

UCH-FC
Q. Ambiental

P695

C-1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**"ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN DE METALES PESADOS POR UNA
ESPECIE VEGETAL USADA EN REMEDIACIÓN DE AGUAS DERIVADAS
DE FAENAS MINERAS"**

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

Químico Ambiental

Juan Luis Pizarro Miranda

Director de Seminario de Título: Dra. María Angélica Rubio

Profesor Patrocinante: M. Cs. Sylvia Copaja Castillo

Diciembre de 2011

Santiago – Chile

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

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

JUAN LUIS PIZARRO MIRANDA

“ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN DE METALES PESADOS POR UNA ESPECIE VEGETAL USADA EN REMEDIACIÓN DE AGUAS DERIVADAS DE FAENAS MINERAS”

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

COMISIÓN DE EVALUACIÓN

Dra. María Angélica Rubio
Director Seminario de Título

M. Cs. Sylvia Copaja Castillo
Profesor Patrocinante

Prof. María Inés Toral
Corrector

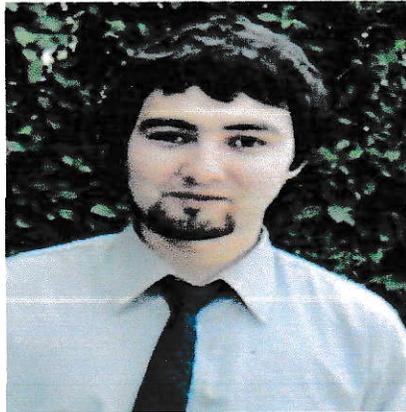
Dr. Nicolás Yutronic
Corrector

A. Rubio
S. Copaja
M. Inés Toral
N. Yutronic

Un sello circular con el texto "FACULTAD DE CIENCIAS" en la parte superior, "BIBLIOTECA CENTRAL" en el centro y "U. DE CHILE" en la parte inferior.

Santiago de Chile, Diciembre de 2011

Reseña



Nací en Santiago el 5 de noviembre de 1985, me radique con mis padres y mis dos hermanas en Buin hasta el presente, donde viví mi niñez y adolescencia. Fue en este lugar donde forme una personalidad muy introvertida lo que me hizo desarrollar mi capacidad analítica y curiosidad por entender las cosas. Mi educación básica y media fue en el Liceo Polivalente Moderno Cardenal Caro. Siempre tuve la convicción que para poder encontrar respuestas de mis inquietudes lo mío era la ciencia, por lo que entrar a la Universidad de Chile a estudiar ciencias para mí fue un gran logro, y convencido aún de que fue la mejor decisión.

Dedicatoria



*A mis padres Juan y Monica,
A mis hermanas Carolina y Lorena ,
y a mis sobrinos Antonia,
Matías, Ignacia y Agustín.*

Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar a mis padres Juan Luis Pizarro y mi madre Mónica Miranda, de quienes siempre he tenido su apoyo incondicional y me han orientado con sus consejos, a mis hermanas y mis sobrinos por su cariño.

A mis amigos de la universidad, Camila (brillito), Manzano, Pancho, Seba, Vitoco, Denis, con los cuales pasamos por diferentes momentos de alegrías, penas, cansancio, mucho sueño y que si no fuera por ellos hubiera sido más difícil y a todos los que conocí y que formaron parte de estos años.

Agradecer especialmente a la Dra. María Angélica Rubio por darme la oportunidad de poder desarrollar mi trabajo con ella, y por su apoyo en este proceso, así también agradecer a la Dra. Claudia Ortiz por permitirme trabajar con ella y darme la instancia para aprender, además incluir a Dr. Ricardo Salazar por su ayuda en la parte final de mi seminario. Sin duda que trabajar con ellos fue una gran experiencia y sobre todo un gran aprendizaje que de seguro me ayudara en mi desarrollo profesional futuro.

Agradecer a mis profesores correctores y patrocinante, Prof. María Inés Toral, Dr. Nicolás Yutronic y M.Cs Sylvia Copaja.

Agradecer a la Universidad de Santiago de Chile, especialmente la Facultad de *Química y Biología*.

A mis profesores de la Universidad de Chile en estos años de estudio, algunos de los cuales fueron inspiración y motivación para seguir.

INDICE

RESUMEN	XI
ABSTRACT	XIII
I.INTRODUCCION	1
1.1. Aspectos Generales	1
1.2. Glosario	5
1.2.1. Relaves	5
1.2.2 RIL	5
1.2.3.RIL de Estudio	5
1.2.4. Metales Pesados	6
1.2.5. Fitorremediación	6
1.2.6. Plantas Utilizadas en Fitorremediación	6
1.2.7. <i>Vetiveria Zizanioides</i>	8
1.2.8. <i>Polypogon Australis</i>	8
1.2.9. Trigo	8
1.2.10. Rizosfera	8
1.2.11. Ácidos Radiculares	9
1.1.12. Ácidos Orgánicos	9
1.3. Hipótesis del Trabajo	9

1.4. Objetivos.....	10
1.4.1. Objetivo General.....	10
1.4.2. Objetivos Específicos.....	10
II. MATERIALES Y METODOS.....	11
2.1. Implementación Sistema de Cultivo (Batch).....	11
2.1.1. Método de Implementación de Cultivo.....	11
2.3. Tratamiento de la Muestra.....	12
2.3.1. Extracción de muestras.....	12
2.3.2. Digestión de la muestra vegetal.....	13
2.3.3. Determinación de Metales.....	13
2.3.4. Determinación de Metales en la planta (muestras).....	14
2.4. Sistema extracción de ácidos exudados.....	14
2.4.1. Elaboración del sistema de extracción.....	14
2.5. Tratamiento de la Muestra.....	15
2.5.1. Obtención de la muestra.....	15
2.5.2 Determinación de Ácidos Orgánicos.....	15
III. RESULTADOS.....	17
3.1. Sistema de Cultivo Batch: Observaciones.....	17
3.2. Parámetros Físicoquímicos.....	18

3.2.1. Temperatura.....	19
3.2.2. Sólidos Totales.....	20
3.2.3. Conductividad Eléctrica.....	21
3.2.4. Potencial Oxido-Reducción.....	22
3.2.5. pH.....	23
3.2.6. Oxígeno Disuelto.....	24
3.3. Masas Secas Obtenidas por Cada Muestra.....	26
3.4. Análisis de concentraciones de metales pesados en el RIL Adit 71.....	27
3.5 Concentraciones de Metales Pesados en RIL Adit 71 previo a la	
 Implementación del sistema de cultivo. Obtenidos por ICP y AA.....	27
3.6. Absorción de Metales Pesados por <i>Especie V. zizanioides</i>.....	28
3.6.1. Absorción de Mn.....	28
3.6.2. Absorción de Cu en solución control.....	29
3.6.3. Absorción de Cu en RIL Adit 71.....	30
3.7. Balance de Masas.....	32
3.8. Retención de Cu en las Plantas.....	33
3.9. Tasa de Absorción de Metales Pesados en Plantas.....	34
3.9.1. Tasa de Absorción de Cu.....	34
3.10. Procesos que Afectan la Absorción.....	34

3.11. Análisis de Ácidos Exudados	37
3.11.1. Extracción de Ácidos Exudados por la planta <i>V. zizanioides</i>	37
3.11.2. Extracción de Ácidos Exudados del <i>T.aestivum</i>	38
3.11.3. Análisis Cuantitativo y Cualitativo de Ácidos Orgánicos extraídos del <i>T.aestivum</i>	38
3.11.4. Sistema de Extracción de Ácidos Exudados por la planta <i>P. australis</i>	38
3.11.5. Concentración de ácidos orgánicos exudados y Cu absorbido de <i>P. australis</i> en diferentes medios y pH	42
IV. CONCLUSIONES	44
VI. REFERENCIAS	45
VII. ANEXOS	47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de variación de parámetros fisicoquímicos durante los 21 días de cultivo en RIL Adit 71.....	25
Tabla 2: Masa seca total de las plantas extraídas del RIL en días de muestreo.....	26
Tabla 3: Masa seca total de las plantas extraídas del control en días de muestreo.....	26
Tabla 4: Concentración de Metales RIL Adit 71 antes del cultivo.....	27
Tabla 5: Balance de masas de Cu en raíces.....	32
Tabla 6: Concentración Neta de Cu obtenidos en raíces dispuestas en RIL.....	33
Tabla 7: Concentración Neta de Cu obtenidas en Hojas Cultivas en RIL.....	33
Tabla 8 : Retención Total de Cu por las Plantas <i>Vetiveria Zizanioides</i> durante todo el Periodo de Cultivo.....	33
Tabla 9: Formas químicas de los metales en el suelo y su disponibilidad relativa para plantas.....	36
Tabla 10: Concentración de ácido acético exudado y Cu absorbido en planta <i>V.zizanioides</i> en 48 h.....	37
Tabla 11: Lista de ácidos orgánicos encontrados en exudados de <i>P. australis</i>	40
Tabla 12: Concentración de ácidos orgánicos exudados por <i>P. australis</i>	40

Tabla 13: Concentración de ácidos orgánicos exudados y Cu absorbido de *P. australis* en 72 h.....43

I

NDICE DE FIGURAS

Figura 1: Variación de la temperatura en el periodo de cultivo.....	19
Figura 2: Variación de sólidos totales durante el periodo de cultivo.....	20
Figura 3: Variación de conductividad eléctrica durante el periodo de cultivo.....	21
Figura 4: Variación del Potencial Oxido-Reducción durante el periodo de Cultivo.....	22
Figura 5: Variación del pH durante el periodo de cultivo.....	23
Figura 6: Variación del oxígeno disuelto durante el periodo de cultivo.....	24
Figura 7: Variación de la Absorción de Cu en las Raíces en solución control.....	29
Figura 8: Variación de la Absorción de Cu en Hojas en solución control.....	30
Figura 9: Variación de la Absorción de Cu en Raíces en RIL Adit 71.....	31
Figura 10: Variación de la Absorción de Cu en Hojas de <i>V. zizanooides</i> durante el periodo de Cultivo en RIL Adit 71.....	31
Figura 11: Dinámica de los metales pesados en el sistema suelo-planta.....	35
Figura 12: Variación de ácido oxálico durante las 72 h.....	40
Figura 13: Variación de ácido málico durante las 72 h.....	41
Figura 14: Variación de ácido oxámico durante las 72 h.....	42

RESUMEN

En la temática ambiental de desarrollo de nuevas técnicas de tratamientos de RILes mineros con menos impactos ambientales y más eficientes, se ha estudiado el uso de plantas como medio para descontaminar a través de fitorremediación. El objetivo de este estudio fue cuantificar la absorción de algunos metales pesados presentes en un RIL minero y estudiar un posible mecanismo por el cual la planta solubiliza especies metálicas presentes en material particulado del RIL exudando algunos ácidos orgánicos.

En este estudio se usaron las especies vegetales *Vetiveria zizanioides* y *Polyopogon australis*, para tratamiento se usó el RIL Adit 71, proveniente de Codelco División El Teniente el cual fue caracterizado previo a su uso. Con plantas de *V. zizanioides* se implementó un sistema batch mediante cultivo hidropónico disponiendo un grupo de plantas en una solución nutritiva y otro grupo en el RIL bajo un régimen de luz de 14:10 h luz/ oscuridad. A partir de tiempo cero y cada 15 días se realizaron evaluaciones de pH, temperatura, potencial de oxido reducción, sólidos totales y oxígeno disuelto mediante una sonda multiparamétrica para calidad del agua (HANNA HI-9828). El análisis de ácidos orgánicos se realizó en plantas de *P. australis* tratadas por 72 h con solución sintética de sulfato de Cu, 15 mM. Se tomaron muestras de la solución y de las plantas cada 24 h, las que fueron analizadas mediante cromatografía iónica de exclusión (cromatógrafo LabCHROM, columna Aminex, HPX-87H, Biorad). El contenido de metales en el tejido vegetal fue analizado mediante Espectroscopía de Absorción Atómica modelo Thermo 5000 y de Emisión Atómica, ICP óptico Óptica 2000

Los resultados preliminares obtenidos no mostraron variación significativa en los parámetros fisicoquímicos medidos en el RIL. *V. zizanioides* no mostró condiciones

favorables en la absorción de metales, excepto para Cu. Al final del tratamiento, la planta presentó un contenido de Cu de 56 µg peso fresco en hojas y 46,9 µg peso fresco en raíces. La tasa de absorción global fue de 4,9 g de Cu /día. Los ensayos de exudación de ácidos orgánicos, utilizando la especie *P. australis* mostraron la presencia de: ácido oxálico, málico y oxámico en concentraciones máximas de 0,984 mg L⁻¹, 2,03 mg L⁻¹ y 0,152 mg L⁻¹, respectivamente, observándose un aumento en el tiempo para los ácidos oxálico y málico.

Se concluye que en condiciones favorables de disponibilidad de metales *V. zizanioides* sólo incorpora Cu en sus tejidos en el tiempo, a diferencia de la especie *P. australis* cuyo mecanismo de incorporación de metales involucraría exudación de ácidos orgánicos.

ABSTRACT

Environmental issues in development of new techniques of mining wastewater treatment with less environmental impact and more efficient, we have studied the use of plants as a means to decontaminate through phytoremediation. The aim of this study was to quantify the sorption of some heavy metals in a mining RIL and study a possible mechanism by which the plant solubilized metal species present in particulate matter oozing sIL some organic acids.

In this study we used the plant *V. zizanioides* and *P. australis*, for treatment was used RIL Adit 71, from Codelco El Teniente division which was characterized prior to used. Plants of *V. zizanioides* a batch system was implemented by having a group hydroponic cultivation of plants in a nutrient solution and another group in the RIL under a light regime of 14:10 ,h light /darkness. From time zero and every 15 days evaluations of pH, temperature, redox potential reduction, total solids and dissolved oxygen using a multiparameter probe for water quality (HANNA HI-9828). Organic acid analysis was performed on plants of *P. australis* treated for 72 h with solution containing copper sulfate, 15 mM. Samples were taken from the solution and the plants every 24 h. Which were analyzed by ion exclusion chromatography (GC LABCHROM, column Aminex, HPX-87H, Biorad). The metal content in plant tissue was analyzed by Atomic Absorption Spectroscopy Thermo Spectrophotometer 5000 and atomic emission, ICP optical 2000 .

Preliminary results showed no significant variation in physicochemical parameters measured in the RIL. *V. zizanioides* favorable conditions showed no absorption of metals, except copper. After treatment, the plant had a copper content of 56 µg fresh weight in leaves and 46.9 µg fresh weight in roots. The overall absorption rate was 4.9 g of copper per day. Tests exudation of organic acids, using the species *P.*

australis showed the presence of: oxalic acid, malic acid and oxamic maximum concentrations of 0.984 mg/L^{-1} , 0.152 mg/L^{-1} and 2.03 mg/L^{-1} , respectively, with an increase in time for oxalic acid and malic acid.

We conclude that under favorable conditions of metal availability *V. zizaniodes* only incorporates copper in their tissues over time, unlike *P. australis* which mechanism would involve incorporation of metal organic acid exudation.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos Generales.

Una de las actividades económicas más importantes en nuestro país es la minería la que ha sido por varios años uno de los principales sustentos para el desarrollo, Chile se ha convertido en uno de los productores mundiales más importantes en el rubro de la minería, la que principalmente ha explotado minerales de Yodo, Litio y Cobre, presentes en un extenso territorio del país. (A. Errazuriz K, 2000).

Sin embargo el desarrollo minero lleva consigo un deterioro ambiental donde se afectan los diferentes componentes del medio ambiente ya sea aire, suelo y agua siendo suelos y aguas los ambientes que se ven más afectados por causas de los residuos líquidos o RILes. Los RILes son producidos en sus diferentes procesos que incluye tanto procesos de lavado de maquinas como la aplicación de productos químicos para lixiviación.

Los RILes mineros causan grandes problemas ambientales debido a su alto potencial de contaminación de los recursos hídricos superficiales o subterráneos. Éstos se caracterizan por sus bajos valores de pH y elevadas concentraciones de iones inorgánicos tóxicos. (L.Codorin y col, 2007). Otros de los contenidos de los RILes que pueden ser causal de contaminación son la presencia de diferentes metales pesados, entre los más perjudiciales se podrían considerar Cr, Hg, Zn, Pb, As y Sb al (no son esenciales) además, de otros metales, tales como, Cu, Mo y Fe. Estos metales pueden afectar cursos de ríos, lagos, aguas subterráneas, vegetación debido a su toxicidad y también al ser humano, donde la vía más común, es por consumo de especies vegetales contaminadas y animales capaces de absorber estos metales.

La extracción minera además, ha contribuido al deterioro de suelos los cuales debido a la contaminación por metales pesados han adquirido limitaciones físicas, químicas y biológicas para el establecimiento de vegetación. (S. Puga y col, 2006).

Como consecuencia de lo anterior, los RILes mineros son tratados para disminuir sus concentraciones de elementos potencialmente contaminantes. En general los tratamientos utilizados para mitigar las especies contaminantes, corresponden a la aplicación de procesos químicos y mecánicos, que utilizan reactivos para inducir la ruptura del compuesto químico mediante una reacción tipo oxido-reducción y/o de precipitación del contaminante que generalmente va acompañado de un cambio de pH para favorecer el proceso. Para la precipitación de metales pesados, generalmente se favorece la formación de Hidróxidos o de Sulfuros insolubles a pH alcalino. Se utiliza cal debido a su bajo costo, a pesar que tiende a formar un mayor volumen de precipitado, lo que puede producir un encarecimiento en el manejo y disposición de los sólidos. Una vez acondicionado químicamente el efluente, se procede a separar el contaminante, que generalmente es extraído de la fase líquida al quedar retenido en un sólido el que es finalmente separado mediante procesos mecánicos de sedimentación y/o filtración, ayudado por floculantes que aceleran el proceso de separación. Este sistema también se utiliza de manera específica cuando se desea recuperar algún elemento de valor como Cu. También un mecanismo muy común usado en la minera es el establecimiento de relaves mineros que consisten en grandes excavaciones de terrenos en donde se disponen los RILes y se dejan secar al aire libre, siendo este un proceso con alto potencial contaminante ya sea por rebalse o filtraciones subterráneas.

El problema del tratamiento químico radica en que a pesar de ser de bajo costo, las grandes cantidades de residuos sólidos que se generan conllevan a otro problema ambiental debido a que se deben disponer en otros lugares para su almacenamiento. Una alternativa de tratamiento de RILes que últimamente ha sido tema de diferentes estudios es mediante la fitorremediación.

La fitorremediación consiste en la utilización de especies vegetales resistentes a altas concentraciones de metales pesados, “empleo de vegetación para el tratamiento de suelos, sedimentos y aguas contaminadas” (A. Mentaberry, 2009). Estas especies vegetales pueden estabilizar física, química y biológicamente residuos ricos en metales como lo son los relaves mineros, creando ecosistemas vegetales funcionales y autosustentables en largo plazo. Esto es una óptima solución para residuos mineros, considerando su bajo costo y facilidad de mantención. Sin embargo este tratamiento no está exento de problemas, uno de éstos es encontrar plantas óptimas que sean altamente resistentes y puedan sostenerse con vida en un tiempo prolongado, ya que la muerte de éstas contaminaría nuevamente. Por otro lado, existe la complejidad de que estas plantas sólo tengan la capacidad de absorber ciertos metales específicos haciendo que el tratamiento sea lento, debido a su capacidad de retención de un metal. Parte de los estudios del último tiempo están enfocados en encontrar y resolver los problemas antes mencionados.

En un concepto general, la fitorremediación entra en lo denominado tecnología “wetland”, que considera la utilización de humedales artificiales para la neutralización del pH y la disminución de parámetros como metales y sulfatos. Los estudios relacionados con la fitorremediación se asocian a la obtención de un sistema de tratamiento definitivo el cual sea autosustentable en el tiempo

generando ecosistemas artificiales. Los vegetales absorben especies químicas, por lo tanto, hay que considerar varios factores que pueden interferir en estos procesos como por ejemplo: el pH, CIC, Potencial de oxidación y reducción, Conductividad.

La disponibilidad del metal depende del estado de especiación en que se encuentre en el RIL. Los metales pueden estar en la fase soluble (ión) y en la fase insoluble como, óxidos, sulfuros o constituyendo la parte insoluble de un sedimento.

La absorción de metales por una especie vegetal, además puede ser beneficiada por la exudación natural de ácidos orgánicos (ácido acético, málico y cítrico) por parte de las raíces. Los ácidos orgánicos producidos en la interfaz suelo-raíz o rizósfera pueden desempeñar un papel importante en la movilización y biodisponibilidad de Cd por plantas, debido a la disminución de pH y a la formación de complejos metal-ligando, siendo este un proceso que podría ocurrir con diferentes metales (E.Gidarkos & A. Giannis,2006).

Considerando el método de fitorremediación como una alternativa para la mitigación de metales pesados presentes en relaves mineros, en este trabajo, se implementó un sistema modelo tipo "wetland" artificial. Se utilizó relave, un RIL minero denominado Adit 71 proveniente del proceso de barrenadora, lavado de equipo y aguas servidas, y una especie vegetal. Se utilizaron diferentes plantas, que han demostrado la capacidad de vivir en ambientes adversos como tranques de relaves, que corresponden a ambientes con un alto potencial tóxico. Entre estas plantas están la *P. australis* y *Triticum aestivum* (Trigo).

Además se implementó y validó un método analítico para determinar la presencia y concentración de ácidos orgánicos que tendrían un rol importante en la absorción de metales.

1.2. Glosario.

1.2.1. Relaves: Son desechos tóxicos subproductos de procesos mineros y concentración de minerales, usualmente una mezcla de tierra, minerales, agua y rocas.

1.2.2. RIL: Los residuos industriales líquidos son aguas de desecho generadas en establecimientos industriales como resultado de un proceso, actividad o servicio. Las descargas de residuos industriales líquidos se caracterizan por contener elevadas concentraciones de elementos contaminantes. Los efectos que podrían provocar los RILes pueden variar según el punto en donde éstos sean descargados.

1.2.3. RIL de Estudio: Corresponde a RIL Adit 71 proveniente de minera Codelco División Teniente, el cual posee características representativas de los RILes mineros, tales como:

- pH con carácter ácido = 5,22
- Eh = 258 mV (Oxidante)
- Altos niveles de metaloides y metales pesados, al igual que de sulfatos.

1.2.4. Metales Pesados: Se refiere a todo elemento químico que tenga una densidad relativamente alta y que sea tóxico o venenoso en concentraciones pequeñas. Sus pesos atómicos están entre 63.546 y 200.590.

Ejemplos de metales no esenciales: mercurio (Hg), cadmio, (Cd), arsénico (As), cromo (Cr), talio (Tl), y plomo (Pb).

Ejemplos de metales traza: cobalto (Co), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), vanadio (V), selenio (Se), y zinc (Zn)

Para la remediación de metales pesados, el uso de plantas hiperacumuladoras puede aumentar la captación de metales, ya ellas son capaces de acumular 100 veces más que las plantas no acumuladoras (M. M. Lasat y col, 1996).

1.2.5. Fitorremediación: Es un conjunto de métodos para asimilar, metabolizar o detoxificar metales pesados, compuestos orgánicos, radioactivos y petroderivados por medio de la utilización de plantas. Este es un método que no utiliza químicos ni afecta la estructura de los suelos ya que se espera que todo el proceso sea de forma natural, las proyecciones de estudios relacionados con la fitorremediación tienen como finalidad llegar a elaborar un sistema que sea autosustentable.

1.2.6. Plantas utilizadas para Fitorremediación: Para una fitorremediación exitosa, la selección de plantas es un desafío importante. Es necesario utilizar especies y variedades de plantas que toleren altos niveles de contaminantes tóxicos y que sean adecuadas para las condiciones climáticas en la región de los sitios contaminados. Las plantas deben tener la resistencia adecuada a enfermedades,

insectos, sequías, inundaciones y productos químicos para maximizar su éxito de supervivencia y biomasa considerando los tiempos de vida que estas tengan. (N. Roongtanakiat, 2000).

Estudios de I. E. Marjorie Reyes, 2006, ha recopilado una variedad de plantas que presentan características favorables para fitorremediación, algunas de estas plantas son:

- ***Astragalus mollissimus***. De la familia *Fabaceae* es una hierba anual considerada tóxica para el ganado e invasora. Comúnmente conocida como hierba loca.
- ***Baccharis wrightii***. De la familia *Asteraceae*, arbusto o sub-arbusto perenne, nativo de Estados Unidos de Norteamérica.
- ***Lepidium virginicum***. Pertenece a la familia *Brassicaceae*, comúnmente llamada ajonjolillo Es una herbácea, anual, bianual o perenne .
- ***Asphodelus fistulosus***. Hierba perenne hasta de 65 cm de altura, pertenece a la familia *Liliaceae*, especie introducida en México y Estados Unidos .
- ***Conyza coulteri***. Pertenece a la familia *Asteraceae*. Herbácea anual. Clasificada como tóxica para el ganado.
- ***Cirsium undulatum***. De la familia *Asteraceae*. Es una herbácea bianual perenne.
- ***Rhus aromatica***. Arbusto perenne.

1.2.7. *Vetiveria zizanioides*: Es una Gramínea perenne de desarrollo rápido y muy adaptable. Es originaria de zonas pantanosas de la India y su género consta de diez o doce especies, debido a su singularidades morfológicas y fisiológicas es útil en el control de la erosión y los sedimentos es tolerante a concentraciones elevadas de metales pesados, bajas temperaturas y medios de acidez alta. Estudios demuestran claramente que pese a las condiciones climáticas y a la ausencia casi total de riego la planta Vetiver puede crecer bajo condiciones extremadamente hostiles en tranques de relave ácidos pH = 4,4. (R. Fonseca y col, 2009)

Además esta planta sería acumuladora de metales en un RIL minero (Ortiz y col., 2008)

1.2.8. *Polypogon australis*: Nativa de Chile y Argentina que pertenece a la familia Poaceae, se le conoce vulgarmente con el nombre de Cola de Ratón, Es una Gramínea que tienen características que pueden ser favorables para usarlas en fitorremediación, tales como resistencia a climas adversos, pueden desarrollarse en escasez de agua, y además siendo uno de los puntos más importante, es que estudios muestra que tienen una buena capacidad de absorber metales.

La planta *P. australis* puede considerarse como una especie pseudometalófila acumuladora de ciertos elementos como hierro, manganeso, zinc y cromo, por su capacidad de sobrevivir en sustratos con alto nivel de toxicidad para estos metales; y para el caso del Cu podría ser considerada hiperacumuladora, debido a que pasó el umbral de tolerancia para este elemento (I. Marin & M. Morales, 2006).

1.2.9. *Triticum aestivum*: Planta denominada comúnmente como trigo, ha sido cultivada por miles de años, herbácea que puede alcanzar 1,2 m de altura. También presenta características de adaptación a diferentes climas y a medios extremos.

1.2.10. Rizósfera: La rizósfera es la zona de límite o interfase entre el suelo y la planta y se puede extender 1 a 4 mm, tiene propiedades químicas (inclusive físicas) diferencias en pH asociadas con la liberación de H^+ o de HCO_3^- por actividad metabólica, diferencias en la concentración de iones (Conductividad Eléctrica.), diferencias en el potencial de óxido-reducción debido al consumo o liberación de O_2 y a la exudación de sustancias orgánicas.

1.2.11. Ácidos Radiculares: Por exudados radiculares se entiende todos aquellos compuestos orgánicos, liberados al medio por raíces de plantas sanas e intactas (A. Rovira, 1969).

1.3. Hipótesis.

La fitorremediación podría ser una alternativa viable como tratamiento de RILes mineros, considerando su alta eficiencia de absorción de metales pesados, su resistencia a altas concentraciones y sus posibles mecanismos de absorción relacionados con ácidos orgánicos de exudados.

1.4. Objetivos.

1.4.1. Objetivo General.

Estudiar la absorción de algunos de los metales pesados con potencial contaminante (Cr, Cu, Zn, Pb, As, Mn) presentes en RILes mineros, y su relación con la exudación de ácidos orgánicos.

1.4.2. Objetivo Específicos.

1. Desarrollar y aplicar métodos analíticos para determinar metales en el agua y en tejido vegetal.
2. Cuantificar la absorción del metal selectivamente y cuantitativamente en *V. zizanioides*
3. Estudiar mecanismos de solubilidad de los metales (parámetros).
4. Determinar posibles influencias en los mecanismos de absorción, de los diferentes ácidos exudados de las plantas *V. zizanioides*, *P. australis* y *T. aestivum*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Implementación de Sistema de Cultivo (Batch) .

Materiales:

- Plantas *V. zizanioides*. (vivero)
- RIL Adit 71.(El Teniente)
- 2 cubetas plásticas volumen 5 L
- Poliestireno.
- Agua destilada
- Nutriente (Phostrogen,Plant Flood,Ingland.)

2.1.1. Método de implementación de Cultivo.

1. Se recopilan 14 plantas previamente cultivadas, en un estado de crecimiento aproximado de 4 semanas de una longitud de 20 cm.
2. En la primera cubeta (Cubeta Control) se agregan 2 L de agua desionizada y 0,6 g de fostrogen (contenido ver ANEXO IX), luego se disponen 7 plantas sobre el poliestireno y se colocan sobre el agua con las raíces sumergidas.
3. Se dejan bajo un régimen de luz 14 h :10 h , Luz:Oscuridad.
4. En la segunda cubeta se sigue el mismo procedimiento anterior, agregando 2 L de RIL Adit 71.
5. Se determinan los parámetros fisicoquímicos semanalmente controlando el volumen perdido por evaporación y reponiéndolo.

2.3. Tratamiento de la Muestra.

Materiales:

- Papel filtro 0,45 μm , (Whatman)
- Desecadora
- Agua destilada.
- Horno "BTL"

2.3.1 Extracción de muestras.

1. Se toman muestras al inicio del tratamiento (T_0), una planta por cubeta.
2. Después de 15 días (T_1) de tratamiento se recopilan muestras de plantas de la cubeta con nutriente y con RIL nuevamente. Se siguen los mismos procedimientos hasta los 45 días (T_2).
3. Las muestras de plantas se lavan con agua ultrapura, se secan sobre papel filtro y se dejan en una desecadora durante dos días.
4. Luego de 2 días en la desecadora se dejan 4 días en horno secando a 35-40 °C aproximadamente.
5. Una vez secadas las muestras son masadas y se disgregan con nitrógeno líquido, luego se guardan en bolsas plásticas para posteriormente llevar a proceso de digestión ácida.

2.3.2. Digestión de la Muestra Vegetal.

Materiales:

- Bombas de digestión marca "Parr"
- HNO₃ 65 % ultrapuro ,(Merck)
- Balanza Analítica (Mettler AC 100)
- Horno "BTL"

Procedimiento de digestión.

1. Se masó 0,1 g de cada muestra y se agregan al vaso de teflón de la bomba.
2. Se añaden 5 mL HNO₃
3. Se lleva a 120 °C durante 4 h.
4. Se deja enfriar a temperatura ambiente, finalmente diluir la muestra en un matraz de 10 mL para su posterior análisis por ICP marca Perkin Elmer, modelo Optima 2000.

2.3.3. Determinación de Metales.

La determinación de la masa de metal absorbido por la planta, se realizo usando 2 técnicas, Absorción Atómica con llama y Emisión atómica, ICP.

Los metales analizados fueron Cu, Mn, Zn, Cd, As usando el método de curva de calibración.

Materiales:

- Espectrofotómetro de Emisión Atómica ICP marca Perkin Elmer modelo Óptima 2000.
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Thermo modelo 5000

Los rangos de concentración máximos y mínimos usados en las curvas de calibración se establecieron de acuerdo a la concentración total en el RIL.

2.4. Sistema de extracción de ácidos exudados.

Materiales.

- Tubos de Ensayo.
- Agua calidad ultrapura
- CuSO_4 MERCK
- RIL Adit 71(El Teniente)
- Luz Artificial
- Cámara de cultivo (Grow gabineth rgx-250)

2.4.1. Elaboración del sistema extracción.

1. Se disponen 2 tubos de 10 mL, y se agrega la solución de manera tal de cubrir las raíces 5 mL aproximados, de acuerdo a modificación de método descrito por (C. Barbas y col. 1999)

2. Se disponen 3 plantas en el tubo, de manera que las raíces queden cubiertas con el agua desionizada en su totalidad. La cantidad de plantas pueden ser mayor dependiendo de su tamaño.
3. Se sigue el mismo procedimiento para el RIL Adit 71 y solución CuSO_4 15 μM .
4. Se disponen a temperatura ambiente 25 ± 2 °C, bajo un régimen de 14:10 ,14 h luz y 10 h oscuridad, en una cámara de cultivo.
5. El sistema de cultivo se mantiene durante 3 días.
6. El sistema se hace por duplicado.

2.5 Tratamiento de la Muestra.

2.5.1. Obtención de la muestra.

1. Se obtienen muestras en 4 tiempos diferentes. (0 h, 24 h , 48 h , y 72 h)
2. Se extrae 1mL de solución donde están dispuestas las plantas en cada tiempo.
3. Las muestras se guardan en refrigerador para su posterior análisis químico.

2.5.2. Determinación de Ácidos Orgánicos.

Materiales.

- Cromatografo HPLC. (LaChrom)
- Fase móvil: Acido Sulfúrico 0,004 M
- Columna Aminex HPX-87H
- Estándares de acido oxámico , málico, oxámico y acético de grado analítico obtenidos de Sigma-Aldrich.
- Filtro Whatman (0,45 μm)
- Tubos Eppendorf

Determinación de ácidos orgánicos en exudados de plantas.

1. Las 4 muestras del líquido sobrenadante del sistema planta se filtran en membrana de tamaño 0,45 μm (Whatman), se disponen en tubos Eppendorf y se inyectan al Cromatografo HPLC.
2. La cuantificación y separación de los ácidos orgánicos se realizó mediante cromatografía HPLC de exclusión iónica. Se dispuso de una columna Aminex HPX-87H de 20 cm. La fase móvil que se utilizó fue H_2SO_4 0,4 M.
3. La cuantificación se realizó a una longitud UV de 210 nm y el flujo de la fase móvil fue de 0,6 mL/ min.
4. La identificación y cuantificación se realizó en función de los tiempos de retención (tr) de las soluciones de ácidos estándares y mediante curvas de calibración.(ANEXO XI)
5. Los estándares utilizados todos son de grado analítico.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Sistema de Cultivo Batch: Observaciones

En el trabajo desarrollado las plantas tenían un cultivo previo de un mes de crecimiento aproximadamente y se encontraban con características saludables, como buen tamaño de hojas y gran cantidad de raíces. Las condiciones se optimizaron dentro de lo posible en el laboratorio, siguiendo un régimen de 14:10, Luz: Oscuridad el cual a pesar de no ser el óptimo en cuanto a la intensidad no fue mayor inconveniente, ya que los cultivos en el nutriente y control no mostraron ningún tipo de deterioro, con un crecimiento normal y de aspecto saludable hasta el final de tratamiento. Sólo al final se observó un indicio de contaminación de algas generado posiblemente por circunstancias naturales del cultivo o por algún tipo de contaminación de otros experimentos, efecto que solo se pudo manejar manteniendo constante observación y vigilancia ya que no era posible incorporar sustancias extras que alterarían el experimento. La utilización de una solución control con nutriente fostrogen fue para asegurar el crecimiento de estas y que no se deterioraran antes del final de experimento.

El sistema de cultivo fue hidropónico ya que este trabajo está centrado esencialmente en el tratamiento de residuos industriales líquidos, en este caso proveniente de la minería. El estudio se enfoca en la prevención de posibles contaminaciones que puedan derivar de estos RILes hacia suelos o cursos de agua , aplicándolo en la etapa de tratamiento, para que estos posteriormente puedan ser derivados al medio ambiente sin causar problemas ambientales.

Luego de 7 días de cultivo las plantas dispuestas en RIL mostraron cambios en su aspecto, como coloración café y reducción de tamaño. No obstante las plantas

dispuestas en la solución control se mostraron de buen aspecto y crecimiento durante todo el experimento. El cambio de coloración de las plantas y deterioro al comienzo del tratamiento indicaría que la planta *V. zizanioides* tendría una capacidad limitada de resistencia a medios acuosos con altas concentraciones de metales pesados, como los son los RILes utilizados. Se observó además un deterioro mayor hojas, no así en las raíces las cuales se mostraron en buenas condiciones al final del cultivo.

Para lograr completar el experimento se optó por sacar las muestras cada 7 días, de manera que éstas puedan resistir todo el tratamiento y evitar un deterioro temprano. En este periodo mantuvieron su aspecto y no existe presencia de plantas muertas o en descomposición, el tratamiento completo se realizó en 21 días.

El volumen de RIL y solución control donde se cultivaron las plantas descendió para ambos casos en 80 mL aproximados cada 7 días, esta pérdida fue repuesta con agua destilada conservando el volumen total.

La capacidad de las plantas para resistir a estos medios adversos puede depender de diferentes factores, tales como su estado de crecimiento, volumen de solución en que se cultiva, régimen de luz, metabolismo natural de la planta, entre otros.

3.2. Parámetros Físicoquímicos.

Cada 7 días se determinaron los parámetros físicoquímicos del medio, en el cual se encuentran las plantas ya sea RIL Adit 71 y solución control. Los resultados obtenidos para los siguientes parámetros fueron

3.2.1. Temperatura.

La Figura 1 muestra la variación de la temperatura durante el tiempo de muestreo. Se observó un promedio de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura.

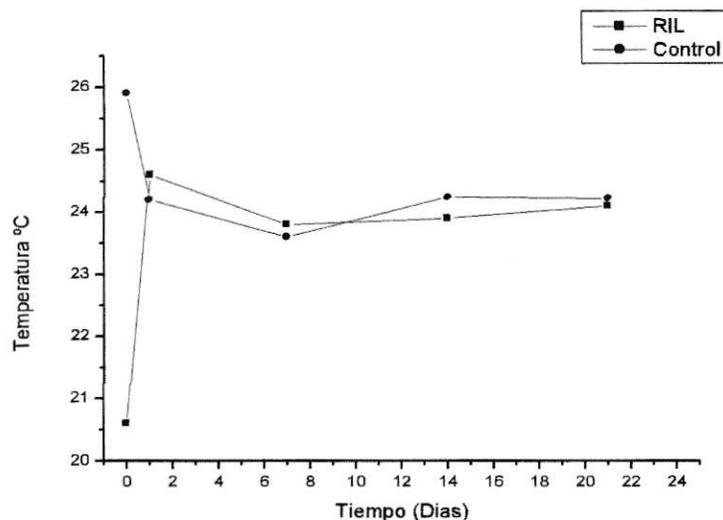


Figura 1: Variación de la temperatura en el periodo de cultivo.

Al inicio las temperaturas del RIL y de la solución control eran diferentes previamente a la implementación del sistema. Esta diferencia se debe a los diferentes lugares en que se almacena el RIL como el agua. Una vez implementado el sistema ocurre una estabilización o ambientación de ambos, quedando en rangos de temperatura similares. La temperatura del RIL Adit 71 y solución control de los cultivos durante todo el proceso mostraron una variación entre $20,5^\circ\text{C}$ y $24,5^\circ\text{C}$ en ambos casos manteniéndose relativamente constante en ese rango como se observa en la Figura 1.

3.2.2. Sólidos Totales.

La Figura 2 muestra la variación de sólidos totales durante el periodo de muestreo. Se observó que en el RIL la concentración de sólidos totales es 6 veces mayor a los medidos en la solución control. Sin embargo la concentración de sólidos en ambos casos se mantiene relativamente constante lo que se observa en la figura 2.

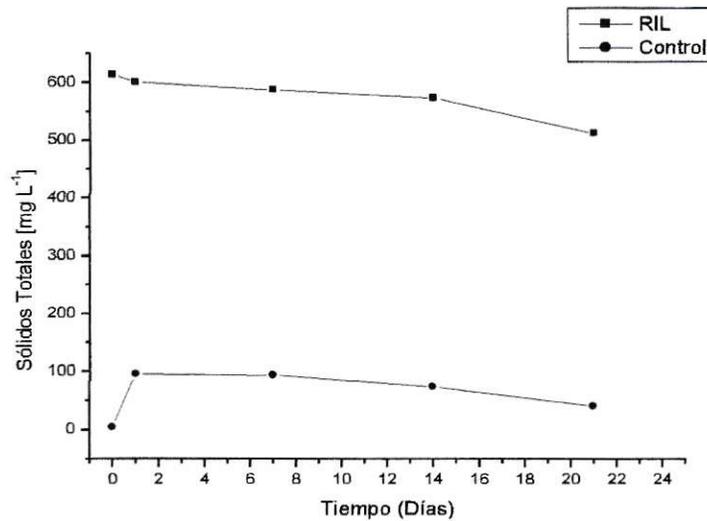


Figura 2: Variación de sólidos totales durante el periodo de cultivo.

Una de las ventajas al utilizar un sistema hidropónico es que se disminuyen variables que afectan la absorción de metales, una de estas podría ser la baja presencia de sólidos, al presentar bajas concentraciones de sólidos, se puede indicar que no hay una capacidad de intercambio catiónico alta, por lo que los metales estarían disponibles y no adsorbidos o retenidos en esos sólidos en su mayoría, al contrario como podría ocurrir en un sistema suelo-líquido en donde este factor sería mayor.

Como se observa en la figura 2, los sólidos totales en el RIL están en el rango de 620 y 540 mg L⁻¹ y para la solución control se mantuvo prácticamente constante en 100 mg L⁻¹. Además, se observó leve disminución de la concentración durante el tiempo de tratamiento aunque en una baja proporción, asociada a la decantación de éstos en los 21 días de cultivo.

3.2.3. Conductividad Eléctrica.

La Figura 3 muestra la variación de la conductividad donde se observa un promedio de 2,7 mS/cm para el RIL. A los 21 días se observa una leve disminución en ambas soluciones.

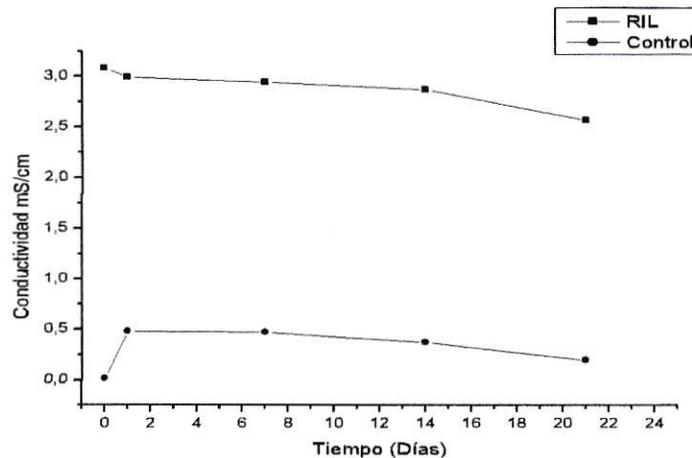


Figura 3: Variación de conductividad eléctrica durante el periodo de cultivo.

La conductividad para ambos casos estudiados, RIL y control, son relativamente constantes, mostrando una leve baja, comportamiento similar al de los sólidos totales. Por otro lado la conductividad es casi 3 veces mayor en el RIL: 3,0 mS/cm con respecto al control: 0,5 mS/cm. Esto indica que la movilidad de iones en el RIL, por ejemplo los cationes que están presentes.

3.2.4. Potencial Oxido-Reducción.

La Figura 4 muestra un promedio de 300 mV. Sin embargo a los 15 días el ambiente se hace reductor.

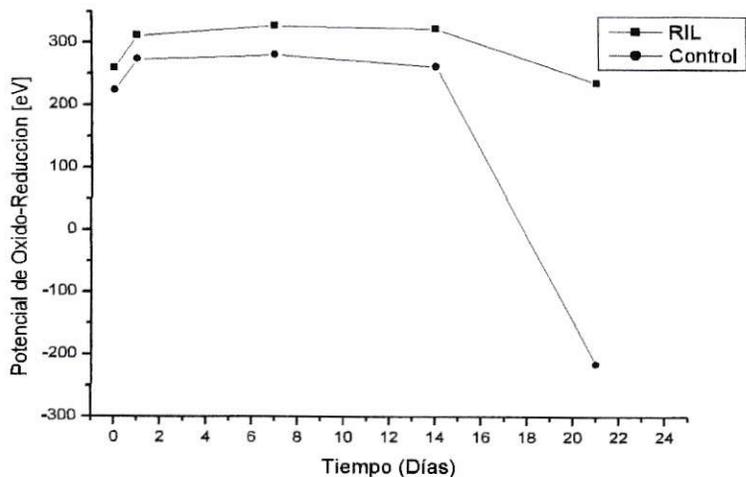


Figura 4: Variación del Potencial Oxido-Reducción durante el período de cultivo.

Al momento de la implementación del sistema de cultivo hubo una leve alza en el potencial para el RIL como el Control. Luego en los 21 días se mantiene constante con una leve tendencia a disminuir. El último día se observa un cambio brusco asociado a una posible contaminación por micro algas generando un ambiente reductor, efecto que ocurre de manera más notoria en el control como se observa en la figura 4. Por otro lado en el RIL existe una baja, pero de menor intensidad lo que se puede explicar por la dificultad de que proliferen ciertos microorganismos en un medio concentrado con metales pesados, aun así existe cierta proliferación de algas.

El potencial redox es uno de los parámetros más importantes a la hora de definir qué tipo de compuestos o estado de especiación hay en el medio, un ambiente reductor sería el más favorable para lograr mayor absorción de metales. El trabajo mostró

condiciones oxidantes durante todo el período a excepción de los últimos 7 días. Sin embargo la especiación también está ligada al pH de la solución, donde las peores condiciones serían tener un pH básico y potencial oxidante, medio en el cual la mayoría de los metales precipitaría debido a formación de diferentes óxidos.

3.2.5.pH.

La Figura 5 muestra la variación pH durante el tiempo de muestreo. Se observó un rango de pH ácido aproximado de 5 para ambas soluciones.

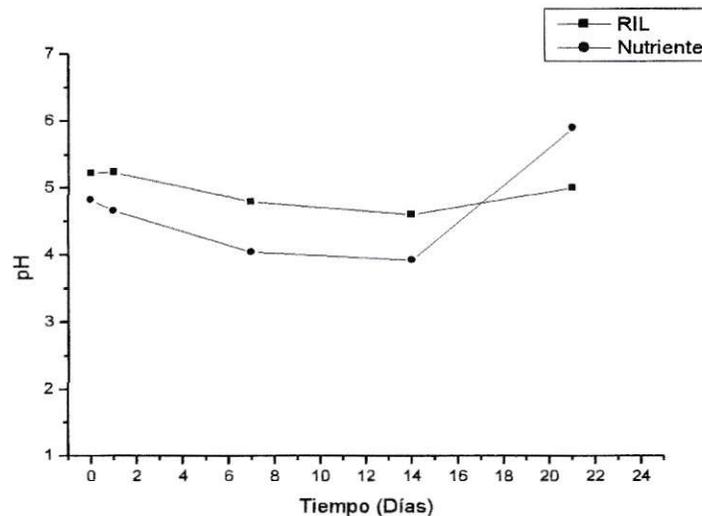


Figura 5: Variación del pH durante el período de cultivo.

La Figura 5 muestra que el sistema con RIL siempre estuvo en un nivel de pH levemente mayor que la solución nutriente. La variación de pH fue disminuyendo hasta los primeros 15 días. En el día 21 el pH sube de manera brusca especialmente para el nutriente influenciado por la presencia de materia orgánica o micro algas desarrolladas en los últimos días de tratamiento. La disminución de pH posiblemente se relaciona con la exudación de ácidos orgánicos generados por las plantas que son

ácidos débiles que pueden influir en un cambio menor, de no más de 1 unidad de pH, el cambio de pH en el nutriente es mayor pasó de un pH de 4,8 a 3,9 por otro lado el RIL tuvo una variación de 5,2 a 4,9 durante los primeros días. Estos cambios favorecerían la movilidad de los metales (cationes) y su absorción.

De acuerdo a diagramas Eh v/s pH (N.Takeno,2005), las condiciones ácidas del medio y oxidantes son favorables para la especiación de todos los metales analizados, mostrando estados de oxidación que los hacen disponibles y móviles.

3.2.6. Oxígeno Disuelto

La Figura 6 muestra la variación del oxígeno disuelto se observa una disminución en el RIL desde 7mg L^{-1} a $0,05\text{mg L}^{-1}$, en el Control de $3,5\text{mg L}^{-1}$ a $0,03\text{mg L}^{-1}$.

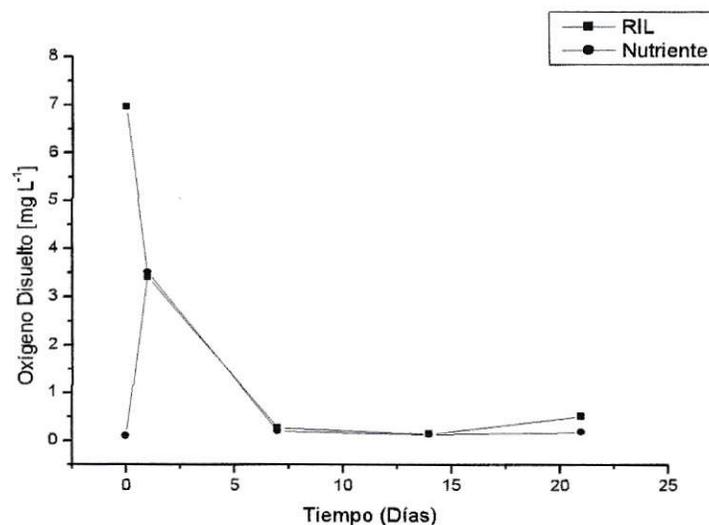


Figura 6: Variación del oxígeno disuelto durante el periodo de cultivo.

El oxígeno en un comienzo para la solución control aumenta mientras que para el RIL baja quedando finalmente a concentración similar. La variación en los siguientes días

fue en la misma proporción para ambos. Esto podría estar asociado a la presencia de biomasa y temperatura ambiente.

En la Tabla 1 se resume la variación de los parámetros medido durante el tiempo de muestreo.

Tabla 1: Resumen de variación de parámetros fisicoquímicos durante los 21 días de cultivo en RIL Adit 71.

Parámetro	RIL Adit 71
Temperatura	20 – 24 °C
Oxígeno Disuelto	7 – 0,9 mg L ⁻¹
Sólidos Totales	620-540 mg L ⁻¹
Conductividad	3,2 – 2,6 mS/cm
Potencial de Oxido Reducción	250 – 240 mV
pH	5,2 – 4,9

En términos generales como se observa en la Tabla 1 los parámetros fisicoquímicos analizados durante los 21 días de tratamiento estuvieron dentro del rango óptimo, en el sentido de que las condiciones fueron favorables para la absorción de metales pesados en el RIL Adit 71.

Los parámetros analizados en la solución control no mostraron mayores diferencias, con respecto a las del RIL Adit 71.

3.3. Masas Secas obtenidas por cada muestra.

Las masas secas obtenidas de las muestras son mayores en el Control con respecto a las del RIL. Como se indica en las siguientes Tablas 2 y 3.

Tabla 2: Masa seca total de las plantas extraídas del RIL en días de muestreo.

Muestra	Día	Cantidad de Plantas	Masa Seca Total(g)
T ₀	0	1	1,05
T ₁	7	2	0,94
T ₂	14	2	0,87
T ₃	21	2	1,4

Detalles. Ver Anexo I

Tabla 3: Masa seca total de las plantas extraídas del control en días de muestreo.

Muestra	Día	Cantidad de Plantas	Masa Seca Total(g)
T ₀	0	1	0,87
T ₁	7	2	1,72
T ₂	14	2	3,56
T ₃	21	2	3,3

Detalles. Ver Anexo I

La masa seca obtenida de las muestras en el RIL Adit 71 que se detallan en la Tabla 2, es menor con respecto a las obtenidas en la solución control como se observa en la Tabla 3. La diferencia entre las masas se debe a que las plantas en la solución control crecieron en mejores condiciones por lo que aumentaron su masa en el transcurso del experimento, no así las plantas en el RIL las que se mantuvieron de un tamaño similar durante todo el tratamiento , manteniendo su masa.

El tamaño inicial para todas las plantas fue de 20 cm de tamaño de hoja. Al término las plantas en la solución control mostraron tamaño entre los 30 y 40 cm de hojas, lo que no ocurrió con las dispuestas en RIL, las que se mantuvieron relativamente con el

mismo tamaño inicial .Las raíces se observaron de un tamaño similar al inicio y término de tratamiento para todas las plantas sin mostrar alguna variación significativa.

3.4. Análisis de concentraciones de metales pesados en el RIL Adit 71.

Las curvas de calibración se elaboraron con una solución estándar multielemental con el objetivo de simular los metales en el RIL. Para los rangos en mg L^{-1} se usó la Espectroscopía de Absorción Atómica, (Cu y Al), para rangos en μL^{-1} ,se usó la Espectroscopía de Emisión Atómica dada su mayor sensibilidad. El Arsénico se midió con atomización por generador de hidruros.

3.5. Concentraciones de Metales Pesados en RIL Adit 71 previo a la implementación del sistema de cultivo. Obtenidos por ICP y AA.

La tabla 4 muestra los resultados en el análisis químico del RIL, obtenidos en el laboratorio.

Tabla 4: Concentración de Metales RIL Adit 71 antes del cultivo.

Metales	Concentración
Zn	5,77 mg L^{-1}
Pb	0,13 $\mu\text{g L}^{-1}$
As	0,65 $\mu\text{g L}^{-1**}$
Mn	14,5 mg L^{-1}
Cd	462 $\mu\text{g L}^{-1}$
Cu ¹	150 mg L^{-1*}
Ni	119 $\mu\text{g L}^{-1}$
Al	no detectado*

*Absorción Atómica

**Generador de Hidruros

¹Muestra diluida en F=10

Los resultados obtenidos en el RIL Adit 71 Tabla 4, muestran similitud en sus rangos de concentración (Cu, Mn, Ni, Zn) con los obtenidos previamente en laboratorio Hidrolab (ver ANEXO X). Las concentraciones obtenidas para Pb, As, Cd, Al, fueron diferentes a los realizado por el laboratorio Hidrolab. No obstante el análisis en las plantas se hizo para todos los metales.

Este análisis se hizo con la finalidad de conocer las concentraciones de metales al momento de estudio.

3.6. Absorción de Metales Pesados por *Especie V. zizanioides*.

Transcurrido los 21 días de cultivo se determinaron los metales de las muestras de plantas extraídas cada 7 días.

Los elementos Zn, Pb, As, Cd, Ni y Al no fueron determinados debido a que las concentraciones se encontraban bajo el límite de detección de la técnica usada, Los únicos metales determinados en la planta fueron: Mn y Cu. Concentraciones y límites de detección ver ANEXO IV.

3.6.1. Absorción de Mn.

La absorción de manganeso en la planta dispuesta en la solución control tuvo un comportamiento irregular. La fluctuación de manganeso en la planta fue en rangos de 0,05 mg L⁻¹. Estos niveles son bajos, si se espera un efecto remediador de la planta. Lo mismo se observa en las plantas dispuestas en el RIL donde la absorción de manganeso fue casi nula. Las fluctuaciones de manganeso estarían asociadas con a los niveles normales que la planta pudiera tener de manera natural y que no se debe

necesariamente a la absorción del manganeso contenido en el RIL ya que los niveles presentados en la solución control y en el RIL están en un mismo rango $0,14 \text{ mgL}^{-1}$ por lo que no habría aumentado el manganeso en las plantas que estaban en el RIL. Ver ANEXO VIII.

3.6.2 Absorción de Cu en solución control.

El Cu fue el único metal que mostró niveles de absorción. La absorción de Cu en la solución control fluctúa para las hojas y raíces entre $0,750$ y $0,800 \text{ mg L}^{-1}$, donde las raíces fueron las que mostraron un leve aumento, no así las hojas, que muestran un descenso de la concentración.

En la Figura 7 se observa un aumento de Cu en la raíz hasta el día 15 en la solución control. Sin embargo ocurre un descenso de la concentración en los últimos 7 días.

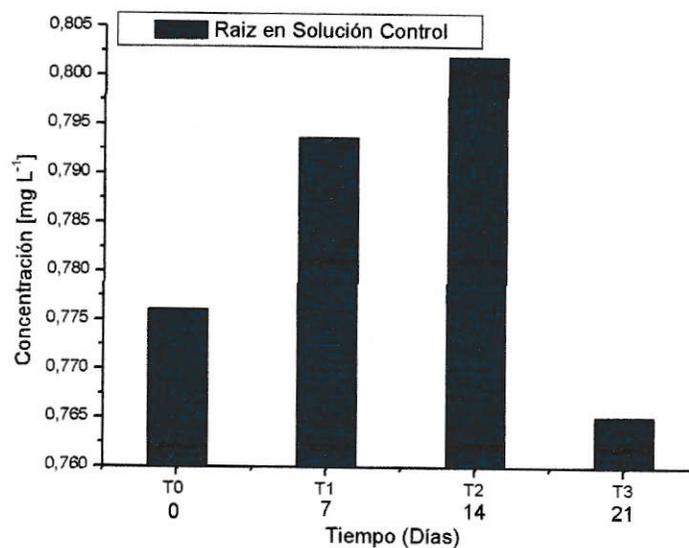


Figura 7: Variación de la absorción de Cu en las raíces en solución control.

La Figura 8 muestra un aumento de Cu en las hojas sólo los primeros 7 días, para luego descender hasta el día 21.

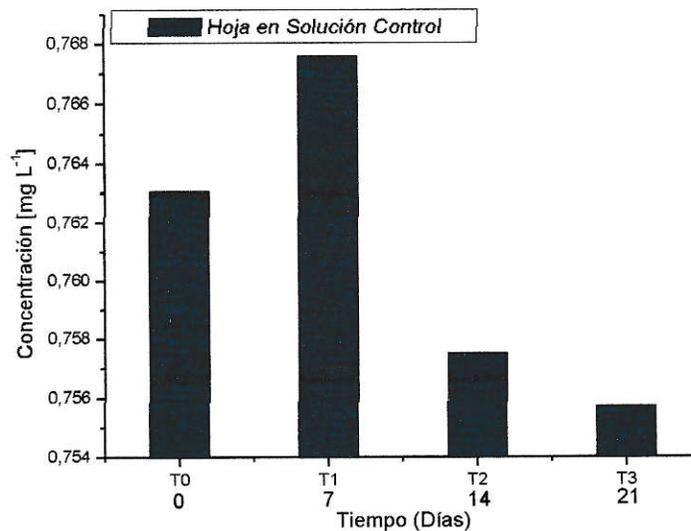


Figura 8: Variación de la absorción de Cu en hojas en solución control.

3.6.3. Absorción de Cu en RIL Adit 71.

En las Figuras 9 y 10 se observa que para hojas y raíces en el RIL, existe un aumento promedio de $0,6 \text{ mgL}^{-1}$ de Cu.

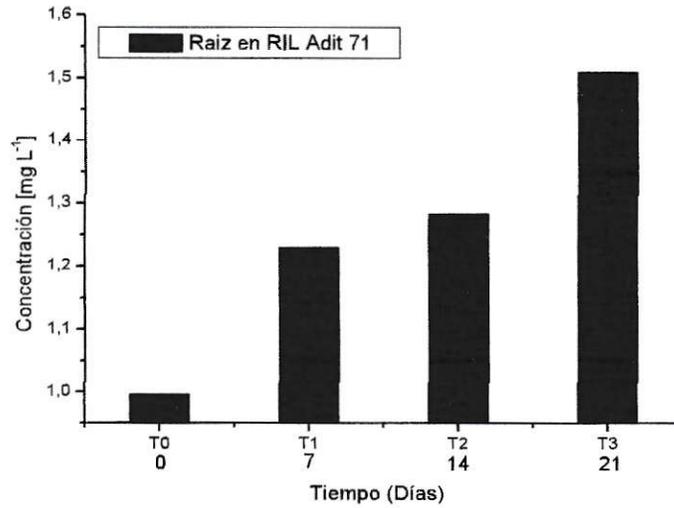


Figura 9: Variación de la absorción de Cu en raíces en RIL Adit 71.

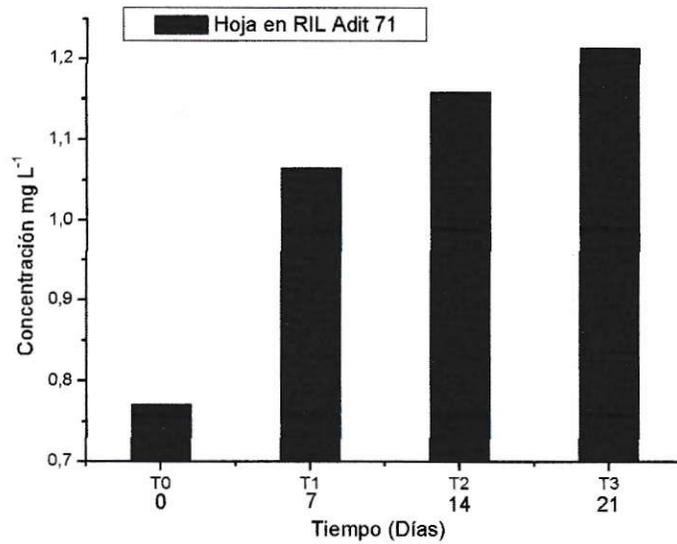


Figura 10: Variación de la absorción de Cu en hojas de *V. zizainoides* durante el periodo de cultivo en RIL Adit 71.

Se observo que los resultados obtenidos no fueron favorables, la planta *V. zizanioides* mostró escasa absorción de Cu y sólo se observó que existe absorción de Cu en niveles bajos.

De acuerdo a lo anterior un análisis en mayor profundidad se realizo solo para Cu.

A diferencia del manganeso las concentraciones de Cu en las plantas dispuestas en el RIL aumentaron. Se observa un aumento creciente durante el periodo de cultivo, el rango fluctúa para las hojas desde 0.79 mgL⁻¹ a 1,2 mgL⁻¹ y para las raíces de 1,0 mgL⁻¹ a 1,6 mgL⁻¹ como se observa en la Figuras 9 y 10. Esto es un aumento de 0,41 mgL⁻¹ de Cu en las hojas y 0,6 mgL⁻¹ de Cu en las raíces.

3.7. Balance de Masas.

Para establecer la contracción efectiva de Cu que absorbió la planta, se hace un balance de masa donde se sustrae al valor obtenido del RIL el valor de la solución control. Como se observa en el siguiente calculo, a partir de las concentraciones de la Tabla 5.

Tabla 5 : Balance de masas de Cu en raíces.

Día	Concentración de Cu [mg L ⁻¹]		
	Solución RIL Adit 71	Solución Control	Balance
0	0,772	0,763	0,009
7	1,065	0,767	0,298
14	1,158	0,757	0,401
21	1,213	0,755	0,478

Calculo: Balance de Masas = [0,772 mg L⁻¹ - 0,763 mg L⁻¹]=0,009 mg L⁻¹

Los resultados de las Tablas 6 y 7 muestran la concentración efectiva de Cu. Este valor fue en aumento durante los 21 días para las plantas presentes en el RIL.

Tabla 6: Concentración neta de Cu obtenidos en raíces dispuestas en RIL.

Día	Concentración de Cu [mg L ⁻¹] (Balance*)
0	0,009
7	0,298
14	0,401
21	0,478

ANEXO V

Tabla 7: Concentración neta de Cu obtenidas en hojas cultivadas en RIL.

Día	Concentración de Cu [mg L ⁻¹] (Balance*)
0	0,185
7	0,436
14	0,482
21	0,745

ANEXO V

3.8. Retención de Cu en las Plantas.

Tabla 8: Retención total de Cu por las plantas *V. zizanioides* durante todo el período de cultivo.

Concentración de Cu [µg de Cu/µg de Planta]*	
Raíz	Hoja
46,9	56

ANEXO VI

3.9. Tasa de Absorción de metales pesados en Plantas.

De acuerdo a los resultados de retención se estimó la tasa de absorción de Cu.

3.9.1. Tasa de Absorción de Cu.

La tasa de absorción diaria para el cobre durante el período de cultivo fue de **4,9 µg/día**, (cálculos en ANEXO VII). Con una tasa de absorción total de **102,9 µg** durante todo el período.

Las tasas de absorción mostradas por la planta *V. zizanioides* fue nula para la mayoría de los metales analizados, a excepción del cobre el cual, como se observa en la Tabla 8, se muestra una retención total en los 21 días de análisis de 102,9 µg de Cu, nivel muy bajo con respecto al total de cobre presente en el RIL Adit 71. Además, considerando que se espera una función remediadora de líquidos con altas concentraciones de metales pesados estos resultados son poco significativos.

3.10. Procesos que Afectan la Absorción.

La Figura 15 muestra un esquema donde se involucran diferentes procesos de un sistema suelo-planta, asociados a la absorción de metales. (<http://www.infoagro.com>)

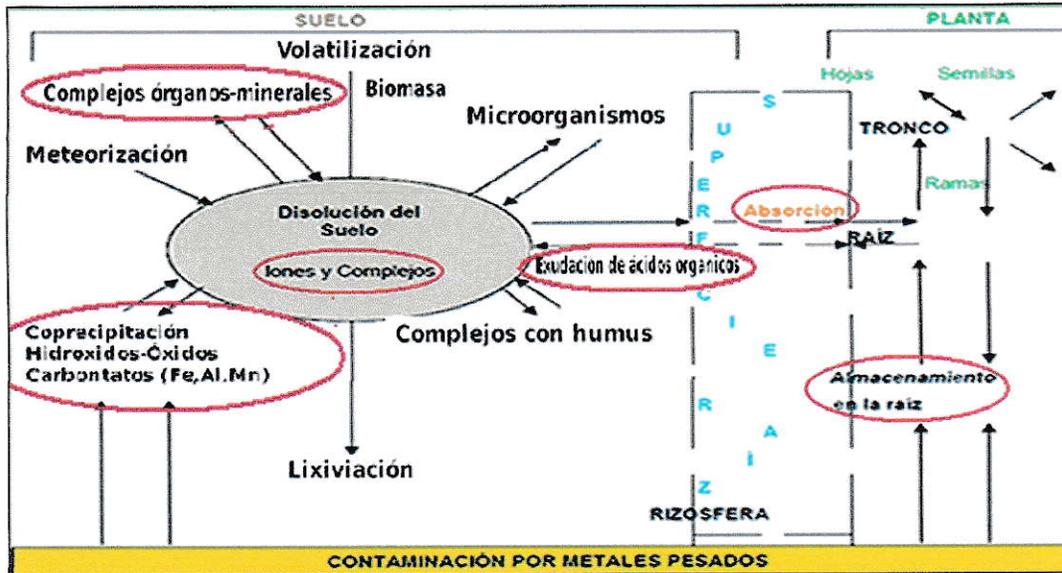


Figura 11: Dinámica de los metales pesados en el sistema suelo-planta.

De acuerdo a las condiciones y los resultados en el trabajo, se consideró que los procesos más importantes involucrados en la absorción de metales de acuerdo al esquema de la Figura 11, son absorción, almacenamiento en la raíz, exudación de ácidos orgánicos, presencia de microorganismos, iones y iones complejos.

Es de importancia considerar la rizósfera, ya que es un medio que presenta características diferentes al medio en general. Quizás podría cumplir un papel fundamental en la absorción de metales.

La Tabla 9 resume la disponibilidad de especiación química de los metales en el suelo. (<http://edafologia.ugr.es>)

Tabla 9. Formas químicas de los metales y su disponibilidad relativa para plantas.

Formas de retención en el Suelo	Disponibilidad Relativa
Ión en la disolución del suelo	Fácilmente disponible
Ión en complejo de intercambio orgánico o inorgánico	Disponible
Metales Complejados o Quelatados por compuestos orgánicos	Disponible (Dependiendo del Acido Orgánico).
Metal precipitado o coprecipitado	Disponible sólo si ocurre un alteración química
Metal Incorporado en la matriz biológica	Disponible después de la descomposición
Metal en la estructura mineral	Disponible después de la alteración mineral

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos obtenidos nos indican que predominantemente los metales se encuentran en su estado soluble. En el sistema de cultivo hidropónico y dado sus características, se espera que los metales estén mayormente en sus formas iónicas (cationes) y posiblemente complejados con ácidos orgánicos que exudarían las plantas. Ver Tabla 9. El cultivo hidropónico es similar en comportamiento en el suelo. La solución suelo juega un papel importante en la disolución de especies químicas.

Dado estos resultados y características del experimento se podría decir que la incapacidad de absorber metales pesados por parte de la planta *V. zizanioides* puede estar relacionada mayormente por su metabolismo o características naturales.

3.11. Análisis de Ácidos Orgánicos.

3.11.1. Extracción de Ácidos Exudados por la planta *V. zizanioides*.

La especie *V. zizanioides* cuando se trató con RIL y solución de CuSO_4 exudó sólo ácido acético en 48 horas de tratamiento ver Tabla 10. La cantidad de Cu absorbido por la planta no fue en gran cantidad, por lo que no fue significativo en términos de remediación. La concentración disminuyó en el sobrenadante y aumento en la planta

Tabla 10: Concentración de ácido acético exudado y Cu absorbido en planta *V. zizanioides* en 48 h.

Tratamiento	(t=0 h)	(t=24 h)	(t=48 h)	Inicio t=0 h	Final t=48 h	Inicio t= 0 h	Final t=48 h
	mgL^{-1}	mgL^{-1}	mgL^{-1}	Cu en RIL mgL^{-1}	Cu en RIL mgL^{-1}	Cu en planta $\mu\text{g/g}$ p.s.*	Cu en planta $\mu\text{g/g}$ p.s.*
RIL pH: 5,4	0	0,179	0,223	1,71	1,62	196,5	216,8
CuSO_4 pH 5,4 (15 μM)	0	0,08	0,615	3,42	1,35	196,5	264,2

*p.s. : peso seco

3.11.2. Extracción de Ácidos Exudados del *T. aestivum*.

Otra especie vegetal usada en este estudio fue *T. aestivum*.

Durante las 24 h de tratamiento las plantas de trigo dispuestas en 10 mL de RIL Adit 71 y 10 mL de Agua Desionizada, no mostraron síntomas de deterioro o cambios en su aspecto de manera significativa.

3.11.3. Análisis Cuantitativo y Cualitativo de Ácidos Orgánicos extraídos desde

T.aestivum.

Los resultados ya sea cuantitativos y cualitativos son negativos en ambas soluciones RIL Adit 71 y agua desionizada, donde no se observa presencia de ningún tipo de ácido esperado, como ácido acético, ácido oxálico o ácido málico. En el segundo análisis donde se trabaja con las muestras concentradas tampoco se ven resultados positivos.

El sistema de extracción de exudados en plantas de trigo se realizó en un período total de 24 h.

Esta especie ha demostrado tener capacidad de absorber metales en hojas y granos como Cu y Pb en suelos (L. Pérez y col.2004).

Se simula el sistema al igual que el tratamiento de *V. zizanioides* con respecto a la utilización de RIL Adit 71 y una solución control. Las muestras extraídas no mostraron presencia de ningún tipo de ácido orgánico.

3.11.4. Sistema de Extracción de Ácidos Exudados por la planta *P. australis*.

La tercera especie vegetal usada fue *P. australis*. El RIL se reemplazo por una solución de CuSO_4 .

En el periodo de 3 días de ambientación de las plantas no se observan cambios en la apariencia de éstas, las que están dispuestas en 4 mL de solución con nutriente fostrogen. Luego de la ambientación, se agrega sulfato de Cu para dar inicio del tratamiento. Las plantas cambian su coloración de verde a café oscuro, donde se observan síntomas de deterioro como apariencia de sequedad, hojas caídas. No obstante en el tiempo total de tratamiento de 72 h las plantas se mantienen en

condiciones favorables y no llegan a un deterioro mayor. El pH baja de 5,5 a 4,5 en los 3 días.

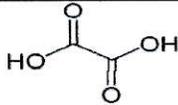
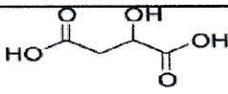
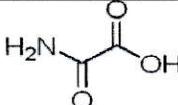
El sistema de extracción de exudados de *P. australis* fue en un periodo mayor al del trigo, de 72 h, ya que ha mostrado tener capacidad de absorber metales de manera más lenta, pero más efectiva que la planta *V. zizanioides* en un periodo de cultivo similar.

A diferencia de la extracción en plantas de trigo, la solución en que fueron dispuestas fue una solución artificial con 15 μM de CuSO_4 y se utilizaron 9 plantas. Para controlar variables y dar las mejores condiciones se dispusieron en una cámara de cultivo en un fotoperiodo de 14 h de Luz y 10 h de oscuridad, temperatura de 25 °C y 50% de humedad.

El uso de CuSO_4 se explica con relación a que es posible que una solución como el RIL tenga demasiados interferentes como para poder determinar ácidos exudados presentes en él. Además, se requiere de un nutriente ya que la exudación de estos ácidos está relacionada con su proceso de nutrición, y al estar la planta en una solución sin nutriente ésta no tendrá su funcionamiento natural esperable ya que carecerá de los compuestos básicos para su crecimiento y nutrición.

Los resultados mostraron que la planta *P. australis* exuda diferentes ácidos orgánicos entre los encontrados y determinados están el ácido oxálico y málico además de otros como el oxámico. Tabla 11.

Tabla 11: Lista de ácidos orgánicos encontrados en exudados de *P. australis*.

Acido Orgánico	Estructura
Oxálico	
Málico	
Oxámico	

*Cromatograma ver ANEXO XI

La presencia de ácidos pueden estar relacionados con el descenso de pH observado en el período de extracción, el cual bajó de 5,5 a 4,5 esto muestra una acidificación del medio que en ámbitos de este trabajo sería un buen indicio con respecto a mejorar las condiciones del medio para favorecer la absorción de metales, ya que medios ácidos favorecen la absorción. Las concentraciones obtenidas de los ácidos orgánicos se observan en la Tabla 12.

Tabla 12: Concentración de ácidos orgánicos exudados por *P. australis*.

Tiempo (h)	Ac. Oxálico [mg L ⁻¹]	Ac. Málico [mg L ⁻¹]	Ac. Oxámico [mg L ⁻¹]
0	0	0	0
24	0,443	0,224	0,151
48	0,695	0,934	0,228
72	0,984	2,03	0,148

Los ensayos de exudación de ácidos orgánicos, utilizando la especie *P. australis* de acuerdo a los tiempos de retención obtenidos se determino la presencia de: ácido oxálico, málico y oxámico en concentraciones máximas de 0,984 mg L⁻¹, 2,03 mgL⁻¹ y 0,152 mgL⁻¹, respectivamente, observando

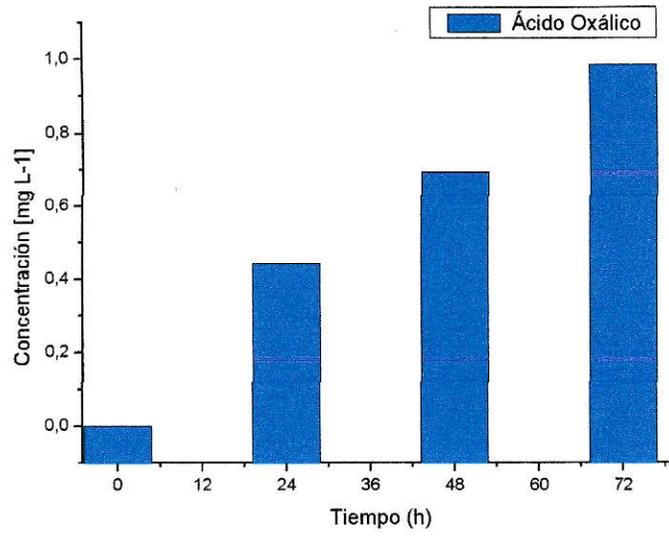


Figura 12: Variación de ácido oxálico durante las 72 h.

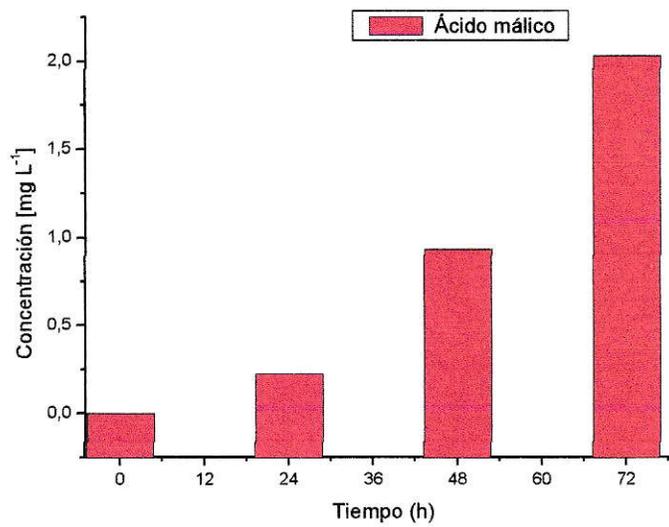


Figura 13: Variación de ácido málico durante las 72 h.

La Figura 14 muestra un aumento de la concentración durante las primeras 48 horas de 0 a 0,15 mgL⁻¹ para luego descender a 0,15 mgL⁻¹ nuevamente.

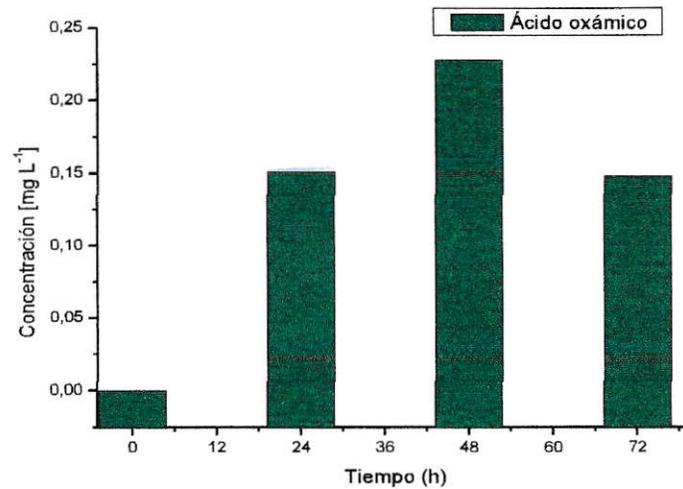


Figura 14: Variación de ácido oxámico durante los 72 h.

La especie metálica debe estar soluble y también disponible. La formación de complejos con ácidos orgánicos mejoraría la disponibilidad para las plantas

3.11.5. Concentración de ácidos orgánicos exudados y Cu absorbido de *P. australis* en diferentes medios y pH.

Tabla 13: Concentración de ácidos orgánicos exudados y Cu absorbido de *P. australis* en 72 h.

Tratamiento	Cu en RIL t=0 h mg L ⁻¹	Cu en RIL t=72h mg L ⁻¹	Ácidos Orgánicos t=72 h mg L ⁻¹			Cu en planta inicial µg/g p.s.	Cu en planta final µg/g p.s.
			Oxálico	Málico	Oxámico		
CuSO ₄ pH 5,4 (15 mM)	2583,3	234,6	0,984	2,03	0,148	99,4	18700
CuSO ₄ pH 5,4 (15 µM)	2,62	1,31	0	0	0	99,4	141,7
RIL pH 6,8	2,42	0,900	0	0	0	99,4	148
RIL pH 5,4	3,24	0,700	0	0	0	99,4	120

Los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos indican que el tipo de ácido orgánico exudado frente a tratamiento con Cu en *V. zizanioides* y *P. australis* es especie-dependiente. En *P. australis* el nivel de los ácidos orgánicos exudados fue dependiente de la concentración de Cu usado en el tratamiento. Es posible que la exudación de ácidos orgánicos observado a 15 mM en *P. australis* funciona como un mecanismo de quelación externa que permite concentrar el elemento y absorberlo con mayor facilidad. Esto explicaría el alto nivel de Cu observado en tejidos de *P. australis*. En *P. australis* tratadas con 15 mM de CuSO₄ se observó, ácido oxálico (0,984 mg L⁻¹), ácido málico (2,03 mg L⁻¹) y ácido oxámico (0,152 mg L⁻¹) en solución, y se observó acumulación de 18700 µg/g.p.s. de Cu a las 72 horas del tratamiento. Cuando se trató a la especie con CuSO₄ 15 µM, o con RIL, no se observó exudación de ningún ácido. Ver Tabla 13.

IV. CONCLUSIONES

- La planta *V. zizanioides* no tiene características favorables para la absorción de metales pesados, a pesar de su resistencia en medios con altas concentraciones salinas.
- *P. australis* cultivada en CuSO_4 15 μM absorbe Cu sin exudación de ácidos orgánicos, sin embargo en una concentración mayor de 15 mM exuda ácidos orgánicos como Málico, Oxámico y Oxálico además de absorber Cu , indicando que la concentración alta de cobre estimula la exudación de ácidos orgánicos.
- En Existe relación entre ácidos orgánicos exudados y absorción de metales.

V. REFERENCIAS

- A. Errázuriz K. 2000. "Manual de Geografía de Chile". Editorial Andres Bello. Rev. 10: 300.
- A. Isherwood and S. Hanes. 1953. Separation and Estimation of Organic Acids on Paper Chromatograms. F. Agricultural Research Council Unit of Plant Biochemistry, Botany School and Biochemistry School, 15 April.
- A. Mentaberry. 2009. Curso Agrobiotecnología, Fitorremediación Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- A. Navarro, K. Ramos, K. Campos, H. Maldonado. 2006. Elucidación del Efecto pH en la Adsorción de metales pesados mediante Biopolimieros Naturales: Cationes Divalentes y Superficies Activas, Revista Iberoamericana de Polímeros 7(2), Marzo.
- A. Rovira. 1969. Plant root exudates. Bot. Rev. 35: 35-57.
- C. Barbas, J. A. Garcia and F. J. Gutierrez Mañero. 1999. Separation and Identification of Organic Acids in Root Exudates of *Lupinus luteus* by Capillary Zone Electrophoresis. Spain Phytochem. Rev. 10 :55-59.
- E. Gidaracos and A. Giannis. 2006. Chelate agents enhanced electrokinetic remediation for removal cadmium and zinc by conditioning catholyte pH. Water Air Soil Pollut. Rev. 172 :295-312.
- I. E. Marjorie Reyes. 2006. Evaluación de suelos y especies vegetales con potencial de acumulación de metales pesados. Universidad Autónoma de Chihuahua Facultad de Zootecnia, Tesis para optar al grado de maestro de Ciencias.
- I. Marín and M. Morales. 2006. Estudio del efecto de *Polygonum australis* sobre las propiedades físico químicas de un sustrato de relave minero de la planta Santo Domingo, Papos, II Región de Chile. Tesis para obtener el título de ingeniero de ejecución en ambiente.
- L. Codorin, E. Tabosa, M. Paive y J. Rubio. 2007. Avances en el tratamiento de aguas acidas de minas. Scientia et Technica Año XIII, Rev. 36.
- L. Perez, A. M. Moreno, J. Gonzalez. 2004. Índice de Acumulación de metales pesados en grano de y hojas de trigo. Shironian Rev.3: 5-9.

M. M. Lasat, A. M. Baker and L. V. Kochian. 1996. Physiological characterization of root Zn^{2+} absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. *Plant Physiol. Rev.* 112: 1715-1722.

N. Roongtanakiat. 2002. Vetiver and heavy metal absorption from wastewater. Trabajo presentado en la 4th Thai Nat. Conf. Vetiver, Bangkok, Tailandia 28-29 Nov.

N. Takeno. 2005. Atlas of Eh-pH diagrams, intercomparison of thermodynamic database. National Institute of Advanced Industrial Science and technology.

Ortiz C, Alcaide O, Kao J. 2008. Copper distribution in leaves and roots of plants growing on a copper mine-tailing storage facility in northern Chile. *Chil Hist Nat. Rev.* 81, 489-499.

R.A. Batista García y A. Reyes. 2009. Fitorremediación de metales pesados y microorganismos. *Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente, Rev.16*, ISSN-1683-8904.

R. Fonseca, C. Díaz, M. Castillo, J.R. Candia and P. Truong. 2009. Uso Vetiver grass para la rehabilitación de sitios mineros: Resultados preliminares. Fundación Chile.

S. Puga, M. Sosa, T. Lebgue, C. Quintana y A. Campos. 2006. Contaminación por metales pesados en el suelo provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada Rev.* 5:149-145.

Xiao-quan Shan, Jun Lian, Bei Wen. 2002. Effect of organic acids on adsorption and desorption of rare earth elements. *Chemosphere Rev.* 47: 701–710.

Páginas Web:

- <http://edafologia.ugr.es/conta/tema15/fact.htm>. Consultada: 20 de Mayo 2011
- http://www.infoagro.com/abonos/contaminacion_suelos_metales_pesados.htm. Consultada: 20 de Mayo 2011
- <http://www.vetivernet.com/pdf/VETIVER%20PARA%20LA%20FITORREMEDIA%20CION.pdf>. Consultada: 15 de Abril 20011

VI. ANEXOS

ANEXO I: Masas secas y Húmedas.

Tabla 14: Masas secas y húmedas obtenidas por hojas y raíces dispuestas en RIL y el Control.

Día 0	Masa Seco (g)	Masa Húmeda (g)	Masa Agua (g)
Raíz Control	0,39	2,69	2,3
Hoja Control.	0,48	3,95	3,47
Raíz RIL	0,53	3,13	2,6
Hoja RIL	0,52	3,67	3,15
Día 7	Masa Seco (g)	Masa Húmeda (g)	Masa Agua (g)
Raíz Control	0,458	2,11	1,652
Hoja Control	1,25	6,64	5,39
Raíz RIL	0,19	0,7	0,51
Hoja RIL	0,751	2,07	1,319
Día 14	Masa seco (g)	Masa Húmeda (g)	Masa Agua (g)
Raíz Control	1,04	5,52	4,48
Hoja Control	2,52	14,51	11,99
Raíz RIL	0,35	2,85	2,5
Hoja RIL	0,521	2,67	2,149
Día 21	Masa Seco (g)	Masa Húmeda (g)	Masa Agua (g)
Raíz Control.	1,03	5,47	4,44
Hoja Control	2,27	14,12	11,85
Raíz RIL	0,73	4,52	3,79
Hoja RIL	0,67	2,12	1,45

ANEXO II: Curvas de Calibración para análisis de metales en RIL Adit 71.

a) Curvas por Espectrofotometría Absorción Atómica

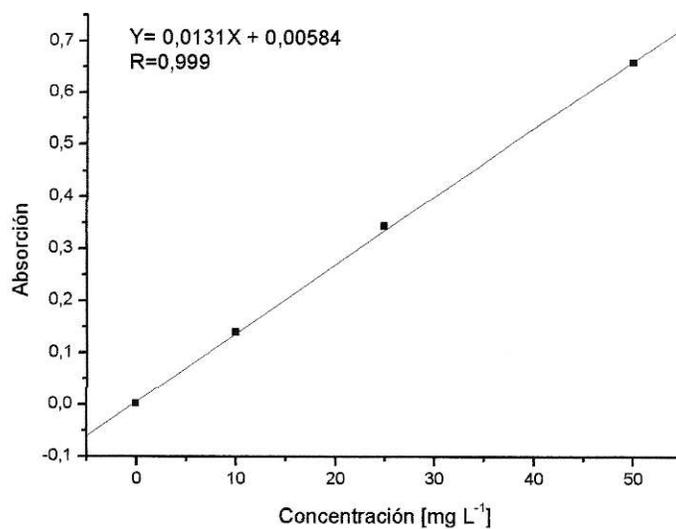


Figura 15: Curva de calibración para Cu.

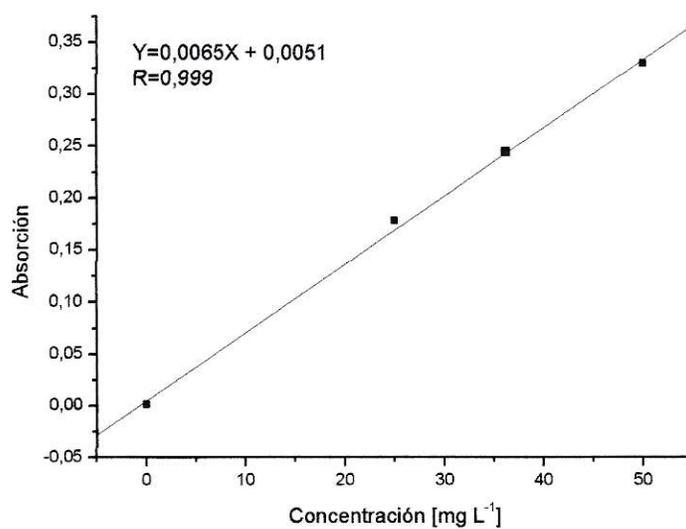


Figura 16: Curva de calibración para Al.

b) Curva de calibración para Arsénico por generador de hidruros

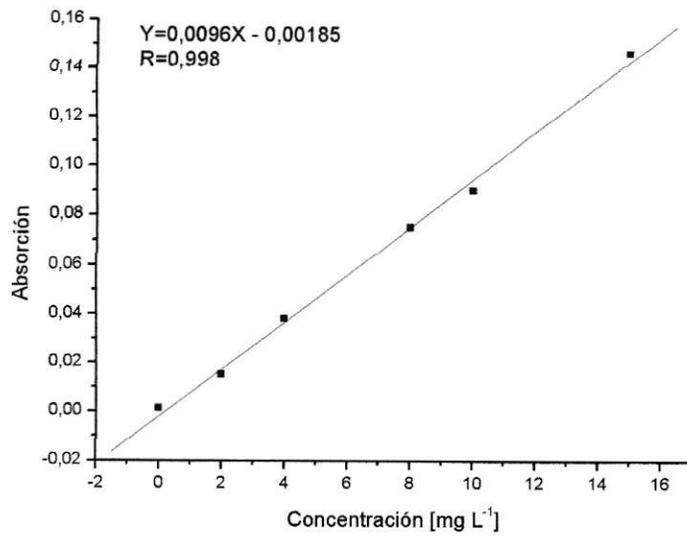


Figura 17: Curva de calibración de As.

c) Curvas de calibración para análisis de metales pesados en Espectroscopia de Emisión.

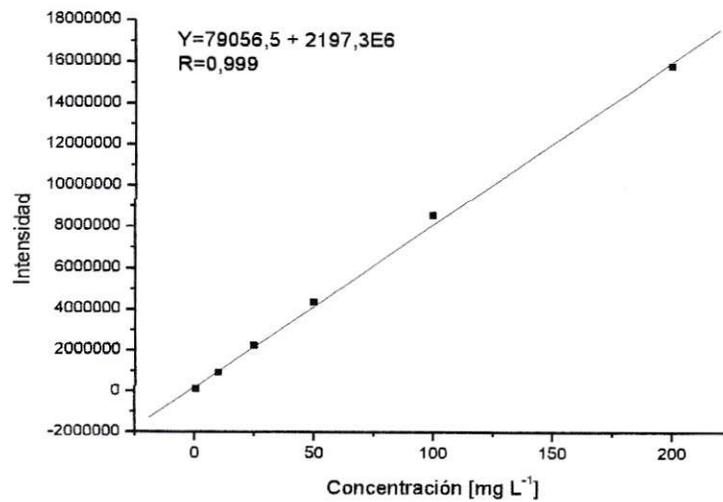


Figura 18: Curva de calibración de Zn.

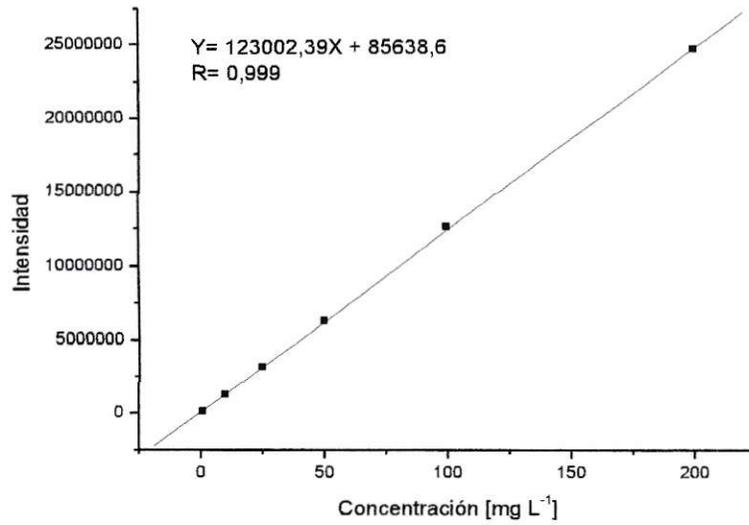


Figura 19: Curva de calibración de Ni.

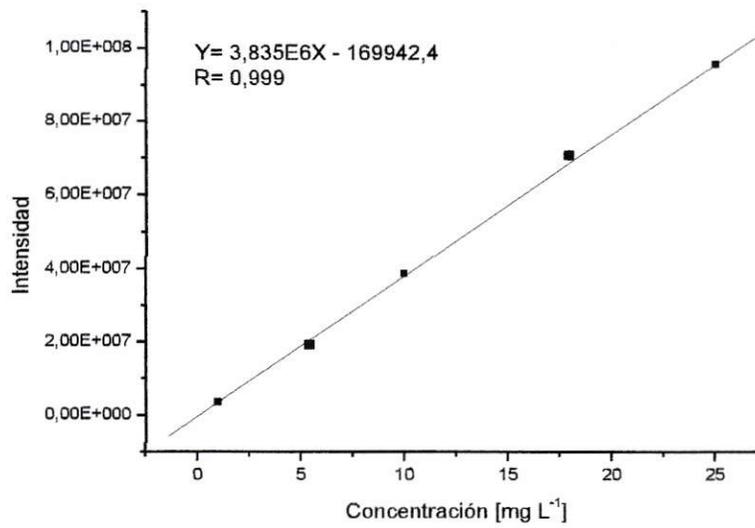


Figura 20: Curva de calibración de Mn.

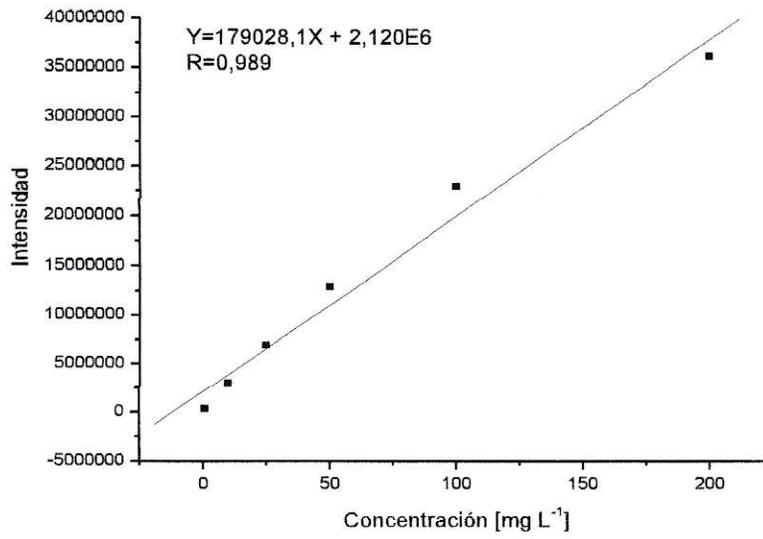


Figura 21: Curva de calibración de Cd.

ANEXO III: Cálculo para determinar concentración en las plantas

a) Supuesto: Se asume que las plantas absorben la totalidad de los metales en el RIL.

i. De acuerdo los resultados obtenidos en el RIL Adit 71(Tabla 5). Se calcula la concentración total de metales presentes en el RIL.

Volumen total: 2 L

Para el Cu:

$$\frac{150 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = \frac{X}{2000 \text{ mL}} = \frac{300 \text{ mg}}{2000 \text{ mL}}$$

ii. Para calcular la concentración de metal en la planta se considera que la muestra se diluyo en un total de 10 mL y se absorbieron los 300 mg de Cu. Calculamos en 1000 mL para obtener los datos en mg L^{-1} .

$$\frac{300 \text{ mgdecobre}}{10 \text{ mL}} = \frac{X}{1000 \text{ mL}} = 30000 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

- iii. El procedimiento es el mismo para todos los metales. Obteniendo:

Tabla 15: Concentraciones obtenidas por el cálculo supuesto.

Metales	Concentración
Zn	1150 mg L ⁻¹
Pb	26 µg L ⁻¹
As	130 µg L ⁻¹
Mn	2900 mg L ⁻¹
Cd	924000 µg L ⁻¹
Cu	30000 mg L ⁻¹
Ni	23800 µg L ⁻¹
Al	no detectado

ANEXO IV: Concentración de Metales Pesados en el RIL y Solución Control.

Tabla 16: Concentración de Metales Pesados en Hojas de *V. zizanioides* Cultivadas en RIL Adit 71

Metales	Muestras [mg L ⁻¹]			
	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
Zn	N	N	N	N
Pb	N	N	N	N
As	N	N	N	N
Mn	0,127	0,105	0,112	0,135
Cd	N	N	N	N
Cu	0,996	1,229	1,283	1,51
Ni	N	N	N	N
Al	N	N	N	N

N:No Detectado.

Tabla 17: Concentración de Metales Pesados en Raíces de *V. zizanioides* Cultivadas en RIL Adit 71

Metales	Muestras [mg L ⁻¹]			
	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
Zn	N	N	N	N
Pb	N	N	N	N
As	N	N	N	N
Mn	0,074	0,063	0,057	0,06
Cd	N	N	N	N
Cu	0,772	1,065	1,158	1,213
Ni	N	N	N	N
Al	N	N	N	N

N:No Detectado.

Tabla 18: Concentración de Metales Pesados en Hojas de *V. zizanioides* Cultivadas en Solución Control

Metales	Muestras [mg L ⁻¹]			
	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
Zn	N	N	N	N
Pb	N	N	N	N
As	N	N	N	N
Mn	0,123	0,064	0,086	0,066
Cd	N	N	N	N
Cu	0,776	0,793	0,801	0,765
Ni	N	N	N	N
Al	N	N	N	N

N:No Detectado.

Tabla 19: Concentración de Metales Pesados en Raíces de *V. zizanioides* Cultivadas en Solución Control

Metales	Muestras [mg L ⁻¹]			
	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21
Zn	N	N	N	N
Pb	N	N	N	N
As	N	N	N	N
Mn	0,007	0,054	0,061	0,051
Cd	N	N	N	N
Cu	0,763	0,767	0,757	0,755
Ni	N	N	N	N
Al	N	N	N	N

N:No Detectado

Límites de detección para equipo Espectrofotometría de Emisión, Plasma Perkin Elmer Optima 2000 DV .

Tabla 20: Límites de Detección de la técnica utilizada, ICP.

Elemento	L.D µg/L
Al	0,9
As	3,6
B	0,25
Be	0,017
Cd	0,07
Co	0,25
Cr	0,25
Cu	0,9
Fe	0,2
Mn	0,03
Mo	2
Ni	0,4
Pb	1,4
Se	4,5
Tl	0,2
V	0,15
Zn	0,2

ANEXO V: Cálculo de Balance de masas de Cu en raíces y hojas

$$\text{Balance de Masas} = [\text{Concentración de Cu RIL} - \text{Concentración de Cu en Control}]$$

Tabla 21: Balance de masas de Cu en raíces

Día	Concentración de Cu [mg L ⁻¹]		
	Solución RIL Adit 71	Solución Control	Balance ¹
0	0,772	0,763	0,009
7	1,065	0,767	0,298
14	1,158	0,757	0,401
21	1,213	0,755	0,478

Tabla 22: Balance de masas de Cu en Hojas

Día	Concentración de Cu [mg L ⁻¹]		
	Solución RIL Adit 71	Solución Control	Balance ¹
0	0,996	0,776	0,22
7	1,229	0,793	0,436
14	1,283	0,801	0,482
21	1,51	0,765	0,745

ANEXO VI: Calculo de la Retención de Cu.

a) De acuerdo a los resultados tenemos para las raíces:

Concentración Inicial (Ci): $0,009 \text{ mg L}^{-1}$

Concentración Final (Cf): $0,478 \text{ mg L}^{-1}$

b) Como las muestras estaban en 10ml de solución calculamos:

$$\text{Ci: } \frac{0,009 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = \frac{X}{10 \text{ ml}} = 0,09 \mu\text{g}$$

$$\text{Cf: } \frac{0,478 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{X}{10 \text{ ml}} = 4,78 \mu\text{g}$$

c) En los 10 ml de solución fueron agregados 0,1 g de muestra de planta,
Calculamos el contenido en 1 g de planta:

$$\text{Ci: } \frac{0,09 \mu\text{g de Cu}}{0,1 \text{ g de Planta}} = \frac{X}{1 \text{ g de planta}} = 0,9 \frac{\mu\text{g de Cu}}{\text{g de Planta}}$$

$$\text{Cf: } \frac{4,78 \mu\text{g de Cu}}{0,1 \text{ g de Planta}} = \frac{X}{1 \text{ g de planta}} = 47,8 \frac{\mu\text{g de Cu}}{\text{g de Planta}}$$

d) La retención de Cu en raíces es:

$$\text{Cf} - \text{Ci} = \text{C}$$

$$47,8 \frac{\mu\text{gdeCu}}{\text{gdePlanta}} - 0,9 \frac{\mu\text{gdeCu}}{\text{gdePlanta}} = 46,9 \frac{\mu\text{gdeCuenRaices}}{\text{gdePlanta}}$$

e) Para la retención de Cu en hojas se sigue el mismo procedimiento en el cual se obtiene:

$$56 \frac{\mu\text{gdeCuenHojas}}{\text{gdePlanta}}$$

ANEXO VII: Calculo de la Tasa de Absorción total de Cu en 21 días

a) La retención Total de Cu en los 21 días es:

RT = [Concentración de Cu en raíces + Concentración de Cu en hojas]

$$46,9 \frac{\mu\text{gdeCu en Raíces}}{\text{gdePlanta}} + 56 \frac{\mu\text{gdeCu en Hojas}}{\text{gdePlanta}} = 102,9 \frac{\mu\text{gdeCu Total}}{\text{gdePlanta}}$$

b) La Tasa diaria de absorción es:

$$T_d = \frac{[\text{Concentración Total de Cu}]}{21 \text{ días}}$$

$$\frac{102,9 \mu\text{gdeCu Total}}{21 \text{ días}} = 4,9 \frac{\mu\text{gdeCu}}{\text{día}}$$

ANEXO VIII: Absorción de Manganeso

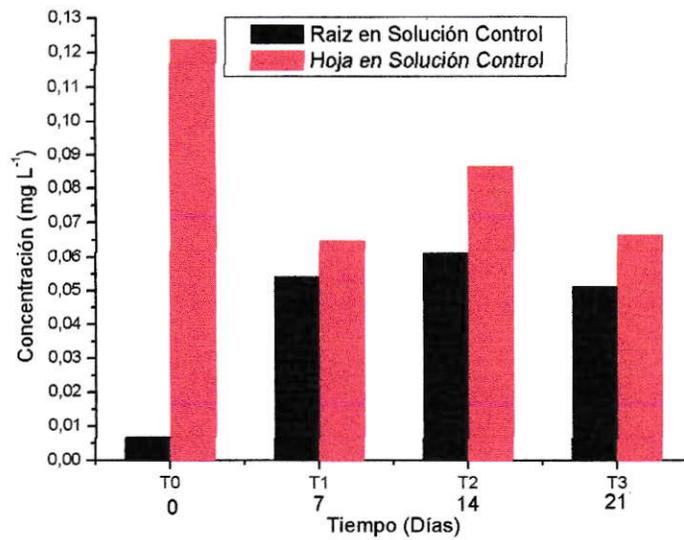


Figura 22: Variación de la Absorción de manganeso en Hojas y Raíces de *V. zizanioides* en Solución Control

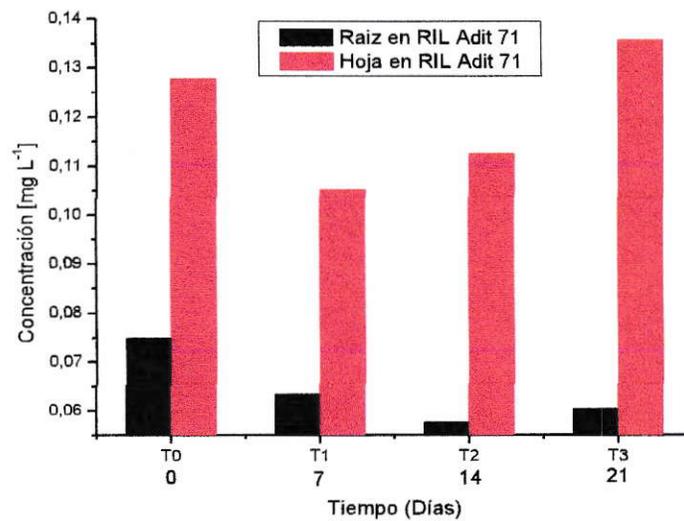


Figura 23: Variación de la Absorción de Manganeso en Hojas y Raíces de *V. zizanioides* en RIL Adit

ANEXO IX: Elementos Presentes en Nutriente Fostrogen

Composición:

- Nitrógeno Total (n) 10 %
- Nitrógeno Nítrico (n) 8 %
- Nitrógeno Amoniacal(n) 3.5 %
- Nitrógeno ureico (n) 2.5 %
- Acido fosfórico (P_2O_5) soluble en citrato de amonio neutro y agua 10.0 % (P 4.4%)
- Acido fosfórico (P_2O_5) soluble en agua 10.0 % (P 4.4%)
- Oxido de potasio (K_2O) soluble en agua 27.0% (K 22.4%)

ANEXO X: Análisis de metales del RIL Adit 71 elaborado en laboratorio hidrolab

Tabla 23: Concentración de metales pesados analizados en hidrolab

Metales	Concentración
Zn	5,62 mg L ⁻¹
Pb	94 µg L ⁻¹
As	107 µg L ⁻¹
Mn	10,2 mg L ⁻¹
Cd	48 µg L ⁻¹
Cu	163,9 mg L ⁻¹
Ni	197 µg L ⁻¹
Al	88 mg L ⁻¹

ANEXO XI: Curvas de calibración y tiempos de retención para análisis de ácidos orgánicos

Tabla 24: Tiempos de retención de estándares de ácidos orgánicos

Ácido	Tiempo de retención (tr) (min)
Oxámico	11,8
Oxálico	8,6
Málico	9,7
Acético	14,5

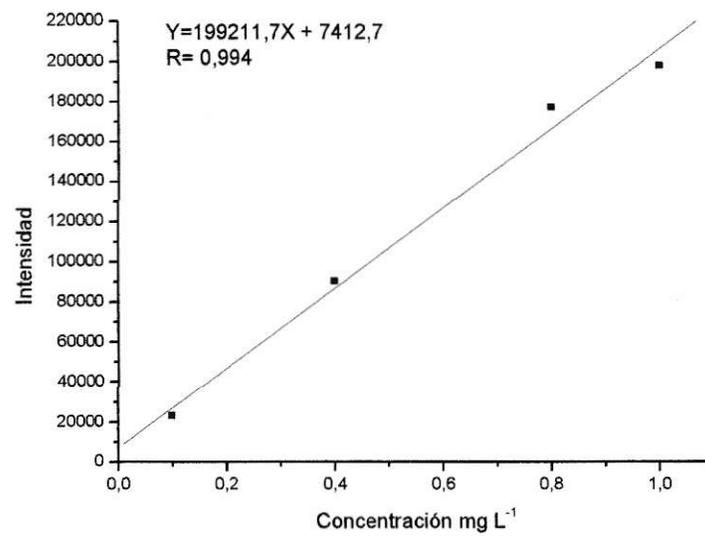


Figura 24: Curva de calibración de ácido oxálico.

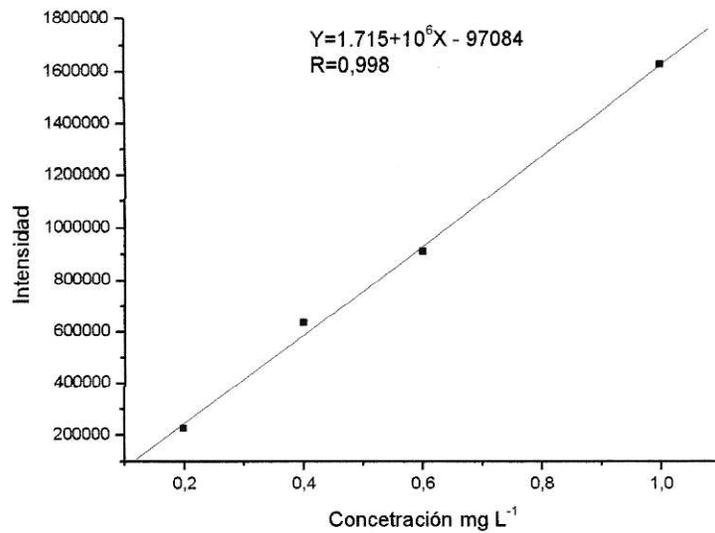


Figura 25: Curva de calibración de ácido oxámico

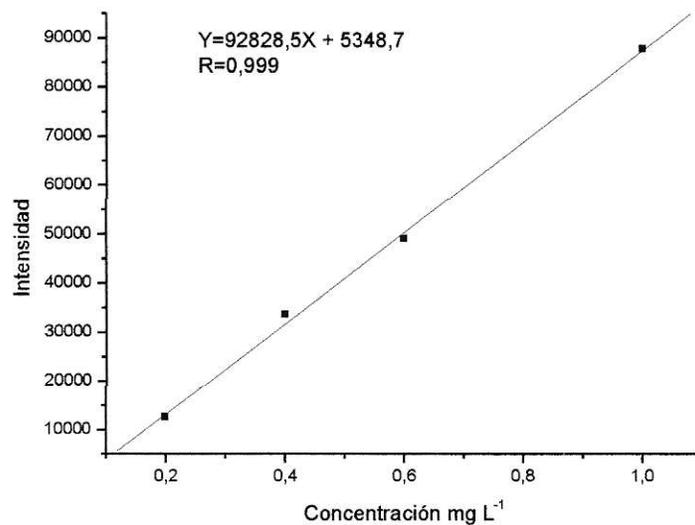


Figura 26: Curva de calibración de ácido málico.

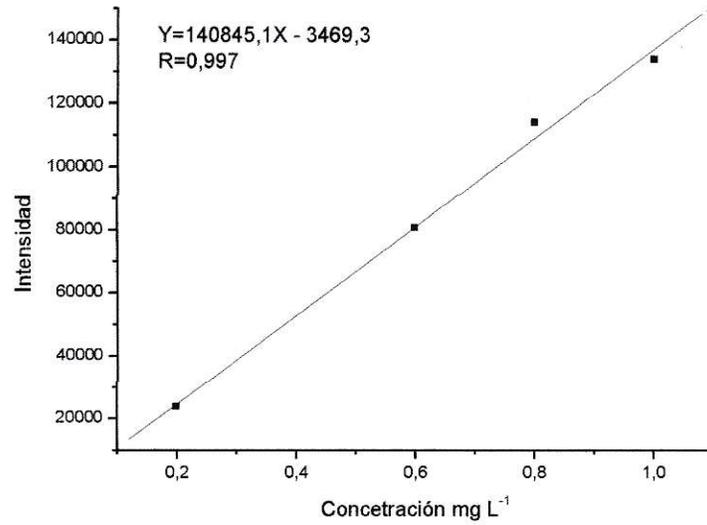


Figura 27: Curva de calibración de ácido acético.

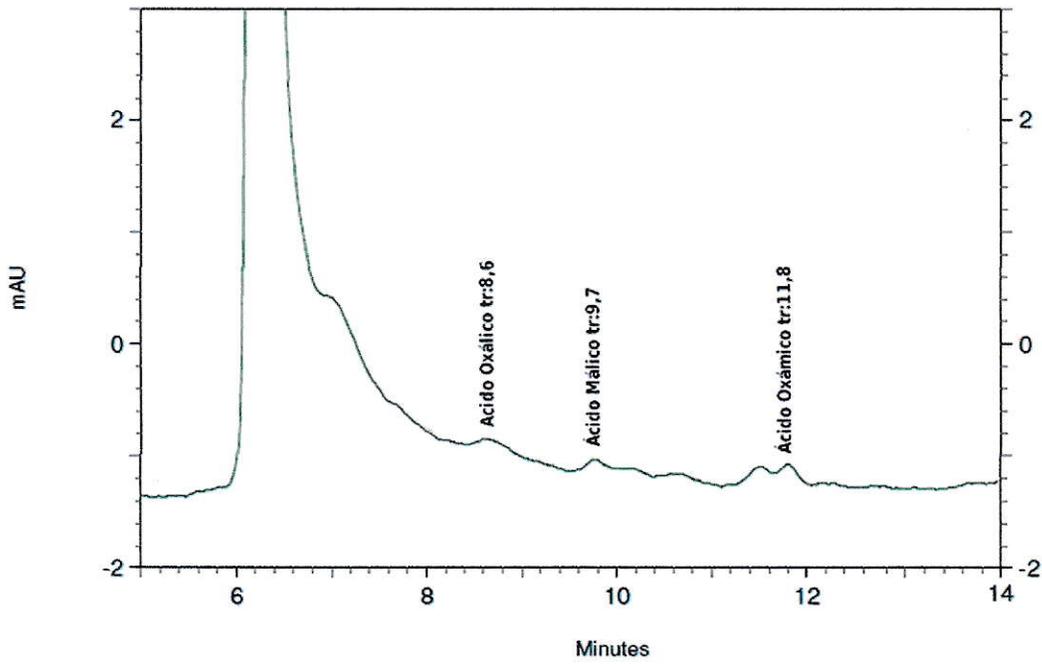


Figura 28: Cromatograma obtenido a las 48 h de tratamiento de *P. Australis* en solución de CuSO₄. Indica la presencia de ácidos orgánicos en la solución donde se destacan los ácidos identificados y cuantificados.