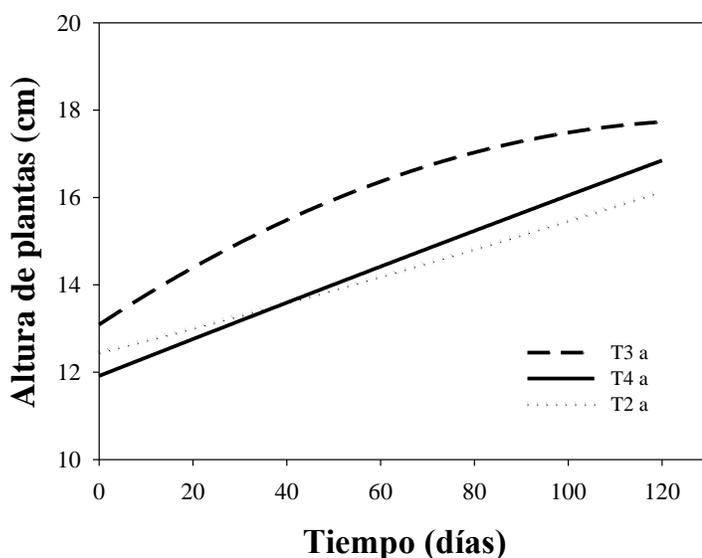


Figura 5. Curvas de crecimiento en altura ajustadas (n=3) de *Carpobrotus aequilaterus* durante un periodo de 120 días, en función de los tratamientos. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, LSD de Fisher).

Cuadro 19. Modelos ajustados para crecimiento en altura de *Carpobrotus aequilaterus*, durante 120 días de ensayo en función de los tratamientos.

Tratamiento	Tipo de ajuste	Ecuación	R ²
T2	Polinómico cuadrático	$y = 12,4457 + (0,0237 \cdot x) + (2,9101 \cdot 10^{-5} \cdot x^2)$	0,9997
T3	Polinómico cuadrático	$y = 13,0905 + (0,0704 \cdot x) - (0,0003 \cdot x^2)$	0,9874
T4	Polinómico cuadrático	$y = 11,9143 + (0,0424 \cdot x) - (1,058 \cdot 10^{-5} \cdot x^2)$	0,9948

y: altura de planta (cm), x: tiempo (días).

Respecto al seguimiento de altura en la planta, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 tratamientos. El tratamiento que mostró mayor crecimiento o 'altura final' después de los 120 días fue T3, seguido por T4 y la planta control (T2). Según las propiedades del ácido fúlvico, debe haber existido una diferencia entre la planta sin adición de enmienda orgánica con las plantas con adición de ácido

fúlvico, ya que de acuerdo a la ficha técnica de este producto, Fulvital Plus® WSP al tener un bajo peso molecular, permite la absorción de micronutrientes esenciales, lo que generaría un aumento de raíces y follaje. En este caso se ve un aumento en la altura de plantas, pero no son relevantes para el ensayo, al no presentar diferencias significativas. En relación a la evolución del seguimiento en altura durante los 120 días del ensayo, los ajustes para describir los comportamientos de los tratamientos se obtuvieron mediante curvas polinómicas cuadráticas (Cuadro 19).

Índices de fitorremediación

En los siguientes cuadros se muestran los resultados de los índices de fitorremediación, los cuales presentan el transporte a la parte aérea de los metales en la planta de *C. aequilaterus* en Cu, Fe, Mn y Zn, además del factor de bioconcentración para estos elementos. Estas mediciones se realizaron a los 60 días y a los 120 días de iniciado el ensayo. Los metales como Cd, Cr, Ni y Pb no se consideraron, ya que las concentraciones fueron bajas y/o no fueron detectados por el equipo de medición.

Para los elementos Cu, Mn y Zn no se observaron interacciones entre los factores ‘Tratamiento’ y ‘Tiempo’ en los índices de fitorremediación *Ti* y *FBC* (Cuadro 20), por lo tanto se procedió a analizar cada factor por separado.

Cuadro 20. Índices de fitorremediación de Cu en *Carpobrotus aequilaterus*, según tratamiento, después de 120 días de ensayo.

Tratamiento	Ti	FBC
T2	0,18 ± 0,04 a	0,0090 ± 0,0025 a
T3	0,17 ± 0,03 a	0,0093 ± 0,0028 a
T4	0,19 ± 0,03 a	0,0096 ± 0,0014 a
Valor P*	0,7859	0,8564

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=6). *Valor P corresponde al factor ‘Tratamiento’. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

En el factor ‘Tratamiento’ para Cu, no se muestran diferencias significativas en *Ti* ni en *FBC* (Cuadro 20). En *Ti*, T4 mostró un mayor valor, seguido de T2 y T3. En el caso de *FBC* la tendencia es igual para el caso de T4, defiriendo en T2 y T3, siendo la planta control la que obtuvo menor valor de este índice.

Para el factor ‘Tiempo’ no se presentaron diferencias significativas durante todo el período del ensayo, aunque se puede apreciar que en los dos índices evaluados, se observó un aumento después de 120 días de ensayo (Cuadro 21).

Cuadro 21. Índices de fitorremediación de Cu en *Carpobrotus aequilaterus*, según tiempo.

Tiempo (días)	Ti	FBC
	—	—
60	0,17 ± 0,03 a	0,0085 ± 0,0026 a
120	0,18 ± 0,03 a	0,0100 ± 0,0014 a
Valor P*	0,4904	0,1255

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=9). *Valor P corresponde al factor ‘Tiempo’. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Respecto al elemento Fe, se observan diferencias estadísticamente significativas para la interacción entre los factores ‘Tratamiento’ y ‘Tiempo’ de *C. aequilaterus* en *Ti* (Cuadro 22). En la evaluación a los 60 días de ensayo la planta control obtuvo mayor valor para *Ti*, sin embargo, a los 120 días disminuyó su valor, siendo el tratamiento con un índice de transporte más bajo, en comparación a los demás. T4 a los 120 días de transcurso del ensayo, fue el que obtuvo mayor valor en este índice. Esto coincide con la mayor concentración de Fe encontrado en el tejido aéreo de la planta a los 120 días de ensayo.

Cuadro 22. Índices de fitorremediación de Fe en *Carpobrotus aequilaterus*, según tratamiento y tiempo.

Tratamiento	Tiempo (días)	Índices de fitorremediación	
		Ti	FBC
		—	—
T2	60	0,26 ± 0,097 ab	0,0043 ± 0,0014 a
	120	0,12 ± 0,033 c	0,0037 ± 0,0009 a
T3	60	0,17 ± 0,035 bc	0,0027 ± 0,0008 a
	120	0,18 ± 0,054 abc	0,0047 ± 0,0017 a
T4	60	0,20 ± 0,099 abc	0,0049 ± 0,0007 a
	120	0,28 ± 0,120 a	0,0050 ± 0,0009 a
Valor P*		0,0237	0,0781

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=3). *Valor P corresponde a la interacción entre factores (‘Tratamiento’ y ‘Tiempo’). Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Cuadro 23. Factor de bioconcentración de Fe en *Carpobrotus aequilaterus*, según tratamiento, después de 120 días de ensayo.

Tratamiento	FBC
	—
T2	0,0039 ± 0,0011 a
T3	0,0036 ± 0,0016 a
T4	0,0050 ± 0,0007 a
Valor P*	0,0711

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=6). *Valor P corresponde al factor ‘Tratamiento’. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Al no observarse interacción entre los factores ‘Tratamiento’ y ‘Tiempo’ en *FBC*, se procedió a analizar cada factor por separado. En el Cuadro 23 y 24 se muestra el factor ‘Tratamiento’ y el factor ‘Tiempo’, respectivamente. En este caso no se observan diferencias significativas entre los tratamientos y entre los 60-120 días de ensayo.

Se puede apreciar que T4 presenta el valor más alto, seguido por T2 y T3. Además, se puede ver un aumento en *FBC* a los 120 días de iniciado el ensayo.

Cuadro 24. Factor de bioconcentración de Fe en *Carpobrotus aequilaterus*, según tiempo.

Tiempo (días)	FBC
	—
60	0,0039 ± 0,0013 a
120	0,0044 ± 0,0012 a
Valor P*	0,2419

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=9). *Valor P corresponde al factor ‘Tiempo’. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Respecto al Mn, al no presentarse interacción entre los factores ‘Tratamiento’ y ‘Tiempo’, éstos se evaluaron en forma separada. Para el caso de *Ti* y *FBC*, aunque no se presentaron diferencias significativas en los distintos factores, en el factor ‘Tratamiento’, se observó una disminución de *Ti* de T2 a T4, ocurriendo la misma situación en el factor ‘Tiempo’, disminuyendo los valores desde los 60 a los 120 días. Mientras que la tendencia en el factor ‘Tratamiento’ en *FBC*, fue T3 > T4 > T2 (Cuadro 25), y en el factor ‘Tiempo’ se observa que a los 120 días presentó un aumento de este índice (Cuadro 26).

Cuadro 25. Índices de fitorremediación de Mn en *Carpobrotus aequilaterus*, según tratamiento, después de 120 días de ensayo.

Tratamiento	Ti	FBC
	—	—
T2	1,60 ± 0,57 a	1,02 ± 0,376 a
T3	1,44 ± 0,71 a	1,31 ± 0,363 a
T4	1,08 ± 0,45 a	1,08 ± 0,212 a
Valor de P*	0,1114	0,1346

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=6). *Valor P corresponde al factor 'Tiempo'. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Cuadro 26. Índices de fitorremediación de Mn en *Carpobrotus aequilaterus*, según tiempo.

Tiempo (días)	Ti	FBC
	—	—
60	1,56 ± 0,63 a	1,02 ± 0,274 a
120	1,19 ± 0,71 a	1,26 ± 0,347 a
Valor P*	0,1907	0,2831

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=9). *Valor P corresponde al factor 'Tiempo'. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Por último, para Zn tampoco se observaron diferencias significativas respecto al factor 'Tratamiento' y al 'Tiempo' (Cuadro 27 y 28). No obstante, en los tres tratamientos y durante los 120 días de transcurrido el ensayo ocurrió un aumento en los dos índices evaluados (*Ti* y *FBC*).

Cuadro 27. Índices de fitorremediación de Zn en *Carpobrotus aequilaterus*, según tratamiento, después de 120 días de ensayo.

Tratamiento	Ti	FBC
	—	—
T2	0,88 ± 1,15 a	0,17 ± 0,0517 a
T3	1,27 ± 1,59 a	0,19 ± 0,1382 a
T4	2,35 ± 1,17 a	0,31 ± 0,1278 a
Valor P*	0,132	0,0746

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=6). *Valor P corresponde al factor 'Tratamiento'. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Cuadro 28. Índices de fitorremediación de Zn en *Carpobrotus aequilaterus*, según tiempo.

Tiempo (días)	Ti	FBC
	—	—
60	1,17 ± 0,9 a	0,2 ± 0,159 a
120	1,82 ± 1,5 a	0,24 ± 0,075 a
Valor P*	0,3066	0,3538

Valores corresponden a promedio ± desviación estándar (n=9). *Valor P corresponde al factor 'tiempo'. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Discusión

Kabata-Pendias (2011) menciona que elementos como Mn y Zn son moderadamente móviles desde las raíces a partes aéreas de la planta, en cambio Cu y Fe, están fuertemente adheridos a las células de las raíces. Esto se muestra en los resultados obtenidos en *C. aequilaterus*, en donde Cu y Fe presentan valores de *Ti* menores a 1, mientras que en el caso de Mn y Zn, los valores de este índice son mayores que 1. Según algunos autores, para que las plantas puedan absorber altas concentraciones de metales es necesario que puedan sobrevivir a condiciones desfavorables en el medio, como tener alta concentración de ETM en el sustrato en donde se desarrollan. Si pueden absorber los ETM y estos valores son mayores a 1, esto quiere decir que son plantas acumuladoras, es decir, que son capaces de llevar estos elementos a la parte aérea de la planta (Ghori et al., 2015; Ahmadpour et al., 2012). También Violante et al. (2010), determina que las plantas acumuladoras son las que concentran metales en la parte aérea. A pesar de los resultados obtenidos, se podría deducir que *C. aequilaterus* es una planta que puede tolerar altas concentraciones de algunos elementos en tejidos aéreos, como el Mn, el cual a pesar de estar en concentraciones mayores a las óptimas, la planta durante todo el período no presentó síntomas de toxicidad. Chiban et al. (2011) menciona que *C. edulis*, planta del mismo género que *C. aequilaterus*, es adecuada para la absorción de algunos metales como Cd y Pb en sus tejidos. Por lo tanto, según los valores de Mn encontrados en *C. aequilaterus*, se puede apreciar que esta planta es potencialmente acumuladora de Mn.

En el caso del Zn, *C. aequilaterus* presentó valores de *Ti* mayores a 1. Ocurre algo similar con los resultados presentes en *C. rossii*, donde *Ti* presentó valores de Zn mayores a 1, determinando que existe mayor concentración de este elemento en tejidos aéreos, la cual puede considerarse como una planta acumuladora de Zn (Zhang et al., 2014). En el caso de Fe, se puede deducir que la planta tiene potencial para la fitoestabilización de este metal, por sus valores elevados presentes en las raíces de la planta. En algunos estudios, se han utilizado plantas para ver su capacidad de fitoestabilización o fitoextracción. Yoon et al. (2006) utilizó diversas plantas nativas, determinando que algunas de las plantas que evaluó son potencialmente capaces de retener algunos metales como Cu, en los tejidos radicales, los cuales presentaban valores de *Ti* menores a 1. Esto también ocurrió en estudios recientes, donde se utilizó una especie en relaves mineros, *Iris halophila* Pall., la cual presentó valores de *Ti* menores a 1 con aplicación de ácido cítrico durante 30 días (Han et al., 2016).

Ghori et al. (2015) menciona que los ácidos orgánicos de bajo peso molecular (LMWOAs) tienen el potencial de incrementar la absorción de los ETM. Esto se genera por el aumento de la movilización de ETM formando complejos con metales, volviéndose solubles y disponibles para la sorción. Esta absorción depende también del pH. En *Valeriana officinalis*, en un suelo alcalino favorece la absorción de elementos como el Cu y el Mn, en cambio, esta situación es desfavorable para la absorción de Zn. De acuerdo a los elementos evaluados, la adición de ácido fúlvico de este ensayo no es relevante para la absorción y posible translocación de estos elementos a la parte aérea, ya que no se generaron diferencias significativas entre la planta control y los tratamientos con adición de ácido fúlvico. Pérez-Esteban et al. (2013) menciona que la adición de grandes cantidades de ácidos orgánicos, como el ácido cítrico o el tartárico, favorece la absorción de Zn, por lo tanto como se menciona anteriormente, puede ser que las cantidades sugeridas para las dosis de ácido fúlvico, no son las necesarias para poder producir cambios significativos en la absorción de ETM de *C. aequilaterus*.

El *FBC* no ha sido reportado por la literatura para *C. aequilaterus* en relaves mineros. En este ensayo Mn fue el único elemento que presentó un valor > 1 para el *FBC*, Cu, Fe y Zn presentaron valores < 1 . Esto es explicado por la alta concentración total de los elementos en el relave al inicio del ensayo, presentando valores para Fe de 46250 mg kg^{-1} , para Cu de 1999 mg kg^{-1} y $141,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de Zn (Cuadro 5), en comparación a la parte aérea de *C. aequilaterus*, teniendo una máxima concentración de Fe de 231 mg kg^{-1} , $22,83 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cu y $39,95 \text{ mg kg}^{-1}$ de Zn. Yoon et al. (2006) estudió diversas especies nativas de Florida, en donde evaluó concentraciones de Cu y Zn. Estas plantas, de acuerdo al *FBC*, presentaron valores que varían de 0,01 a 22,0. Algunas de estas especies como *Cyperus esculentus* L., *Phyla nodiflora* (L.), *Rubus fruticosus*, *Sesbania herbácea* (P. Mill.), entre otras, presentaron valores similares a los encontrados en Cu, Fe y Zn en *C. aequilaterus*. En el caso del Mn, este elemento presentó valores mayores a 1 en casi todos sus tratamientos y durante todo el período de ensayo. Aunque los resultados no mostraron diferencias significativas, *C. aequilaterus* es una planta apta para absorber este metal, además de no presentar síntomas por toxicidad y seguir creciendo durante todo el periodo a una tasa similar durante los meses de evaluación.

Caracterización final del relave minero

Los resultados obtenidos en el relave minero sin planta al final del ensayo, se muestran en el Cuadro 29. Se presentan los valores de los ETM para la aplicación de dosis 1 (T0) y dosis 2 (T1) de ácido fúlvico en relaves mineros, frente a la concentración inicial (Ci) de metales expresados en mg kg^{-1} .

De acuerdo a los valores obtenidos para los distintos elementos en el relave minero, se presentaron diferencias significativas entre tratamientos para Cu, Fe, Mn y Zn.

Cuadro 29. Concentraciones de elementos traza metálicos en relave minero para tratamientos T0 y T1, frente a caracterización inicial (Ci), después de 120 días de ensayo.

Tratamientos	Cu	Fe	Mn	Zn
	(mg kg ⁻¹)			
Ci	1998 ± 222 a	46250 ± 2500 a	716 ± 70,3 a	141 ± 7,8 b
T0	1902 ± 62,5 a	21750 ± 4000 b	442 ± 3,0 b	215 ± 62,5 b
T1	1535 ± 155 b	17562 ± 3938 b	477 ± 77,5 b	305 ± 155 a
Valor P*	0,0273	0,0001	0,0028	0,0067

Valores corresponden promedio ± desviación estándar (n=3). Ci: caracterización inicial de relave minero. *Valor P corresponde a la evaluación del factor 'Tratamiento' a los 120 días del ensayo. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Con respecto a la concentración de metales al inicio del ensayo y después de 120 días de ser aplicado el ácido fúlvico en las dos dosis, existen diferencias significativas en los cuatro elementos evaluados. Respecto al Cu, este elemento presenta una tendencia en donde $Ci \approx T0 > T1$, disminuyendo su concentración en promedio un 415 mg kg⁻¹. Para el caso del Fe, existe una disminución notoria de los valores entre la concentración inicial del relave minero y la aplicación de ácido fúlvico. Para Mn ocurre la misma situación que en Fe, presentando valores de 716; 442 y 477 mg kg⁻¹, para Ci, T0 y T1, respectivamente. Por último, en Zn ocurre una situación distinta a la presentada por los otros metales, aumentando su concentración de 141 a 305 mg kg⁻¹ de Ci a T1.

Posiblemente, la disminución de concentración de ETM en el relave con los tratamientos puede atribuirse a que los complejos solubles entre ácidos fúlvicos y metales, fueron lixiviados en el agua de riego (Galán y Romero, 2008). Brady y Weil (2008) comenta que los quelatos de Fe tienden a ser más estables que los de Cu y Mn, ya que el Fe es atraído más fuertemente por los agentes quelantes que otros micronutrientes, por esta razón su concentración fue la que más disminuyó entre los metales. Para Zn en cambio, el aumento en las concentraciones de este elemento en el relave minero, puede deberse a un aporte de este micronutriente mediante la adición de ácido fúlvico (Anexo 1).

Los valores obtenidos para Fe, Mn y Zn en los tratamientos con ácido fúlvico, se encuentran en los rangos de concentración sin presentar toxicidad en suelos. Mientras que Cu presenta valores elevados en T0 y T1, presentando toxicidad en el suelo (<1 a 700 mg kg⁻¹) (Acevedo et al., 2005; Bohn et al., 2001; Bowen, 1979; Jones, 2003 y Sparks, 2003).

Cuadro 30. Valores de pH y conductividad eléctrica en los tratamientos 0 y 1.

Tratamientos	pH	CE
	—	dS cm ⁻¹
Ci	6,3 ± 0,07 b	3,80 ± 0,06 a
T0	7,4 ± 0,11 a	3,91 ± 0,05 a
T1	7,3 ± 0,06 a	3,82 ± 0,02 a
Valor P*	<0,0001	0,0733

Valores corresponden promedio ± desviación estándar (n=3). CE: conductividad eléctrica. Ci: caracterización inicial de relave minero. *Valor P corresponde a la evaluación del factor ‘Tratamiento’ a los 120 días del ensayo. Letras distintas en una columna indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($p \leq 0,05$, LSD de Fisher).

Según Navarro (2003) los suelos que se encuentran en un rango de pH entre 7,0 y 8,0, son suelos principalmente de regiones áridas, los cuales son clasificados como suelos de alcalinidad débil, por lo tanto, según los datos obtenidos en el Cuadro 30, los tratamientos con dosis 1 y dosis 2 de ácido fúlvico se clasifican de esta manera, tendiendo a la neutralidad. De acuerdo a la conductividad eléctrica, el relave minero tiene una salinidad ligera (CIREN, 1996).

Al final del ensayo en los relaves se presentaron diferencias estadísticamente significativas en pH, mientras que en conductividad eléctrica no se encontraron diferencias entre tratamientos. En comparación a la caracterización inicial del relave minero con los tratamientos con aplicación de ácido fúlvico, el pH mostró una tendencia al aumento, presentando en Ci un valor de 6,3 en promedio y 7,4 y 7,3, en T0 y T1, respectivamente. Este aumento del pH con los tratamientos, puede deberse a la adición del agua de riego, la cual presentaba un pH mayor (7,5) que Ci. El menor pH de la solución de ácido fúlvico (Cuadro 5), no mostró una acidificación en los tratamientos, por consiguiente, existe cierta capacidad de amortiguación del relave. Además, el aumento del pH en los relaves mineros genera un efecto favorable para la inmovilización de metales en ellos (Navarro, 2003; Jones, 2003 y Brady, 1984).

CONCLUSIONES

En los relaves mineros del Tranque Ovejería no se encontraron concentraciones totales particularmente altas de metales, excepto el cobre, que también presentó mayor disponibilidad. Estos relaves carecen de fertilidad, en relación a N, P, K disponibles, como también, presentan bajo contenido de materia orgánica. El pH fue ligeramente ácido y la conductividad eléctrica indica que el relave minero es no salino.

Carpobrotus aequilaterus, planta nativa de Chile, se estableció sin mayor dificultad en los relaves mineros. La adición de ácidos fúlvicos, no mostró ningún efecto en la absorción de Cu y Zn en *Carpobrotus aequilaterus* tanto a los 60, como a los 120 días de ensayo. Mientras que sólo en raíz, los ácidos fúlvicos en menor dosis, aumentaron los niveles de Fe y Mn. Respecto a la generación de biomasa de *Carpobrotus aequilaterus*, la adición de ácidos fúlvicos no contribuyó a un mayor crecimiento de la planta

Carpobrotus aequilaterus presentó un índice de transporte a la parte aérea menor a 1 para Cu y Fe a los 60 y 120 días de ensayo, lo que indica que mostró una mayor concentración en las raíces de la planta, siendo una especie que muestra la capacidad de fitoestabilización de estos elementos. En contraste, para Mn y Zn, los valores del índice de transporte a la parte aérea fueron mayor a 1, por lo que *Carpobrotus aequilaterus* presenta la capacidad de fitoextracción de estos elementos.

Respecto al factor de bioconcentración los resultados obtenidos fueron menores a 1 para todos los elementos, excepto para el Mn, lo que permite declarar a *Carpobrotus aequilaterus* como una planta potencialmente acumuladora de este elemento.

Las dosis recomendadas por el fabricante de ácidos fúlvicos como corrector de micronutrientes o agente quelante en suelos, no son aplicables en relaves mineros.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, E., M. Carrasco, O. León, P. Silva, G. Castillo, I. Ahumada et al. 2005, marzo. Informe de criterios de calidad de suelo agrícola. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Santiago, Chile. 205p.
- Acuña, E. 2016. Evaluación de *Atriplex halimus* y *Chrysopogon zizanioides* en la fitorremediación inducida de un suelo contaminado con plomo. Tesis Magister Ingeniero Agrónomo, Mención Manejo de Suelos y Aguas. Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 97p.
- Adrees, M.; S. Ali; M. Rizwan; M. Ibrahim; F. Abbas; M. Farid et al. 2015. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environmental Science Pollution Research*, 22 (11): 8148-8162.
- Ahmadpour, P.; F. Ahmadpour; T. Mahmud; A. Abdu; M. Soleimani and F. Hosseini. 2012. Phytoremediation of heavy metals: a green technology. *African Journal of Biotechnology*, 11 (76): 14036-14043.
- Alcantara, H.; A. Doronila; M. Nicolas; S. Ebbs and S. Kolev. 2015. Growth of selected plant species in biosolids-amended mine tailings. *Minerals Engineering*, 80: 25-32.
- Alvarenga, P.; M. Araújo and J. Silva. 2004. Elemental uptake and root-leaves transfer in *Cistus ladanifer* L. growing in a contaminated pyrite mining area (Aljustrel-Portugal). *Water, Air, and Soil Pollution*, 152 (1): 81-96.
- Bohn, H.; R. Myer and G. O'Connor. 2001. Soil chemistry. 3a. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc. 320p.
- Bowen, H. 1979. Environmental chemistry of the elements. London, England: Academic Press. 333p.
- Brady, N. 1984. The nature and properties of soils. 9a ed. New York, USA: Macmillan. 780p.
- Brady, N. and R. Weil. 2008. The nature and properties of soils. 14a ed. New Jersey, USA: Pearson. 992p.
- Cadahía, C. 2005. Fertirrigación. cultivos hortícolas, frutales y ornamentals. 3a ed. Madrid, España: Mundi-Prensa. 681p.

Calza, P.; D. Vione and C. Minero. 2014. The role of humic and fulvic acids in the phototransformation of phenolic compounds in seawater. *Science of The Total Environment* 493: 411-418.

Chapman, H. 1965. *Methods of soil analysis – chemical and microbiological properties*. California, USA: Committee. 901p.

Chiban, M.; A. Soudani; F. Sinan and M. Persin. 2011. Single, binary and multi-component adsorption of some anions and heavy metal ion environmentally friendly *Carpobrotus edulis* plant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82 (2): 267-276.

CIREN (Centro de información de Recursos Naturales), Chile. 1996. *Estudio Agrocológico, Región Metropolitana: Descripciones de suelos, materiales y símbolos*. [Santiago, Chile]: CIREN. 408p. (Publicación CIREN N° 115).

Conesa, H; G. García; Á. Faz and R. Arnaldos. 2007. Dynamics of metal tolerant plant communities' development in mine tailings from the Cartagena-La Unión Mining District (SE Spain) and their interest for further revegetation purposes. *Chemosphere*, 68 (6): 1180-1185.

Dold, B. and L. Fontboté. 2001. Element cycling secondary mineralogy in porphyry copper tailings as a function of climate, primary mineralogy, and mineral processing. *Journal of Geochemical Exploration*, 74 (1-3): 3-55.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Textura del suelo. [En línea]. Recuperado en: <http://www.fao.org/fishery/static/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706s/x6706s06.htm#top>. Consultado el 23 de Noviembre de 2016.

Galán, E. y A. Romero. 2008. Contaminación de suelos por metales pesados. *Macla*, 10: 48-60.

Ghori, Z.; H. Iftikhar; M. Bhatti; N. Minullah; I. Sharma; A. Kazi et al. 2015. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soil. (cap. 15, pp.385-409). In: Ahmd, P. (Ed.). *Plant Metal Interaction Emerging Remediation Techniques*. Massachusetts, USA: Elsevier. 652p.

Han, Y.; L. Zhang; J. Gu; J. Zhao and J. Fu. 2016. Citric acid and EDTA on the growth, phytosynthetic properties and heavy metal accumulation of *Iris halophila* Pall. cultivated in Pb mine tailing. *International Biodeterioration & Biodegradation*: 1-7.

Havlin, J.; S. Tisdale; W. Nelson and J. Beaton. 2014. Soil fertility and fertilizers: an introduction to nutrient management. 8a ed. Upper Saddle River: USA: Pearson. 528p.

Hayes, T.; M. Hayes; J. Skjemstad and R. Swift. 2008. Compositional relationships between organic matter in a grassland soil and its drainage waters. *European Journal of Soil Science*, 59 (4): 603-616.

Hossner, L. and H. Shahandeh. 2005. Rehabilitation of minerals processing residue (tailings). (cap. 305, pp. 1450-1455). In: Rattan, L. Encyclopedia of Soil Science. 2a ed. New York, USA: CRC Press. 2804p.

Hsiao, K.; P. Kao and Z. Hseu. 2007. Effects of chelators on chromium and nickel uptake by *Brassica juncea* on serpentine-mine tailings for phytoextraction. *Journal of Hazardous Materials*, 148(1-2): 366-376.

Instituto Nacional de Normalización, Chile. NCh1333. Of78. Modificada en 1987. Requisitos de calidad del agua para diferentes usos. [En línea]. Santiago, Chile: INN, 1987. 15p. Recuperado en: <http://ciperchile.cl/pdfs/11-2013/norovirus/NCh1333-1978_Mod-1987.pdf>. Consultado el: 24 de Marzo de 2017.

Jones, J. 2003. Agronomic handbook: management of crops, soils, and their fertility. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press. 450p.

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

Lee, S.; W. Ji; W. Lee; N. Koo; I. Koh; M. Kim et al. 2014. Influence of amendments and aided phytoestabilization on metal availability and mobility in Pb/Zn mine tailings. *Journal of Environmental Management*, 139: 15-21.

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

Ma, C.; H. Ming; C. Lin; R. Naidu and N. Bolan. 2016. Phytoextraction of heavy metal from tailing waste using Napier grass. *Catena*, 136: 74-83.

Mileusnić, M.; B. Siyowi; A. Kamona; S. Ružičić; I. Mapaure and P. Maruwa. 2014. Assessment of agricultural soil contamination by potentially toxic metals dispersed from improperly disposed tailings, Kombat mine, Namibia. *Journal of Geochemical Exploration*, 144: 409-420.

McGrath, S. and F. Zhao. 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*, 14 (3): 277-282.

Moreno-Jiménez, E.; E. Esteban; T. Fresno; C. de Egea and J. Peñalosa. 2010. Hydroponics as a valid tool to assess arsenic availability in mine soils. *Chemosphere*, 79 (5): 513-517.

Najeeb, U.; G. Jilani; S. Ali; M. Sarwar; L. Xu and W. Zhou. 2011. Insights into cadmium induced physiological and ultra-structural disorders in *Juncus effusus* L. and its remediation through exogenous citric acid. *Journal of Hazardous Materials*, 186 (1): 565-574.

Najeeb, U.; L. Xu; S. Ali; G. Jilani; H. Gong; W. Shen et al. 2009. Citric acid enhances the phytoextraction of manganese and plant growth by alleviating the ultrastructural damages in *Juncus effusus* L. *Journal of Hazardous Materials*, 170 (2-3): 1156-1163.

Naidu, R.; G. Krishnamurti; W. Wenzel and M. Megharaj. 2001. Heavy metal interactions in soils and implication for soil microbial biodiversity. (cap. 14, pp. 401-431). In: Prasad, M.N.V. Metals in the Environment Analysis by Biodiversity. New York, USA: Marcel Dekker, Inc. 487p.

Navarro, G. 2003. Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. 2a ed. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa. 122p.

Pastor, J.; A. Matín-Aparicio; A. Gutierrez-Maroto y A. Hernández. 2005. Efecto de la aplicación de dos sustancias quelantes (EDTA y DTPA) sobre la vegetación autóctona en un suelo contaminado de Cu, Zn y Cd. *Control de la degradación de suelos*: 431-436.

Pérez-Esteban, J.; C. Escolástico; A. Moliner and A. Masaguer. 2013. Chemical speciation and mobilization of copper and zinc in naturally contaminated mine soils with citric and tartaric acids. *Chemosphere*, 90 (2): 276-283.

Ouni, Y.; T. Ghnaya; F. Montemurro; C. Abdelly and A. Lakhdar. 2014. The role of humic substances in mitigating the harmful effects of soil salinity and improve plant productivity. *International Journal of Plant Production*, 8 (3): 353-374.

Orchard, C.; P. León and R. Ginocchio. 2009. Phytostabilization of massive mine wastes with native phylogenetic resources: potencial for sustainable use and

conservation of the native flora in north-central Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 36 (3): 329-352.

Red Agrometeorológica de INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias). [En línea]. Estación Meteorológica La Platina. Santiago, Chile. Recuperado en: <<http://agromet.inia.cl/estaciones.php>>. Consultado el: 02 de mayo de 2017.

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

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

Sadzawka, A.; A. Carrasco; R. Grez; M. Mora; H. Flores y A. Neaman. 2006. Métodos de análisis recomendados para los suelos de Chile. Serie Actas INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias) N°34. Santiago, Chile. 164p.

Sandoval, M.; J. Dörner; O. Seguel; J. Cuevas y D. Rivera. 2012. Métodos de análisis físicos de suelos. Chillán, Chile: Universidad de Concepción. 80p. (Departamento de Suelos y Recursos Naturales Universidad de Concepción. Publicación N°5).

Santibañez, C.; L. de la Fuente; E. Bustamante; S. Silva; P. León and R. Ginocchio. 2012. Potential use of organic- and hard-rock mine wastes on aided phytostabilization of large-scale mine tailings under semiarid mediterranean climatic conditions: short-term field study. *Applied and Environmental Soil Science*: 1-15.

Santibañez, C.; C. Verdugo and R. Ginocchio. 2008. Phytostabilization of copper mine tailings with biosolids: implications for metal and productivity of *Lolium perenne*. *Science of The Total Environment*, 395 (1): 1-10.

SERNAGEOMIN (Servicio Nacional de Geología y Minería). 2017. ¿Qué es el relave?. [En línea]. Santiago, Chile. Recuperado en: <<http://www.sernageomin.cl/preguntas-frecuentes-relaves.php>>. Consultado el: 03 de abril de 2017.

Sparks, D. 2003. Environmental soil chemistry. 2a ed. California, USA: Academic Press. 352 p.

Stevenson, F. 1994. Humus chemistry: genesis composition, reactions. 2a ed. New Jersey, USA: John Wiley & Sons Inc. 512p.

Tapia, Y.; E. Eymar; A. Gárate and A. Masaguer. 2013b. Effect of citric acid on metals mobility in pruning wastes and biosolids compost and metals uptake in *Atriplex halimus* and *Rosmarinus officinalis*. *Environmental Monitoring Assessment*, 185 (5): 4221-4229.

Violante, A.; V. Cozzolino; L. Perelomov; A. Caporale and M. Pigna. 2010. Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10 (3): 268-292.

Wang, W.; W. Zhen; S. Bian and X. Xi. 2015. Structure and properties of quaternary fulvic acid-intercalated saponite/poly (lactic acid) nanocomposites. *Applied Clay Science*, 109-110: 136-142.

Wong, M.H. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere*, 50 (6): 775-780.

Xiong, J.; L. Koopal; L.Weng; M. Wang and W. Tan. 2015. Effect of soil fulvic and humic acid on binding of Pb to goethite-water interface: linear additivity and volume fractions of HS in the stern layer. *Journal of Colloid and Interface Science*, 457: 121-130.

Yoon, J.; X. Cao; Q. Zhou and L. Ma. 2006. Accumulation of Pb, Cu and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of The Total Environment*, 368 (2-3): 456-464.

Zaheer, I.; S. Ali; M. Rizwan; M. Farid; M. Bilal; R. Ali et al. 2015. Citric acid assisted phytoremediation of copper by *Brassica napus* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120: 310-317.

Zhang, C.; P. Sale; A. Doronila; G. Clark; C. Livesay and C. Tang. 2014. Australian native plant species *Carpobrotus rossi* (Haw.) Schwantes shows the potential of cadmium phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 21 (16): 9843-9851.

Zhou, P.; B. Yan and B. Gu. 2005. Competitive complexation of metal ions with humic substances. *Chemosphere*, 58 (10): 1327-1337.

ANEXOS

Anexo 1. Composición del producto Fultival Plus[®] WSP declarado por el fabricante Humitech (Alemania) 2015.

	Unidades	Valores
Ácidos fúlvicos	(%)	70
pH	-	4,0-5,0
Cu	(%)	1,0
Fe	(%)	4,0
Mg	(%)	6,0-7,0
Mn	(%)	2,5
S	(%)	5,0-6,0
Zn	(%)	2,5

Anexo 2. Cálculo de la dosis de ácido fúlvico

Datos	
Peso maceta	1927,5 g
Densidad aparente	1,57 kg L ⁻¹
Volumen maceta	1017,38 cm ³
Altura maceta	0,076 m
Semanas de riego (4 meses)	16 semanas
Frecuencia de riego por semana	3 riegos por semana

$$\text{Masa de relave en maceta} = \frac{1,57 \text{ kg L}^{-1} * 1017,38 \text{ cm}^3}{1000 \text{ cm}^3 \text{ L}^{-1}} = 1,595 \text{ kg}$$

$$\text{Peso de relave (kg ha}^{-1}\text{)} = 10.000 \text{ m}^2 \text{ ha}^{-1} * 0,076 \text{ m} * 1,57 \text{ kg L}^{-1} * 1.000 \text{ L m}^3 \\ = 1.191.477 \text{ kg ha}^{-1}$$

$$\text{ha por maceta} = \frac{1,595 \text{ kg}}{1.191.477 \text{ kg ha}^{-1}} = 1,33 \times 10^{-6} \text{ ha por maceta}$$

- Cálculo de la dosis total 1 y 2 de ácido fúlvico por maceta en mg:

$$\text{Dosis total 1 AF} = 5 \text{ kg ha}^{-1} * 1,33 \times 10^{-6} \text{ ha por maceta} * 1.000.000 \text{ mg kg}^{-1} \\ = 7 \text{ mg por maceta}$$

$$\text{Dosis total 2 AF} = 7 \text{ mg por maceta} * 2 = 14 \text{ mg por maceta}$$

- Cálculo de la división de riego durante el ensayo:

$$\text{Cantidad de riegos durante el ensayo} = 16 \text{ semanas} * 3 \text{ veces por semana} \\ = 48 \text{ riegos durante el ensayo de 200 mL}$$

- Cálculo de dosis 1 y 2 de ácido fúlvico en mg L⁻¹:

$$\text{Dosis 1} = \frac{7 \text{ mg}}{48 \text{ riegos de 200 mL}} * \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$$

$$\text{Dosis 2} = 0,7 \text{ mg L}^{-1} * 2 = 1,4 \text{ mg L}^{-1}$$

Anexo 3. Concentración de metales en parte aérea y raíz, a los 60 y 120 días de iniciado el ensayo.

Tratamiento	Primer Muestreo		Segundo Muestreo	
	Parte aérea	Raíz	Parte aérea	Raíz
Cd (mg kg⁻¹)				
T2	nd	1,95 ± 0,78	nd	nd
T3	nd	1,97 ± 0,29	1,4 ± 0	2,5 ± 0,28
T4	nd	1,95 ± 0,21	nd	1,8 ± 0
Cr (mg kg⁻¹)				
T2	0,8 ± 0	nd	nd	2,1 ± 0,7
T3	nd	2,6 ± 0	nd	nd
T4	nd	nd	nd	nd
Cu (mg kg⁻¹)				
T2	17,47 ± 7,2	88,7 ± 8,1	18,33 ± 3,3	116 ± 18,2
T3	14,33 ± 4,5	100 ± 23,1	22,83 ± 1,6	113 ± 19,1
T4	19,30 ± 4,2	111 ± 36,1	19,00 ± 1,0	101 ± 21,2
Fe (mg kg⁻¹)				
T2	191 ± 58,5	767 ± 245	167 ± 42,8	1399 ± 248
T3	120 ± 35,7	724 ± 181	215 ± 42,1	1200 ± 328
T4	226 ± 31,2	1171 ± 755	231 ± 41,8	883 ± 181
Mn (mg kg⁻¹)				
T2	669 ± 285	405 ± 126	788 ± 298	614 ± 42,2
T3	777 ± 228	457 ± 151	1100 ± 196	968 ± 242
T4	738 ± 109	548 ± 98,9	814 ± 173	1000 ± 196
Ni (mg kg⁻¹)				
T2	nd	nd	nd	11,4 ± 0
T3	nd	nd	5,1 ± 0	nd
T4	nd	nd	nd	nd
Pb (mg kg⁻¹)				
T2	97,0 ± 0,00	nd	38,2 ± 0	38,2 ± 0
T3	nd	96,9 ± 0	nd	nd
T4	67,5 ± 41,4	nd	nd	38,1 ± 0
Zn (mg kg⁻¹)				
T2	20,80 ± 8,00	36,54 ± 7,60	27,13 ± 6,20	29,95 ± 14,1
T3	13,48 ± 4,60	21,63 ± 7,00	39,95 ± 15,0	41,61 ± 15,8
T4	49,92 ± 17,7	37,88 ± 13,2	36,63 ± 7,60	18,31 ± 7,10

Valores corresponden promedio ± desviación estándar (n=3). nd: no detectado.

