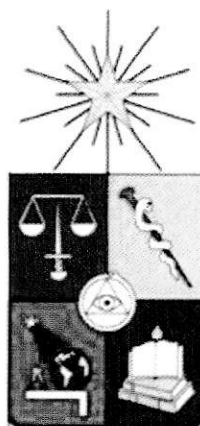


UCH-FC
Q. ambiental
M 296
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

“Estudio de la absorción de metales y exudación de ácidos orgánicos en *Phragmites australis*, especie apta para uso en fitorremediación de RILes mineros”

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

Químico Ambiental

Rodrigo Vicente Manzano Reyes

Director de Seminario de Título: Dra. Claudia Ortiz Calderón
Profesor Patrocinante: M. Cs. Héctor Bravo Vergara

Agosto de 2012
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

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

Rodrigo Vicente Manzano Reyes

“Estudio de la absorción de metales y exudación de ácidos orgánicos en *Phragmites australis*, especie apta para uso en fitorremediación de RILes mineros”

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

COMISIÓN DE EVALUACIÓN

Dra. Claudia Ortiz Calderón
Director Seminario de Título

M. Cs. Héctor Bravo Vergara
Profesor Patrocinante

Dra. María Angélica Rubio Campos
Correctora

M. Cs. Sylvia Copaja Castillo
Correctora

Este bloque contiene las firmas manuscritas de los miembros de la Comisión de Evaluación y un sello circular. El sello circular tiene el texto "FACULTAD DE CIENCIAS" en la parte superior, "BIBLIOTECA CENTRAL" en el centro y "U. DE CHILE" en la parte inferior, rodeado por dos estrellas. Las firmas están escritas sobre líneas horizontales que sirven como guías para las firmas.

Santiago de Chile, Agosto de 2012



BIOGRAFÍA



Nace un 7 de Agosto de 1986, hijo mayor de Juan Carlos Manzano y Mónica Reyes. Sus hermanos Juan Carlos, Nicolás y Alejandra, junto con su sobrina Antonia, conforman su familia. A la edad de 6 años ingresa al Colegio Teilhard de Chardin, en la comuna de La Florida, donde cursa su colegiatura completa. Durante estos años, comienza a nacer su inquietud por las ciencias, especialmente en el ámbito medioambiental, situación que lo lleva a decidirse por la carrera de Química Ambiental, en la Universidad de Chile, carrera a la que ingresa el año 2005. Es ahí donde estuvo por seis años y medio, hasta egresar en el año 2011. En el camino, conoce a muchas personas, de las cuales, un pequeño grupo se mantiene, hasta el día de hoy. Habiendo egresado, en ese mismo año, comienza a desarrollar su trabajo de titulación en el Laboratorio de Bioquímica Vegetal y Fitorremediación, de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile, lugar donde sigue trabajando hasta el día de hoy.

DEDICATORIA

A Mónica y Juan Carlos, mis padres.



AGRADECIMIENTOS

Es una gran cantidad de gente la que ha colaborado en la realización de este trabajo y me gustaría que nadie quedara fuera, así que haré lo posible.

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Claudia Ortiz, por darme la oportunidad de realizar mi Seminario de Título en el Laboratorio de Bioquímica Vegetal y Fitorremediación, donde encontré todas las herramientas necesarias para trabajar tranquilamente y un equipo de trabajo de lujo, integrado por mi compadre Guillermo, Daniel, Jovanka y por quienes ya no trabajan ahí, pero que cuando lo hicieron, siempre fueron de gran ayuda, mi amigo Jano, David y Karen. Y por supuesto, a Sofía, quien siempre tuvo una voluntad para ayudar enorme. A ellos también les debo mucho.

Tampoco quiero dejar de nombrar a todos los profesores de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago, que directa o indirectamente influyeron en este trabajo, pero principalmente a la Dra. María Angélica Rubio, al Dr. Ricardo Salazar, la Dra. Marcia Cazanga y a Marcela Vines.

Un grupo de personas muy importantes en mi vida lo conforman mis amigos y compañeros de la Facultad de Ciencias con quienes compartí largas jornadas de estudio y de carrete, pero principalmente de este último: Juanin, Pancho, Seba, Brillito, Sofía, Consue, Vitoco Cami, Luciano, Joe y muchos grandes personajes que habitan el Campus Juan Gómez Millas. Por otro lado, al gran y querido Núcleo (En especial al Nacho, Yayo, Piti, Alan), porque cada vez que necesité un respiro, por lo difícil que se hizo

trabajar en mi tesis, siempre me hicieron reír. También quiero incluir a mis queridas amigas, que me han acompañado durante muchísimos años, Flaquis, Daniela, Estefa y Ñoña. Y sin duda, hay alguien que no puede faltar, una persona muy especial, que apareció en mi vida al final de esta etapa universitaria, pero que no por eso deja de ser importante, ya que, me acompañó en la etapa crítica de mi carrera y me enseñó a creer en mí y en mis capacidades, gracias Dani.

Como no mencionar a mi familia, tíos, tías, primos, hermanos siempre pendientes de mí y en especial, los más importante, a mis padres: Mónica y Juan Carlos, quienes se desviven por mis hermanos, por la Anto y por mí y son los gestores de todo esto, que con amor, respeto, cariño, preocupación y paciencia han hecho de mí la persona que soy y de la cual me siento orgulloso de ser. Muchas gracias papás, los amo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes Generales	1
1.2. Impactos Ambientales de la Minería.....	4
1.2.1. Emisión de Polvo y Gases Contaminantes	5
1.2.2. Contaminación y Alteración de la Estructura del Suelo	5
1.2.3. Creciente Consumo de Agua	6
1.2.4. Residuos Industriales Líquidos (RILes) y Drenajes Ácidos de Mina (DAM)	7
1.3. Tratamiento y Disposición de RILes Mineros	8
1.4. Fitorremediación.....	10
1.4.1. Mecanismos de Fitorremediación	11
1.4.1.1. Fitoextracción.....	11
1.4.1.2. Rizofiltración.....	11
1.4.1.3. Fitoestabilización	11
1.4.1.4. Rizodegradación.....	12
1.4.1.5. Fitodegradación.....	12
1.4.1.6. Fitovolatilización.....	13
1.4.2. Criterios de Selección	13
1.4.3. Absorción de Metales.....	15
1.4.4. Respuesta de la planta ante altas concentraciones de metales	18
1.5. Hipótesis.....	20
1.6. Objetivos	20
1.6.1. Objetivo General	20
1.6.2. Objetivos Específicos.....	21
II. MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1. Sistema de tratamiento vegetal con RIL minero, y con solución de CuSO ₄ 15µM	22
2.2. Recolección de Muestras.....	25
2.3. Determinación de Parámetros Físico Químicos	27
2.4. Determinación de metales por ICP-OES	28
2.4.1. Preparación de las Muestras de Sustratos de RIL, Solución de Cobre y Controles.....	28

2.4.2. Preparación de las Muestras de Tejido Vegetal	29
2.4.3. Cuantificación de Metales Mediante ICP-OES	30
2.5. Determinación de Ácidos Orgánicos en Tejido Vegetal y en Muestras de Sustratos	31
2.5.1. Recolección de Muestras	31
2.5.2. Extracción de Ácidos Orgánicos desde las Muestras Vegetales	32
2.5.3. Determinación de Ácidos Orgánicos Mediante HPLC de Exclusión Iónica	33
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.1. Observaciones y Descripción de Cambios Fenotípicos de las Plantas Durante el Tratamiento	35
3.2. Contenido de Metales en Medios Líquidos y Tejido Vegetal	40
3.2.1. Hierro	40
3.2.2. Zinc.....	42
3.2.3. Manganeso	45
3.2.4. Cobre	48
3.3. Contenido de Ácidos Orgánicos en Sustratos y Tejido Vegetal	53
3.3.1. Exudación de Ácidos Orgánicos	53
3.3.2. Concentración de Ácidos Orgánicos en Raíces de <i>Phragmites australis</i>	55
3.3.2.1. Concentración de Ácido Acético en Raíces de <i>Phragmites australis</i>	58
3.3.2.2. Concentración de Ácido Málico en Raíces de <i>Phragmites australis</i>	60
3.4. Parámetros Físico-Químicos	63
3.4.1. Temperatura	63
3.4.2. Conductividad.....	64
3.4.3. Oxígeno Disuelto (OD).....	65
3.4.4. pH	66
3.4.5. Potencial de Óxido Reducción (POR)	68
3.5. Especiación de Cobre	69
IV. CONCLUSIONES.....	74
V.REFERENCIAS.....	76
VI. ANEXOS	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de las muestras y rotulación	23
Tabla 2. Observaciones realizadas en plantas bajo tratamiento con agua Milli-Q (Control)	35
Tabla 3. Observaciones realizadas en plantas bajo tratamiento con solución Phostrogen 0,3 g/L	37
Tabla 4. Observaciones realizadas en plantas bajo tratamiento con RIL minero	38
Tabla 5. Observaciones realizadas en plantas bajo tratamiento con solución de CuSO ₄ 15µM.....	39
Tabla 6. Concentración de Fe en sustratos	40
Tabla 7. Tiempo de Retención (t _R) de los Ácidos Orgánicos estudiados.....	57
Tabla 8. Concentraciones máximas de Cu y Ácido Málico	72
Tabla 9. Concentración de metales en RIL “Talabre”.....	91
Tabla 10. Límites de detección y cuantificación para cada método analítico.....	95
Tabla 11. Compuestos seleccionados y rango de concentración de las curvas de calibración.....	96
Tabla 12. Límites de Detección y Cuantificación para análisis de Ácidos Orgánicos	99
Tabla 13. Concentración de Fe en sustratos	100
Tabla 14. Concentración Cu en los distintos sustratos líquidos utilizados	100
Tabla 15. Concentración Zn en los distintos sustratos líquidos utilizados.....	100
Tabla 16. Concentración Mn en los distintos sustratos líquidos utilizados	101
Tabla 17. Concentración efectiva de Cu en Raíces de <i>Phragmites australis</i> bajo tratamiento con RIL “Talabre”	101
Tabla 18. Concentración efectiva de Cu en Hojas de <i>Phragmites australis</i> bajo tratamiento con RIL “Talabre”	101
Tabla 19. Concentración efectiva de Zn en Raíces de <i>Phragmites australis</i> bajo tratamiento con RIL “Talabre”	102
Tabla 20. Concentración efectiva de Zn en Hojas de <i>Phragmites australis</i> bajo tratamiento con RIL “Talabre”	102

Tabla 21. Concentración efectiva de Mn en Raíces de <i>Phragmites australis</i> bajo tratamiento con RIL “Talabre”	102
Tabla 22. Concentración efectiva de Mn en Hojas de <i>Phragmites australis</i> bajo tratamiento con RIL “Talabre”	102
Tabla 23. Concentración efectiva de Fe en Raíces de <i>Phragmites australis</i> bajo tratamiento con RIL “Talabre”	103
Tabla 24. Concentración efectiva de Fe en Hojas de <i>Phragmites australis</i> bajo tratamiento con RIL “Talabre”	103
Tabla 25. Concentración efectiva de Cu en Raíces de <i>Phragmites australis</i> bajo tratamiento con Solución de CuSO ₄ 15µM	103
Tabla 26. Concentración efectiva de Cu en Hojas de <i>Phragmites australis</i> bajo tratamiento con Solución de CuSO ₄ 15µM	104
Tabla 27. Concentración efectiva de Zn en Raíces de <i>Phragmites australis</i> bajo tratamiento con Solución de CuSO ₄ 15µM	104
Tabla 28. Concentración efectiva de Zn en Hojas de <i>Phragmites australis</i> bajo tratamiento con Solución de CuSO ₄ 15µM	104
Tabla 29. Concentración efectiva de Mn en Raíces de <i>Phragmites australis</i> bajo tratamiento con Solución de CuSO ₄ 15µM	104
Tabla 30. Concentración efectiva de Mn en Hojas de <i>Phragmites australis</i> bajo tratamiento con Solución de CuSO ₄ 15µM	105
Tabla 31. Concentración efectiva de Fe en Raíces de <i>Phragmites australis</i> bajo tratamiento con Solución de CuSO ₄ 15µM	105
Tabla 32. Concentración efectiva de Fe en Hojas de <i>Phragmites australis</i> bajo tratamiento con Solución de CuSO ₄ 15µM	105
Tabla 33. Factor de Translocación de cobre en raíces de <i>P. australis</i> tratadas con RIL “Talabre” ..	106
Tabla 34. Factor de Translocación de cobre en raíces de <i>P. australis</i> tratadas con solución de CuSO ₄ 15µM	106
Tabla 35. Factor de Translocación de cobre en raíces de <i>P. australis</i> tratadas con Agua Milli-Q....	107
Tabla 36. Factor de Translocación de cobre en raíces de <i>P. australis</i> tratadas con Phostrogen.....	107

Tabla 37. Contenido de Ácido Acético en Raíces de <i>Phragmites australis</i> según tratamiento al cual fueron sometidas	108
Tabla 38. Contenido de Ácido Málico en Raíces de <i>Phragmites australis</i> según tratamiento al cual fueron sometidas	108
Tabla 39. Temperatura de los distintos sustratos líquidos utilizados	109
Tabla 40. Sólidos Totales Disueltos en los distintos sustratos líquidos utilizados	109
Tabla 41. Conductividad de los distintos sustratos líquidos utilizados	109
Tabla 42. Oxígeno disuelto en los distintos sustratos líquidos utilizados	110
Tabla 43. pH de los distintos sustratos líquidos utilizados	111
Tabla 44. Potencial de Óxido Reducción de los distintos sustratos líquidos utilizados.....	111
Tabla 45. Composición porcentual de nutriente Phostrogen	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Participación sectorial del PIB en el año 2007	2
Figura 2. Producción mundial de Cobre	3
Figura 3. Proyección de la inversión minera en Chile	4
Figura 4. Evolución del consumo de agua por actividad minera según regiones	7
Figura 5. Tranque de Relaves “Los Quillayes”	9
Figura 6. Mecanismos de incorporación de Hierro	16
Figura 7. Esquema del sistema de tratamiento vegetal	23
Figura 8. Arreglo experimental	24
Figura 9. Distribución de muestras de tejido vegetal y de sustrato	26
Figura 10. Muestra de planta al final del tratamiento control con Agua Milli-Q	36
Figura 11. Muestra de planta al final del tratamiento control con Phostrogen 0,3g/L	37
Figura 12. Muestra de planta al final del tratamiento con RIL minero	38
Figura 13. Muestra de planta al final del tratamiento con solución de CuSO_4 15 μM	39
Figura 14. Absorción de Fe por raíces de <i>Phragmites australis</i>	41
Figura 15. Absorción de Fe por hojas de <i>Phragmites australis</i>	42
Figura 16. Variación de contenido de Zinc en los distintos sustratos	43
Figura 17. Absorción de Zn por raíces de <i>Phragmites australis</i>	44
Figura 18. Absorción de Zn por hojas de <i>Phragmites australis</i>	44
Figura 19. Variación de contenido de Manganeso en los distintos sustratos	46
Figura 20. Absorción de Mn por raíces de <i>Phragmites australis</i>	46
Figura 21. Absorción de Mn por hojas de <i>Phragmites australis</i>	47
Figura 22. Variación de contenido de Cobre en los distintos sustratos	49
Figura 23. Absorción de Cu por raíces de <i>Phragmites australis</i>	49
Figura 24. Absorción de Cu por hojas de <i>Phragmites australis</i>	51

Figura 25. Factor de Translocación de Cu por <i>Phragmites australis</i>	51
Figura 26. Señal cromatográfica del estándar de Ácido Acético 500 mgL ⁻¹	55
Figura 27. Señal cromatográfica del estándar de Ácido Málico 300 mgL ⁻¹	56
Figura 28. Señal cromatográfica de la muestra T ₄ Phost A	56
Figura 29. Señal cromatográfica de la muestra T ₂ Ril A	57
Figura 30. Contenido de Ácido Acético en raíces de <i>Phragmites australis</i>	59
Figura 31. Contenido de Ácido Málico en raíces de <i>Phragmites australis</i>	61
Figura 32. Variación de la temperatura a lo largo del tiempo en las distintas soluciones	63
Figura 33. Variación de la conductividad a lo largo del tiempo en las distintas soluciones	64
Figura 34. Variación del OD a lo largo del tiempo en las distintas soluciones	65
Figura 35. Variación del pH a lo largo del tiempo en las distintas soluciones	67
Figura 36. Variación del POR a lo largo del tiempo en las distintas soluciones	68
Figura 37. Diagrama Eh(V) v/s pH del sistema Cu-O-H	70
Figura 38. Especiación y variación de contenido de Cobre en los distintos sustratos	70
Figura 39. Esquema del funcionamiento de las proteínas transportadoras de Cu (COPTs)	71
Figura 40. Curva de Calibración para Cobre	92
Figura 41. Curva de Calibración para Zinc.....	92
Figura 42. Curva de Calibración para Manganeso	93
Figura 43. Curva de Calibración para Hierro para concentraciones bajas	93
Figura 44. Curva de Calibración para Hierro para concentraciones altas	94
Figura 45. Curva de Calibración para Ácido Acético	97
Figura 46. Curva de Calibración para Ácido Málico	97
Figura 47. Curva de Calibración para Ácido Oxámico	98
Figura 48. Curva de Calibración para Ácido Fórmico	99

RESUMEN

Hoy en día, la Gran Minería del Cobre, ocupa un rol fundamental en la economía del país, siendo una de las actividades que más aporta al Producto Interno Bruto nacional. Sin embargo, el gran crecimiento que ha experimentado a lo largo de los últimos 50 años, ha traído consigo un importante deterioro al medio ambiente, el cual necesita ser remediado. Uno de los aspectos más notables de la contaminación producida por la minería, tiene que ver con los Residuos Líquidos que esta genera, los cuales contienen un alto contenido de metales pesados, que de no ser eliminados, pueden causar serios daños a la población y al ambiente.

En el presente trabajo de Seminario de Título, se estudió la absorción de metales pesados y la exudación de ácidos orgánicos, en la especie *Phragmites australis*, utilizada en fitorremediación de RILes. Para esto se realizaron cinéticas de absorción de Cobre (Cu), Zinc (Zn), Manganeso (Mn) y Hierro (Fe) y de exudación de ácidos orgánicos en plantas mantenidas durante 30 días en una solución de CuSO_4 15 μM , y en plantas tratadas con RIL proveniente del Tranque de relaves Talabre. Adicionalmente, se cuantificó la presencia de ácidos orgánicos en los tejidos de la raíz y se estudió la relación entre la acumulación de éstos compuestos en el tejido vegetal y el factor de translocación de metales entre la raíz y la parte aérea de la especie en estudio.

También se determinó la variación del pH y el potencial redox de las soluciones de tratamiento y la especiación del cobre en el RIL, como consecuencia de los cambios en estos parámetros Físico-Químicos. Para la realización de este estudio, las muestras

fueron analizadas mediante espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente y mediante cromatografía HPLC, se detectó y cuantificó los ácidos orgánicos.

Los resultados indicaron que *Phragmites australis* presenta selectividad en la absorción de metales, ya que, del total de elementos estudiados, solamente incorporó cobre en su tejido. Además, se encontró una importante cantidad de Ácido Málico en el tejido radicular de *P. australis*, el que estaría involucrado en la retención y translocación de este catión al interior de la planta.

ABSTRACT

Nowadays, the Great Copper Mining occupies a key role in the Chilean economy, being one of the activities with the largest contribution to the national Gross Domestic Product. However, the high growth experienced over the past 50 years, has led to a significant degradation of the environment, which needs to be remediated. One of the most remarkable aspects of pollution caused by mining is related to the liquid waste that it generates, which contain a high amount of heavy metals in solution, which if not removed, can cause serious damage to the people and to the environment.

In the present Graduation Seminar, the absorption of heavy metals and organic acid exudation were studied in the *Phragmites australis* species, which is used in phytoremediation of Industrial Liquid Wastes (ILW). For this purpose, kinetics of copper (Cu), zinc (Zn), manganese (Mn) and iron (Fe) absorption and kinetics of organic acids exudation were performed in *P. australis* maintained for 30 days in a solution of CuSO_4 $15\mu\text{M}$, and a ILW from the tailings pond "Talabre". Additionally, the presence of organic acids in root tissues was quantified, seeking to understand the effect of accumulation of these compounds over vegetable tissue on the metal translocation factor between the root and the shoot of the plants under study.

The variation of pH and redox potential of the treatment solution and speciation of copper on the ILW was also determined, as a result of changes in these physicochemical parameters.

For this study, samples were analyzed by optical emission spectroscopy inductively coupled plasma (ICP-OES), for metal analysis and by HPLC for organic acids analysis.

Among the remarkable results, it can be mentioned that *P. australis* shows selectivity in terms of metal absorption, because, from every studied metal, only copper was incorporated in the tissue. Furthermore, a significant amount of malic acid in root tissue of *P. australis* was found, which would be involved in the retention and translocation of this metal into the plant.

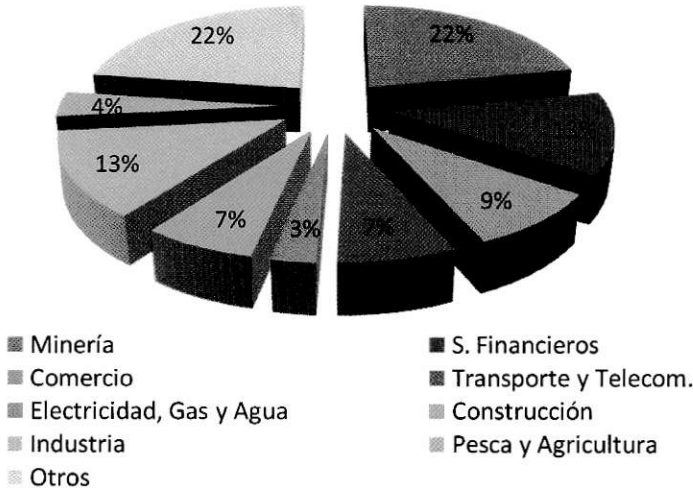
I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes Generales

La minería representa para nuestro país un pilar fundamental en su economía. Esta comienza a desarrollarse desde el siglo XIX, una vez que se declara la independencia, con la explotación de minerales como plata y carbón en Chañarcillo y Lota, respectivamente. Posterior a esto y como producto de la finalización de la Guerra del Pacífico, se comienzan a explotar los yacimientos de salitre, ubicados en las provincias de Antofagasta y Tarapacá. Entre 1880 y 1930, Chile se transformó en el mayor productor de salitre, constituyéndose este, en el producto más importante de la economía chilena. En el intertanto, comienza a desarrollarse lo que es conocido como la Gran Minería del Cobre. Si bien, esta no alcanzaría la trascendencia actual hasta pasada la década del 30, el cobre toma importancia gracias el gran desarrollo que tuvo la industria eléctrica en E.E. U.U., cerca del 1900. En esos años se iniciaron las faenas en El Teniente (1904) y posteriormente en Chuquibambilla (1911). Debido al ocaso de la minería del salitre y el desarrollo de la industria extractiva del cobre, este último logró posicionarse como el principal producto de exportación del país (Ministerio de Minería, 2002).

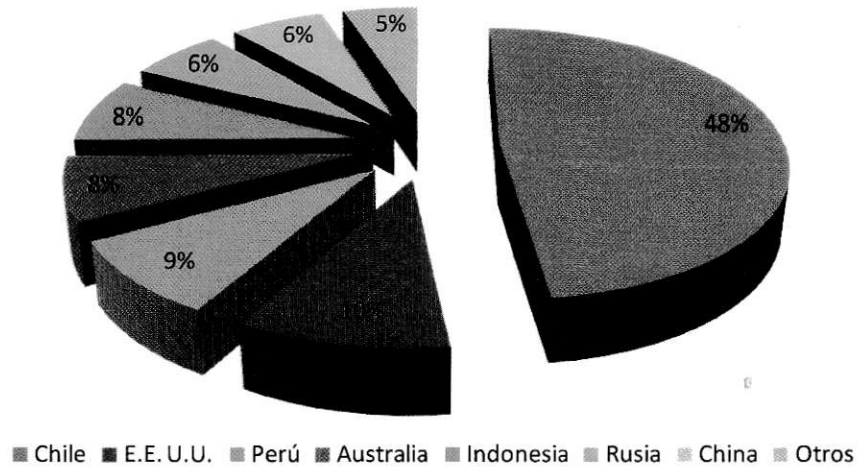
Actualmente, la minería del cobre implica para el país un aporte cercano al 22% del Producto Interno Bruto (PIB), bastante mayor al porcentaje de otras actividades económicas de importancia, como la pesca o la agricultura (Figura 1). Pero esto no es todo, ya que, si avanzamos hacia un plano global, la participación de Chile en la

producción mundial de Cobre alcanza prácticamente la mitad de esta (Figura 2), quintuplicando a potencias como E.E. U.U., Australia, China y Rusia (Consejo Minero, 2007).



Fuente: Banco Central e Informe Económico Minero, 2007

Figura 1: Participación sectorial del PIB en el año 2007



Fuente: Outlook of Copper Industry, GasAtacama

Figura 2: Producción mundial de Cobre, año 2007

El constante avance de la tecnología, el aumento sostenido de la población y la irrupción de países como China en la demanda de este metal, ha facilitado el crecimiento de la industria minera en Chile, la cual crece a pasos agigantados. Estudios realizados por diversas entidades señalan que la inversión en el sector minero superaría los 40 mil millones de US\$ en el período comprendido entre el año 2008 -2020, superando el valor invertido en los 30 años precedentes, el cual alcanzó los 37 mil millones de US\$ (Figura 3).

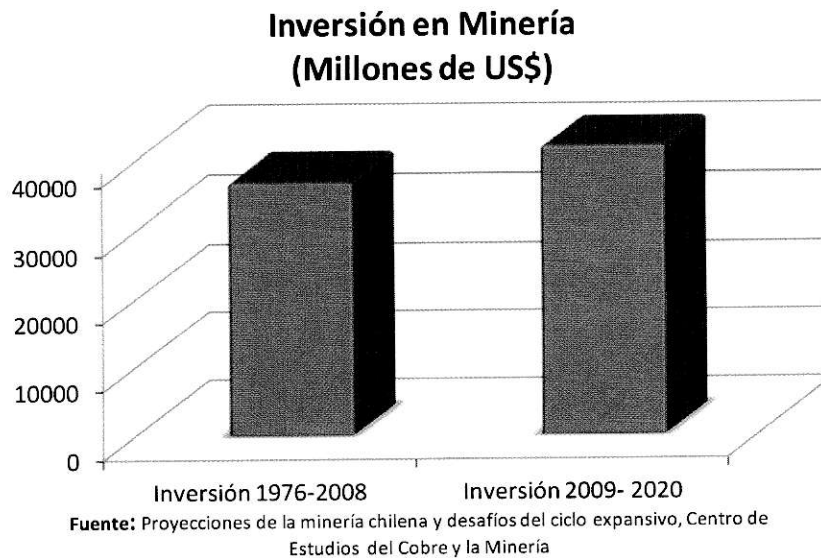


Figura 3: Proyección de la inversión minera en Chile.

1.2. Impactos Ambientales de la Minería

Considerando todos los beneficios económicos que la minería del cobre puede traer al país, es importante que este crecimiento se mantenga en el tiempo, de manera que se logre alcanzar el estatus de país desarrollado. Sin embargo, no hay que dejar de lado la otra cara de la minería. La actividad minera, representa un para la salud de las personas y para el medio ambiente, si no se logran tomar las medidas necesarias para evitar o disminuir al máximo estos efectos. Ésta ha aumentado la ocurrencia y persistencia de contaminación por elementos traza en la superficie terrestre (García-Lorenzo y col, 2012). Considerando las actividades básicas que se realizan en una instalación minera, es decir, extracción, molienda, chancado, fundición, lixiviación, flotación y procesos de electrometalurgia, entre otras, es posible esperar que estas

impactarán de distinta manera las 3 diferentes matrices ambientales: aire, agua y suelo, siendo las dos últimas las más afectadas. Entre estos impactos se pueden nombrar:

1.2.1. Emisión de polvo y gases contaminantes

Es ocasionado por el movimiento de camiones, tronaduras, las operaciones de molienda y chancado, las cuales liberan una enorme cantidad de material particulado, con un contenido variable de metales pesados. Además de esto, las emisiones procedentes de las fundiciones implican un gran aporte de gases contaminantes como el dióxido de azufre (SO₂) y los óxidos de nitrógeno (NO_x). El problema principal se ocasiona por el transporte atmosférico de todas estas sustancias, las que según las condiciones climáticas y geográficas del lugar, pueden afectar diversos ecosistemas como ríos y cuerpos lacustres (Narváez y col, 2007) y zonas agrícolas (Miller y col, 2004), como a los pobladores de zonas cercanas (Barrios y col, 2004; García, 2010)

1.2.2. Contaminación y alteración de la estructura del suelo

La extracción de minerales, principalmente en minas de rajo abierto genera una gran perturbación del suelo. El cambio de las condiciones a las cuales se ve expuesta una roca, pasando de estar bajo la superficie, a estar expuesta a condiciones atmosféricas, podría implicar un cambio en la especiación de metales o cualquier compuesto que se encontraba retenido en el suelo, sin que este presentara mayor riesgo. Por otro lado, como se explicará en el punto 1.2.4., Los Drenajes Ácidos de Mina (DAM), también pueden movilizar estos elementos presentes en el suelo (Lei y col, 2010).

1.2.3. Creciente consumo de agua

Sin contar el suministro de agua potable, el uso que se le da al agua en la minería, se relaciona principalmente con el transporte de minerales y residuos en los procesos de flotación y lixiviación. También se utiliza, aunque en menor medida, en los procesos de chancado, molienda, transporte de concentrados y para el abatimiento de polvo (Consejo Minero, 2008). La Figura 4, ilustra la evolución del consumo de agua entre los años 2006 y 2009 para las regiones I, II, III, IV, V, VI y Metropolitana. En ella se puede ver que el consumo de dicho bien, ha ido en aumento, sobre todo en zonas desérticas y semi-desérticas del país, situación preocupante, ya que, el sector minero compite directamente con los pobladores que precisan del agua como un bien básico.

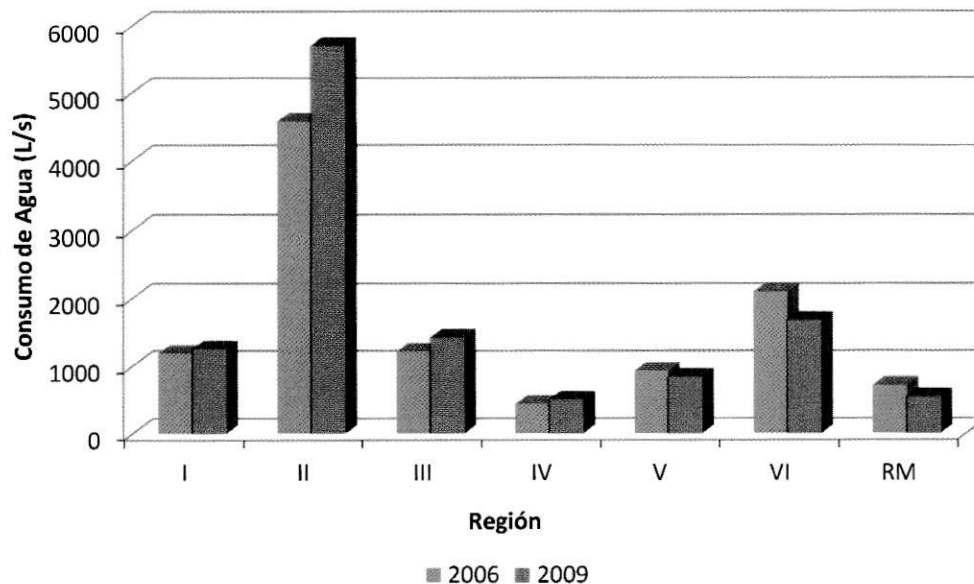


Figura 4: Evolución del consumo de agua por actividad minera según regiones.

1.2.4. Residuos Industriales Líquidos (RILes) asociados a la actividad minera

Existen tres tipos de RILes producidos a partir del proceso productivo minero: aquellos derivados del proceso de extracción, que es un efluente generado por escorrentía que proviene de la mina (aguas mina) o por circulación interna de agua en la mina, que puede ser de origen subterráneo (afloramientos), o de precipitaciones. A dichos flujos se les llama Drenajes Ácidos de Mina (DAM). Los DAM, típicamente poseen un pH altamente ácido y niveles elevados de metales disueltos. Por otro lado, existen los RILes derivados del proceso de concentración por flotación selectiva, donde a partir de un mineral que contiene entre un 1% a 2% en cobre, se obtiene un concentrado con un 32% a 35% de mineral. El agua del proceso, además es utilizada para transportar los sólidos o ganga hasta su punto de disposición final, tranque de

Relave, donde se evapora el agua y/o se vuelve a bombear al proceso. Una tercera fuente de residuos líquidos mineros se constituye en el proceso de refinación, el cual genera efluentes a partir de los procesos de fundición y electrorrefinación, específicamente. Aunque el proceso de fundición en sí no produce RILES, son sus operaciones unitarias anexas que sirven de apoyo al proceso de fundición, las que generan desechos líquidos, como es el caso de las plantas de ácido, lavadores de gases, torres de enfriamiento y centrales termoeléctricas, entre otras. Durante la electrorrefinación se generan RILes debido a las purgas, que pueden ser recirculadas o tratadas.

En general, los RILes derivados de los procesos de extracción y de concentración contienen material molido y agua con reactivos y se caracterizan por contener altas concentraciones de metales pesados en solución y sulfatos. Estos metales son muy tóxicos para los seres vivos, ya que son difíciles de eliminar del ambiente natural (Ning y col, 2010) e incluso pueden formar contaminantes secundarios, afectando principalmente a los ambientes acuáticos (Wu y col, 2002). Por su parte los DAM pueden promover la lixiviación y la movilización de metales contenidos en las rocas descartadas, por lo que la contaminación por metales pesados puede verse aumentada (Kwong y col, 2007; Lei y col, 2010; Makshev, 2010).

1.3. Tratamiento y Disposición de RILes Mineros

Históricamente, la principal forma de disposición de los riles de extracción y concentrado, es el acopio en tranques de Relave (Figura 5), que son construcciones similares a un embalse, hechas especialmente para recibir este tipo de desechos y evitar

que estos lleguen a cursos de agua naturales. En ellos, los sólidos finos sedimentan, formándose en la superficie una laguna de aguas claras.



Figura 5. Tranque de Relaves “Los Quillayes”, Minera Los Pelambres.

La industria minera ha buscado distintas alternativas para hacer más eficiente el uso del agua. Actualmente, son dos las formas más recurrentes de alcanzar esto: (1) la disposición de desechos en pasta o pulpa de relaves, donde se puede extraer aproximadamente hasta un 80% del agua contenida en un relave convencional, y (2) la construcción de plantas de tratamiento de relaves, para recuperar el mineral que queda en el relave y reincorporarlo al proceso productivo. Sin duda alguna, todo avance que permita mejorar los procesos y hacerlos más amigables con el medio ambiente será bien recibido, pero siguen faltando mecanismos que permitan solucionar el problema de fondo: tratar las aguas, dejándolas aptas para descargas a cuerpos naturales de agua, en otras palabras, cumplir con las normas de emisión aplicables a la minería: 1) D.S.90, referido a descargas de RILes a cursos o cuerpos de aguas superficiales; 2) D.S.46, en

caso de que estos RILes se infiltren hacia cuerpos de agua subterráneos; y 3) D.S.609 relacionado con descargas a la red de alcantarillado público.

En este escenario figura la fitorremediación como una importante opción para revertir los efectos medioambientales negativos producidos por la minería del cobre y las actividades industriales en general.

1.4. Fitorremediación

La fitorremediación es definida como el uso de vegetación para abatir contaminantes en suelos, sedimentos, aguas superficiales y aguas subterráneas, teniendo como objetivos la eliminación del contaminante o la destrucción, control y la contención, o ambas (USEPA, 2001; McCutcheon & Schnoor, 2003). Otros autores la definen como una tecnología que busca depurar suelos, sedimentos, aguas superficiales y subterráneas, con la utilización de plantas capaces de adaptarse a las nuevas condiciones otorgadas por los contaminantes y eliminar, retener, o disminuir la toxicidad de éstos (Carpena y col, 2007). Algunas de las ventajas que presenta la fitorremediación, dicen relación con sus bajos costos asociados, su efectividad y su carácter biotecnología sustentable (Vivas y col, 2003) La fitorremediación comprende una serie de técnicas, las cuales dependerán del mecanismo utilizado por la planta para depurar el medio requerido.

La United State Environmental Protection Agency (USEPA), ha descrito 6 mecanismos de fitorremediación, los cuales se definen a continuación (USEPA, 2000).

1.4.1. Mecanismos de Fitorremediación

1.4.1.1. Fitoextracción

Es la absorción de contaminantes por raíces de plantas y su translocación dentro de ellas. Generalmente, los contaminantes son eliminados cosechando las hojas de estas plantas. Esta tecnología de concentración es aplicada principalmente a suelos contaminados con metales.

1.4.1.2. Rizofiltración

Este fenómeno se basa en la adsorción o precipitación sobre las raíces de plantas, o la absorción en las raíces de los contaminantes que están en solución, alrededor de la zona de las raíces, debido a procesos bióticos o abióticos. La absorción, concentración y translocación en la planta, puede ocurrir, dependiendo del contaminante. En algunas ocasiones, la precipitación de los metales es facilitada por compuestos exudados por la planta. La rizofiltración, en primera instancia, resulta en la contención del contaminante, donde estos son inmovilizados o acumulados sobre o dentro de la planta. Luego, los contaminantes se eliminan removiendo la planta.

1.4.1.3. Fitoestabilización

Se define como (1) la inmovilización de un contaminante a través de la absorción y acumulación por las raíces, adsorción en las raíces o la precipitación dentro de la raíz de una planta y (2) el uso de plantas y sus raíces para prevenir la migración de contaminantes vía erosión hídrica, eólica y/o lixiviación. La fitoestabilización ocurre a

través de la química y la microbiología de la rizósfera y/o la alteración del medio o la química del contaminante. El pH del suelo puede ser cambiado por exudados de raíces o por la producción de CO₂. La fitoestabilización puede cambiar la solubilidad y la movilidad o impactar la disociación de compuestos orgánicos. El ambiente afectado por la planta puede convertir metales desde un estado de oxidación soluble a uno insoluble. Los procesos químicos que se dan en este fenómeno son: sorción, precipitación, complejación o reducción de la valencia del metal. Las plantas pueden ser utilizadas, incluso, para reducir la erosión de suelos contaminados por metales.

1.4.1.4. Rizodegradación

Corresponde a la descomposición de contaminantes orgánicos a través de actividad microbiana, la cual es enaltecida por la presencia de las raíces. La rizodegradación es también conocida como degradación asistida por plantas y biorremediación asistida por plantas.

1.4.1.5. Fitodegradación

También conocida como fitotransformación, corresponde a la degradación de contaminantes absorbidos por plantas, a través de los procesos metabólicos propios de la planta, o a la degradación de contaminantes externos a la planta, por la acción de enzimas u otros compuestos producidos por la planta. El mecanismo principal se basa en la absorción y la metabolización. Adicionalmente, la degradación puede ocurrir fuera de la planta, debido a la liberación de compuestos que causan dicha transformación.

Cualquier degradación causada por microorganismos asociados a las plantas o influenciados por ellas, se considera rizodegradación.

1.4.1.6. Fitovolatilización

Se define como la incorporación y transpiración de un contaminante, por la planta, con la eliminación del contaminante o algún producto de descomposición de este, hacia la atmósfera. En términos sencillos, la fitovolatilización opera absorbiendo el contaminante, metabolizándolo y transpirándolo.

1.4.2. Criterios de selección

La efectividad de la técnica seleccionada está supeditada en parte a la buena elección de la planta a utilizar, es decir, conocer si esta es capaz de tolerar los contaminantes a los cuales deberá enfrentarse y bajo qué concentraciones de éstos, ya que, cada especie presenta distinta afinidad para cada metal; o los rangos de los distintos parámetros fisicoquímicos en los que la planta puede desenvolverse de mejor manera (Kidd y col, 2007), lo que, determinará la biodisponibilidad del metal y por ende su tasa de absorción.

En el caso de este trabajo, los contaminantes a tratar corresponden a un grupo de metales pesados contenidos en RIL minero. Desde un punto de vista químico, el término “Metal Pesado” se adscribe exclusivamente, a los metales de transición, con una masa atómica mayor a 20 y con una gravedad específica (densidad relativa) mayor a 5, aunque en términos biológicos este se refiere a una serie de metales o metaloides que pueden ser

tóxicos para plantas o animales en concentraciones muy bajas (Rascio & Navari-Izzo, 2011). Algunos de estos metales, como As, Cd, Hg, Pb o Se, no son esenciales, ya que no se les atribuye ninguna función fisiológica en plantas. Por otro lado el Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni y Zn, son elementos esenciales, debido a que son requeridos en para el desarrollo normal de las plantas.

Es importante notar que existen dos clases de plantas, dependiendo de la respuesta que tienen éstas frente a la exposición a altas concentraciones de metales. De esta forma, están las plantas hiperacumuladoras y las no acumuladoras. El primer grupo se compone de plantas capaces de retener cantidades mayores a: 10.000 mg/Kg de peso seco de tejido de Manganeso y Zinc; 1.000 mg/Kg p.s. de Cobalto, Cobre, Plomo, Níquel, Arsénico y Selenio y; 100 mg/kg de Cadmio (Marín & Morales, 2008) ó hasta alcanzar concentraciones superiores al 2% de su materia seca (Kidd y col, 2007). Por su parte, las plantas no acumuladoras, normalmente tienen concentraciones de metales 100 veces menores a las hiperacumuladoras (Chehregani y col, 2009). En plantas hiperacumuladoras se ha observado que, por ejemplo, la exudación de los ácidos orgánicos (A.O.) cítrico, málico y oxálico, propicia la formación de complejos Metal-AO, facilitando su incorporación y retención (Boominathan & Doran, 2003). Por otro lado, en plantas no acumuladoras, se ha visto que la secreción de AO, también facilita la formación de complejos, pero que terminan precipitando, quedando no disponibles (Ma y col, 2005). Desde el punto de vista de las plantas hiperacumuladoras, los A.O. son considerados compuestos importantes en fitorremediación, ya que, como ya se mencionó, juegan un rol significativo en la solubilización de los metales que se

encuentran en el medio. De estos ácidos, probablemente el cítrico, oxálico y málico son los más importantes, dada su alta capacidad para solubilizar una gran variedad de especies metálicas y por su alta capacidad para quelar este tipo de cationes (Jones, 1998). Sin embargo, la presencia y abundancia de los Ácidos Orgánicos (A.O.) es extremadamente variable y está relacionado principalmente con la especie de planta, la edad y el ambiente físico-químico que la rodea (Curl & Trueglove, 1986).

1.4.3. Absorción de Metales

La absorción de metales en las plantas es un proceso que ocurre en forma natural, debido a que algunos de éstos, en bajas cantidades, actúan como nutrientes, siendo tan importantes como lo son los macronutrientes, a pesar de no ser requeridos en la misma proporción (Kirkby & Römheld 2007). Estos metales cumplen funciones tan variadas como formar parte de enzimas, clorofila, cofactores y algunas proteínas. La entrada de estos metales a través de la membrana plasmática, está comandada por proteínas transportadoras y sitios de unión intracelular de alta afinidad, que hacen las veces de canales, permitiendo el ingreso de los metales (Graham & Stangoulis, 2003).

Se han identificado muchas clases de proteínas relacionadas con el transporte de metales desde el suelo hacia la raíz de la planta, siendo una de las clases más comunes de proteínas, las ATPasas de metales pesados del tipo CPx, que se relacionan con el mantenimiento de la homeostasis metal-ion y con el nivel de tolerancia. Esta clase de proteínas ha sido aislada en una amplia gama de especies vegetales y se han visto involucradas tanto en el transporte de metales esenciales, como de metales

potencialmente tóxicos, como Cu, Zn, Cd y Pb a través de las membranas celulares (Yang y col, 2005).

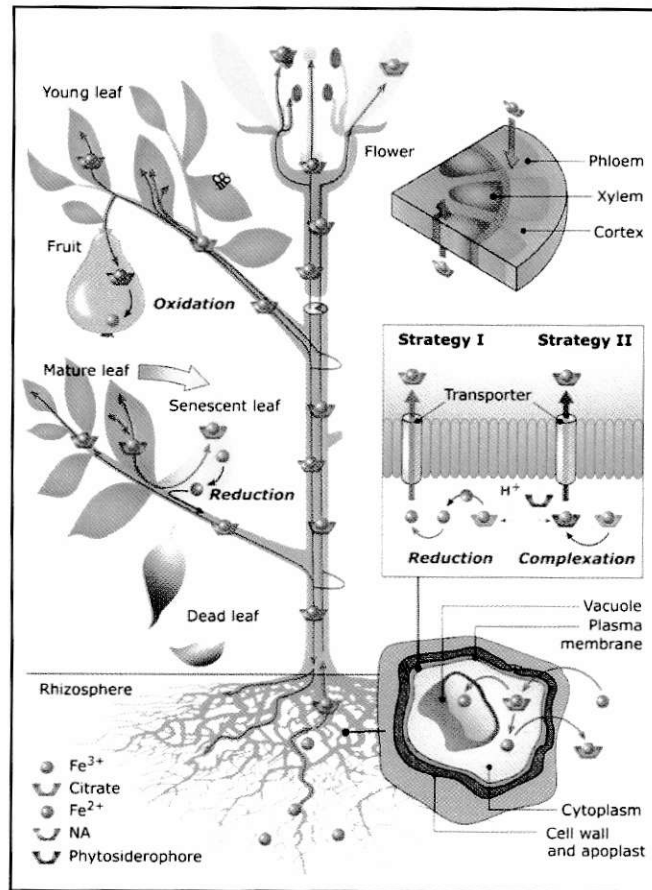


Figura 6: Mecanismos de incorporación de Hierro (Blanckenburg y col, 2009).

En cuanto a los mecanismos más estudiados, se encuentra el de absorción de Hierro (Fe). Como muestra la Figura 6, las plantas poseen 2 estrategias para incorporar este metal. La Estrategia I, utilizada principalmente por monocotiledóneas no gramíneas y dicotiledóneas, se basa en la disminución del pH en la rizósfera, realizada principalmente a través de la excreción de protones, provenientes de una ATPasa

asociada a la membrana plasmática y en menor medida a la exudación de ácidos orgánicos de baja masa molar. Esta disminución del pH solubiliza el Fe (III) y promueve la reducción del mismo a Fe (II) a través de la acción de proteínas reductoras asociadas a las membranas celulares (García y col, 2011). Por otro lado, en la Estrategia II, utilizada en mayor medida por las gramíneas, se excretan fitosideróforos, aminoácidos no proteínicos, que solubilizan los iones Fe (III) formando un complejo Fe-fitosideróforo y facilitando así el ingreso del Hierro a la planta (Harada y col, 2007). Estos fitosideróforos pueden acarrear también otros cationes como el Zn, Mn y Cu, en caso de encontrarse con una deficiencia de Fe en el medio (Blanckenburg y col, 2009).

Además de los mecanismos propios de las plantas para incorporar metales a su organismo, existen factores químicos que también son relevantes frente a los procesos de absorción. Los metales en el suelo, se encuentran de distintas maneras: en solución, complejados con materia orgánica u ocluidos en óxidos e hidróxidos de Fe, Al y Mn, siendo la mayoría de estas, formas que no están disponibles para las plantas. Por esta razón, es que las condiciones del medio deben ser alteradas para facilitar la fitoextracción (Nascimento & Xing, 2006). En ese sentido, se ha demostrado que la aplicación de Ácido Etilendiaminotetracético (EDTA), aumenta la eficiencia de absorción de Plomo, Cobre, Cadmio, Níquel y Zinc en raíces de *Brassica juncea* (Blaylock y col, 1997). Por otro lado, se ha demostrado que la adición de ácidos orgánicos de baja masa molar o sus sales en concentraciones de 10 mmol/kg mejora significativamente la movilidad de Cadmio (Cd), Plomo (Pb) y Zinc (Zn) (Vesely y col, 2011).

1.4.4. Respuesta de la planta ante altas concentraciones de metales

Pequeñas concentraciones de estos últimos elementos no deberían traer consecuencias negativas para las plantas, pero ¿Qué ocurre cuando las concentraciones de estos elementos en el suelo son más altas de lo normal y se encuentran solubles? Para poder adaptarse a las distintas y nuevas condiciones con las cuales se encuentran en el medio, determinadas principalmente por las actividades antrópicas, las plantas en general, han debido desarrollar mecanismos que les permitan tolerar estas nuevas condiciones. De esta forma, es que se han identificado dos mecanismos de tolerancia: (1) Mecanismos externos: hongos micorrizógenos; y (2) Mecanismos internos: acumulación en la vacuola, presencia de proteínas de estrés térmico, quelación de metales por ligandos en el citosol, enlace en la pared celular y exudados radiculares (González & Zapata 2008). A este último grupo pertenecen los ácidos orgánicos en estudio. Los ácidos orgánicos corresponden a un grupo de metabolitos secundarios, generados a partir del Ciclo del Ácido Tricarboxílico o Ciclo de Krebs, el cual corresponde a la principal ruta mediante la cual se catabolizan los nutrientes en los seres vivos y la principal fuente de obtención de energía metabólica. Además de ser materia prima para la síntesis de biomoléculas, estos ácidos orgánicos (A. O. ó LMWOA, según su sigla en inglés), cumplen un importante rol en el desarrollo de las plantas, ya que, se sabe que estos influyen en la solubilidad de elementos esenciales y no esenciales, participando en la acidificación, quelación, precipitación y los procesos redox de la rizósfera (Zeng y col, 2009). Los ácidos orgánicos son exudados desde la raíz, cuando la planta es sometida a estrés oxidativo, por ejemplo altos niveles de Fe o a bajas concentraciones de Ca ó P

(Magdziak y col, 2010). En muchas especies, el aumento de la solubilidad de metales en el suelo debido a los ácidos orgánicos y la subsecuente absorción por las plantas ha sido atribuido principalmente a las propiedades quelantes de los ácidos orgánicos (Han y col, 2006).

En literatura se ha descrito que especies vegetales de la familia de las Poáceas como *Polypogon australis* (Marín & Morales, 2008) y *Phragmites australis* (Ye y col, 1997; Southichak y col, 2006; Bonanno & Giudice, 2010; Zhang y col, 2010) poseen capacidad para incorporar altas concentraciones de metales pesados, tanto en condiciones de laboratorio como de terreno (Ortiz y col, 2008). Además, estudios preliminares han indicado que es posible detectar exudación de ácidos oxálico, ácido oxámico y ácido málico en distintas especies vegetales, bajo tratamiento con soluciones de distintos metales en concentraciones del orden de 50 μM después de siete días (Shen y col, 2002). Por lo tanto, es necesario estudiar el efecto de concentraciones menores del metal y de un RIL minero, a tiempos mayores de tratamiento, simulando condiciones de terreno. De esta manera, se podrá complementar la información de exudación de ácidos orgánicos con la tasa de absorción de metales para la especie *Phragmites australis* y comprobar si existe relación entre ambos procesos.

1.5.Hipótesis

La tasa (incorporación de metales en el tiempo) y la selectividad para la absorción de metales en plantas de *Phragmites australis* es específica para cada uno de los metales y es regulada positivamente por los ácidos orgánicos acumulados y/o exudados, cuando las plantas son tratadas con un RIL minero y con una solución de cobre. El contenido de ácidos orgánicos en raíces, podría ser un factor importante en la absorción, acumulación y translocación de elementos en la especie estudiada.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo General

Evaluar la incorporación de metales y la exudación y acumulación de los ácidos orgánicos oxámico, málico y oxálico en *Phragmites australis*, al ser tratada con un RIL minero y una solución de cobre.

1.6.2. Objetivos Específicos

- Cuantificar la variación de la absorción de metales, en plantas de *Phragmites australis* bajo tratamiento con un RIL minero y bajo tratamiento con solución de CuSO_4 $15\mu\text{M}$, en el tiempo
- Identificar y cuantificar ácidos orgánicos exudados y acumulados en raíces de *Phragmites australis* bajo tratamiento con solución de CuSO_4 $15\mu\text{M}$ y con un RIL minero en el tiempo
- Caracterizar la eficiencia de absorción de metales en *Phragmites australis*, en relación al contenido de ácidos orgánicos y a variaciones de pH y potencial redox en el RIL.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Sistema de tratamiento vegetal en sistemas líquidos.

Materiales y reactivos:

- 36 Plantas *Phragmites australis* de 4 meses de edad, crecidas en vivero (luz natural y temperatura ambiente).
- 2,1 L de RIL proveniente del tranque de relaves “Talabre”, Codelco División Chuquicamata.
- 2,1 L de solución de CuSO_4 $15\mu\text{M}$, de pH 6,3.
- 2,7 L de solución nutritiva de Phostrogen (0,3g/L) pH 6,4 (Ver Anexo IV).
- 0,9 L de Agua Milli-Q.
- 32 frascos de vidrio de 186 mL de capacidad.
- Parafilm.

Procedimiento Experimental:

Se tomaron los 32 frascos de vidrio, ubicando una planta de aproximadamente 1,75g, en cada uno de ellos. A 12 frascos con plantas se les agregó 170 mL de RIL minero y se rotularon. A otros 12 frascos se les agregó 170 mL de CuSO_4 $15\mu\text{M}$ y se rotularon. Para los controles, se utilizó 4 frascos con 170 mL de agua Milli-Q, y 4 frascos con 170 mL de Solución de Phostrogen 0,3 g/L. Las 4 plantas restantes se utilizaron para las determinaciones a T_0 (Figura 7). La distribución de las muestras se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1: Distribución de las muestras y rotulación*.

Tiempo	(días)	Tratamiento		Controles	
		RIL	CuSO ₄	Phostrogen	H ₂ O Milli-Q
T ₀	0	-	-	Phost a Phost b Phost c	H ₂ O
T ₁	2	RIL a RIL b RIL c	CuSO ₄ a CuSO ₄ b CuSO ₄ c	Phost	H ₂ O
T ₂	7	RIL a RIL b RIL c	CuSO ₄ a CuSO ₄ b CuSO ₄ c	Phost	H ₂ O
T ₃	15	RIL a RIL b RIL c	CuSO ₄ a CuSO ₄ b CuSO ₄ c	Phost	H ₂ O
T ₃	30	RIL a RIL b RIL c	CuSO ₄ a CuSO ₄ b CuSO ₄ c	Phost	H ₂ O

*El rótulo se elaboró considerando el tiempo y el código. Las letras a, b y c corresponden a cada una de las réplicas para cada tiempo de muestreo.

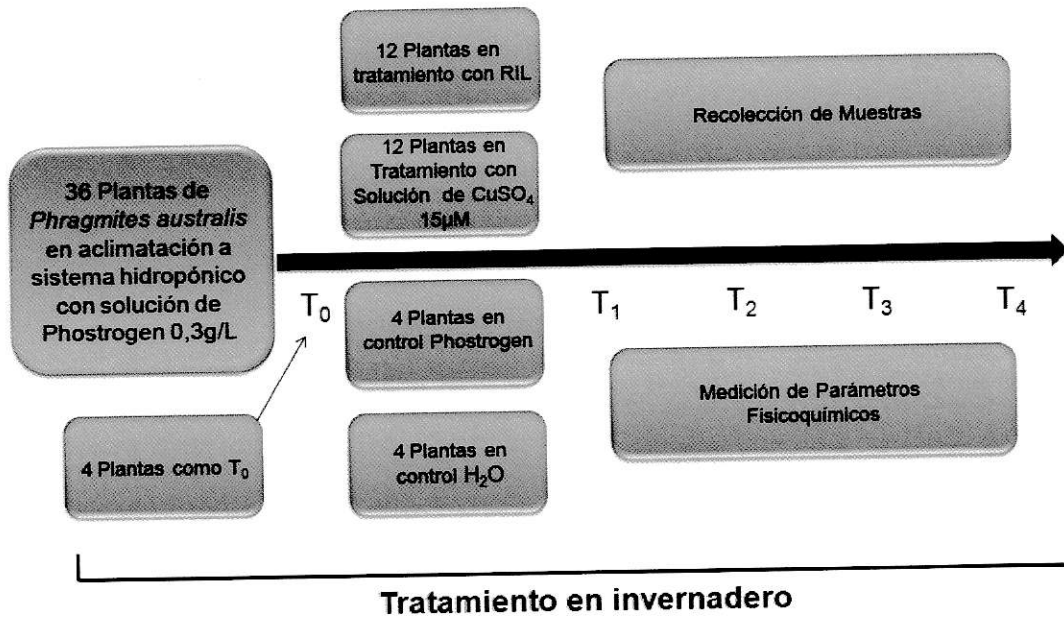


Figura 7: Esquema del sistema de tratamiento vegetal

Una vez que se completó la etapa anterior, los frascos fueron cubiertos con Parafilm, dejando únicamente la porción aérea de la planta descubierta para evitar pérdida de muestra por evaporación (Figura 7).

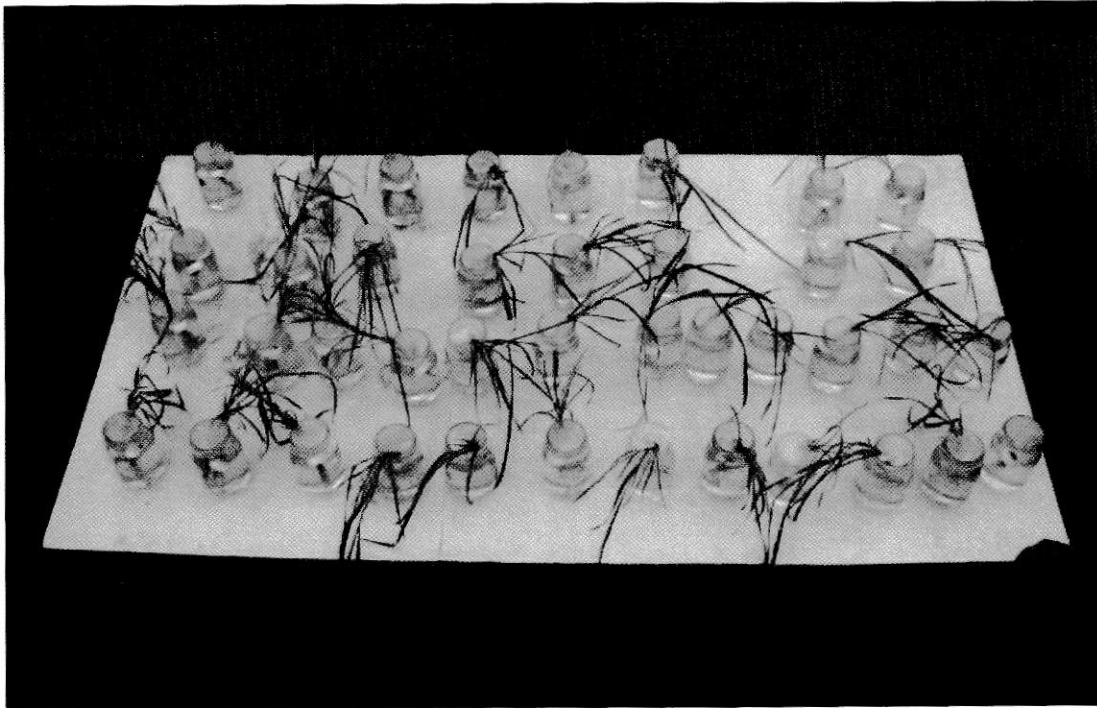


Figura 8: Diseño experimental

2.2.Recolección de Muestras:

Materiales y reactivos:

- Micropipetas de 10 y 1000 μL
- 80 tubos Eppendorf de 2 mL
- 40 Tubos Falcon de 15 mL
- 1 L de Solución de CaCl_2 5 mM
- 5 mL de HNO_3 65% Suprapur®, Merck
- Papel aluminio
- Agua Milli-Q
- Balanza Analítica AE Daman
- Bisturí
- Vasos de precipitado de 250 y 500 mL
- Nitrógeno Líquido

Procedimiento Experimental:

Se tomaron las 4 plantas sin tratamiento (T_0) y se enjuagaron en un baño de solución de CaCl_2 5mM durante 10 minutos, para evitar adsorción de metales en la superficie de la raíz. Posteriormente, se enjuagaron con agua Milli-Q y se secaron con papel absorbente. Una vez secas, estas se masaron (peso fresco) y se seccionó cada una de ellas en 2 partes: raíz y parte aérea (tallo y hojas). Posteriormente, la raíz se separó en porciones de tejido de aproximadamente 0,2 g, los que se destinaron a análisis de ácidos orgánicos (Figura 9). Las muestras de hoja y de raíz restantes se destinaron a análisis de metales. A medida que se obtuvo las muestras, estas se guardaban en sobres de papel aluminio, se rotularon y se congelaron con nitrógeno líquido.

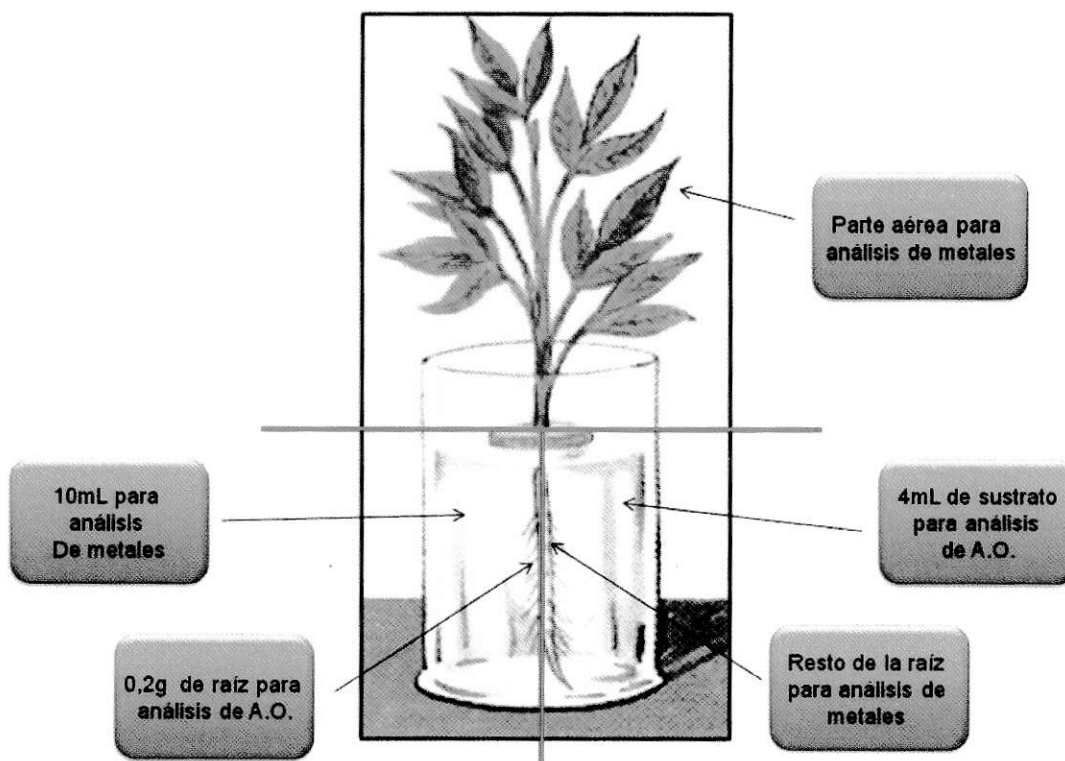


Figura 9: Distribución de muestras de tejido vegetal y de sustrato

Por otro lado, se tomó 10 mL de cada una de las soluciones utilizadas, es decir Agua Milli-Q, solución de Phostrogen 0,3g/L, RIL y solución de CuSO_4 15 μM , para posterior análisis de metales, se guardó en tubos Falcon de 15 mL y se les agregó HNO_3 65% Suprapur suficiente, para acidificar hasta un $\text{pH} < 2,0$. Además, se tomó 4 mL de los mismos sustratos, para posterior análisis de ácidos orgánicos y se guardaron en 2 tubos Eppendorf de 2mL. Finalmente, se rotuló las muestras de sustratos con sus respectivos códigos y se congeló la totalidad de las muestras (soluciones y tejido vegetal) a -80°C .

Transcurridos los 2 primeros días de experimentación (T_1), se extrajeron 8 plantas, 3 de estas corresponden a las que estaban bajo tratamiento con RIL (T_1 RILa, T_1 RILb y T_1

RILc), otras 3 que estaban bajo tratamiento con solución de CuSO_4 $15\mu\text{M}$ (T_1 CuSO_{4a} , T_1 CuSO_{4b} y T_1 CuSO_{4b}) y las dos restantes, a los controles con Agua Milli-Q y con solución Phostrogen $0,3\text{g/L}$. La distribución de las muestras de planta y la recolección de muestras de sustrato se realizó de la misma forma mencionada para las muestras de T_0 . Todo el procedimiento descrito, se llevo a cabo una vez que se cumplían los plazos definidos a los días 7, 15 y 30, es decir, T_2 , T_3 y T_4 , respectivamente.

2.3.Determinación de Parámetros Físico-Químicos

Materiales y Reactivos:

- Sonda Multiparamétrica HANNA HI-9828
- Soluciones de calibración de pH 4,01 HANNA HI-7004L, pH 7,01 HANNA HI-7007L; pH 10,01 HANNA HI-7010L
- Solución de calibración de $1413\ \mu\text{S/cm}$ HANNA HI-7031L
- Solución de calibración de $84\ \mu\text{S/cm}$ HANNA HI-7033L
- 2 Vasos de precipitado de 250 mL
- Pisseta con Agua Milli-Q.

Procedimiento experimental:

Cada vez que se extrajo una muestra de planta, en forma simultánea, se determinaron los parámetros físico-químicos del sustrato bajo el cual fueron tratadas. Estos parámetros fueron: pH, temperatura (T°C), Conductividad, Potencial de Óxido Reducción (POR), Sólidos Totales Disueltos (STD) y Oxígeno Disuelto (OD). Para esto, primero se debió calibrar la sonda, con sus respectivas soluciones y siguiendo el procedimiento descrito en el manual del equipo. Luego de esto, los electrodos se sumergieron en los frascos con las soluciones de RIL, de CuSO₄ 15µM y los controles, registrando los valores entregados por la sonda.

2.4. Determinación de metales por ICP-OES

2.4.1. Preparación de las Muestras de Sustratos de RIL, Solución de Cobre y Controles

Materiales y Reactivos

- Jeringas de 20 mL
- Porta filtro Millipore Swinnex- 25
- Filtros de membrana 0,45µm de tamaño de poro, Millipore.

Procedimiento experimental

Se armó el dispositivo formado por el filtro, el porta filtro y la jeringa, y se procedió a filtrar, dos veces, todo el volumen de cada muestra de sustrato para análisis

de metales. Todo lo anterior fue realizado a temperatura ambiente. Finalmente, se congelaron las muestras a -80°C .

2.4.2. Preparación de las Muestras de Tejido Vegetal

Materiales y Reactivos:

- Muestras de raíz y hoja para análisis de metales
- Horno Zhengji DHG- 9053A
- Mortero
- Nitrógeno líquido
- Balanza de precisión AE Adam PW Series
- 144 tubos Eppendorf de 2 mL
- 8 vasos de teflón para Microondas
- 2 L de Agua Milli-Q
- 250 mL de HNO_3 65% Suprapur®, Merck
- 150 mL de H_2O_2 30% Ultrapur®, Merck
- Horno Microondas para digestión de muestras Milestone Start D.
- 8 matraces de aforo de 25 mL
- 72 tubos Falcon de 50 mL

Procedimiento Experimental

Las muestras vegetales de raíz y porción aérea fueron descongeladas a temperatura ambiente y luego secadas en el horno a 40°C hasta alcanzar masa constante. Una vez terminado el proceso de secado, cada muestra fue masada y pulverizada con el mortero y nitrógeno líquido. De cada muestra pulverizada, se tomaron 0,2 g y se depositaron en su respectivo vaso de teflón. Se agregaron 3 ml HNO_3 65% Suprapur® y 2 mL de H_2O_2 30% a cada muestra trasvasijada al vaso de teflón. Y se procedió a digerir las muestras en

el horno microondas a 200°C durante 30 minutos. Posterior a esto, se dejaron enfriando durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Luego que las muestras se enfriaron, fueron trasvasiadas a distintos matraces de aforo de 25 mL, rotulados, y se diluyen con Agua Milli- Q al volumen indicado para su posterior análisis por ICP-OES.

2.4.3. Cuantificación de Metales Mediante ICP-OES

Materiales y Reactivos:

- Tubos Falcon de 15mL
- Porta filtro Millipore Swinnex- 25
- Filtros de membrana 0,45µm de tamaño de poro, Millipore.
- 31 mL de HNO₃ 65% Suprapur®, Merck
- 1,5 L de Agua Milli-Q
- Matraz de aforo de 1 L
- Probeta de 50 mL
- Solución Patrón Multi Elemento para ICP V CertiPUR® de 2ppm, Merck
- Solución Patrón Multi Elemento para ICP VIII CertiPUR® de 100ppm, Merck
- Solución Patrón Multi Elemento para ICP IVI CertiPUR® de 1000ppm, Merck
- Micropipetas de 10, 50, 1000 y 5000 µL
- Equipo ICP-OES Perkin Elmer Óptima 2000DV

Metodología Experimental:

Previo al análisis de las muestras, se elaboraron las curvas de calibración para los metales en estudio (Cu, Fe, Zn y Mn), utilizando las soluciones patrón para los elementos mencionados (ANEXO II)

De las muestras digeridas, se tomaron 10 mL y se filtraron con la jeringa y los filtros de membrana, utilizando un filtro distinto con cada muestra. Una vez filtradas, se trasvasijaron a tubos Falcon de 15 mL. Luego, los tubos Falcon con las muestras se ubicaron en la gradilla del auto *sampler* del equipo, para la determinación de metales mediante ICP-OES

2.5. Determinación de Ácidos Orgánicos en Tejido Vegetal y Muestras de Sustrato

2.5.1. Preparación de Muestras de Sustratos

Materiales y Reactivos

- Jeringas de 20 mL
- Porta filtro Millipore Swinnex- 25
- Filtros de membrana 0,45 μ m de tamaño de poro, Millipore.

Procedimiento Experimental:

Se filtró, dos veces, todo el volumen de cada muestra de sustrato para análisis de metales, a temperatura ambiente.

2.5.2. Extracción de Ácidos Orgánicos Desde las Muestras Vegetales:

Materiales y Reactivos

- Muestras de planta tratadas, destinadas a análisis de ácidos orgánicos
- Mortero
- Nitrógeno líquido
- Piseta con Agua Milli-Q
- Hielo
- Etanol 95%
- Centrífuga Boeco U- 320
- 36 Tubos Falcon de 15 mL
- Filtros de membrana 0,45 μ m de tamaño de poro, Millipore.
- Rotoevaporador Ika RV 10 digital
- Balanza Analítica AE Adam PW Series

Procedimiento Experimental

Se tomó las muestras de planta destinadas a análisis de ácidos orgánicos y se maceraron en el mortero frío, con la ayuda de nitrógeno líquido (Han y col, 2006). Una vez macerada la muestra, se mezcló con 2 mL de etanol frío al 95%, hasta obtener una pasta, como lo describe Smith y col. (2011), pero modificando la concentración de etanol. La pasta formada fue centrifugada a 15000 rpm por 15 minutos a 4 °C y se extrajo el sobrenadante (Han y col, 2006). En este caso, se modificó la velocidad y el tiempo de centrifugación, tomando en consideración el estudio de Hoogewijs y col. (2010), donde se concluyó que la eficiencia de centrifugado aumenta al incrementar la velocidad y al disminuir el tiempo de centrifugación. Terminada la centrifugación, el sobrenadante se llevó a un tubo Falcon de 15 mL. El pellet obtenido, se resuspendió en 1 mL de etanol 95% y se centrifugó nuevamente para extraer la totalidad de los ácidos

orgánicos. Este último paso se repitió 2 veces más, pero utilizando 0,5mL. A medida que las muestras eran centrifugadas y recolectadas, estas se guardaron congeladas a -80°C.

Una vez que se centrifugaron todas las muestras, estas fueron evaporadas a sequedad y se redisolviéron en 2mL de agua Milli-Q (Shan y col 2003). Las muestras obtenidas fueron filtradas a través de los filtros de membrana Millipore 0,45µm de tamaño de poro. Finalmente, se congeló la totalidad de las muestras a -80°C.

2.5.3. Determinación de Ácidos Orgánicos Mediante HPLC de Exclusión Iónica Molecular

Materiales y Reactivos

- Cromatógrafo HPLC con columna para exclusión iónica molecular
- Bomba Waters 625 LC System
- Detector Waters 2996 Photodiode Array (PDA)
- Columna Aminex HPX-87H
- Software Empower Pro
- Ácido Acético (Glacial) 100% Suprapur®,
- Estándares de Ácido Cítrico, Fumárico, Maleico, Oxálico de grado analítico, Merck
- Estándares de Ácido Málico, Oxámico, Fórmico Reagent Grade ≥95% Sigma-Aldrich.

Condiciones de Operación

Las condiciones de operación se seleccionaron, basándose en los trabajos de Salazar y col (2011, 2012):

- Fase móvil H_2SO_4 0,004M
- Elusión Isocrática a velocidad de flujo 0,6mL/min
- Presión \approx 600 psi
- Detección a 210nm de longitud de onda.

Procedimiento Experimental

Se preparó curvas de calibración para los ácidos orgánicos mencionados, utilizando los respectivos estándares (Ver ANEXO II). Luego, se ambientó la columna con la fase móvil durante 20 minutos y finalmente, se determinó los ácidos orgánicos en las muestras mediante cromatografía HPLC.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Cambios fenotípicos de las plantas durante el tratamiento

A lo largo del período de experimentación, las plantas expuestas a los distintos tratamientos sufrieron algunos cambios en su apariencia, respecto de su estado previo a los ensayos. Es importante mencionar que desde los 7 días de tratamiento, se observó indicios de proliferación de algas en el medio acuoso con el cual fueron tratadas, presentando un desarrollo bastante mayor en algunas de las soluciones, al final del tratamiento.

En las tablas 2, 3, 4 y 5 y las Figuras 10, 11, 12 y 13, se detallan las observaciones realizadas respecto de los cambios en el fenotipo de las plantas, por tratamiento.

Tabla 2: Observaciones realizadas en plantas bajo tratamiento con agua Milli-Q (Control).

Tiempo	Días	Observaciones
T ₀	0	Estos individuos de aproximadamente 25 cm de longitud (Raíz a hojas superiores), presentaban hojas en buen estado y un alto desarrollo radicular. No se observaron nuevos brotes en raíces ni en hojas de ninguno de los individuos.
T ₁	2	No se observó cambios durante los 2 primeros días transcurridos.
T ₂	7	Tampoco se observó cambios notables en las plantas.
T ₃	15	Comienzan a aparecer pequeños brotes (hojas y raíz)
T ₄	30	Se observó desarrollo en los brotes detectados anteriormente, los que alcanzaron entre un 40-65 % de la masa total de la parte aérea de la planta. En cuanto al desarrollo radicular, se observa un importante crecimiento, de entre 8 y 10 cm en su raíz principal, con pequeñas ramificaciones que alcanzan 1 cm de longitud en promedio.



Figura 10: Muestra de planta al final del tratamiento control con Agua Milli-Q. En amarillo se ven las hojas secas, en verde se muestran las hojas que se desarrollaron durante la experimentación y en rojo se destacan las raíces crecidas durante el tratamiento.

Tabla 3: Observaciones realizadas en plantas bajo tratamiento con solución nutritiva Phostrogen g/L

Tiempo	Días	Observaciones
T ₀	0	Estos individuos de aproximadamente 25 cm de longitud (Raíz a hojas superiores), presentaban hojas en buen estado y un alto desarrollo radicular. No se observaron nuevos brotes en raíces ni en hojas de ninguno de los individuos.
T ₁	2	No se observó cambios durante los 2 primeros días transcurridos.
T ₂	7	Tampoco se observó cambios notables en las plantas.
T ₃	15	Comienzan a aparecer pequeños brotes (hojas y raíz)
T ₄	30	Se observó desarrollo en los brotes detectados anteriormente, los que alcanzaron entre un 40-65 % de la masa total de la parte aérea de la planta. En cuanto al desarrollo radicular, se observa un importante crecimiento, de 8 cm en promedio. Las ramificaciones son casi imperceptibles.

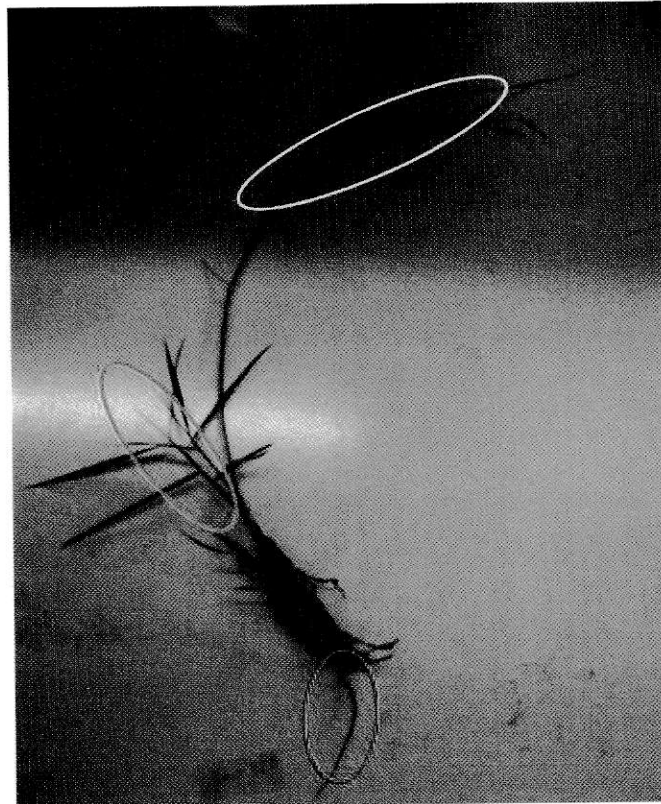


Figura 11: Muestra de planta al final del tratamiento control con Phostrogen 0,3g/L. En amarillo se ven las hojas secas, en verde se muestran las hojas que se desarrollaron durante la experimentación y en rojo se destacan las raíces crecidas durante el tratamiento.

Tabla 4: Observaciones realizadas en plantas bajo tratamiento con RIL minero.

Tiempo	Días	Observaciones
T ₁	2	No se observó cambios en los 2 días transcurridos
T ₂	7	Se apreció un leve deterioro en las hojas de estos individuos. Sus hojas comenzaron a secarse, tornándose parcialmente de un color amarillo. Sus raíces no presentaron alteraciones.
T ₃	15	Se observó la aparición de pequeños brotes (hojas y raíz), con un grado de desarrollo un poco menor al observado en controles con agua Milli-Q.
T ₄	30	Toda su estructura foliar inicial se secó, pero los brotes aparecidos en T ₂ ya alcanzaron una altura de 10 cm aproximadamente, siendo en muchos casos 2 por planta. En cuanto a la raíz, se observó nuevas estructuras, pero en ningún caso sobrepasaron en cantidad a las existentes.

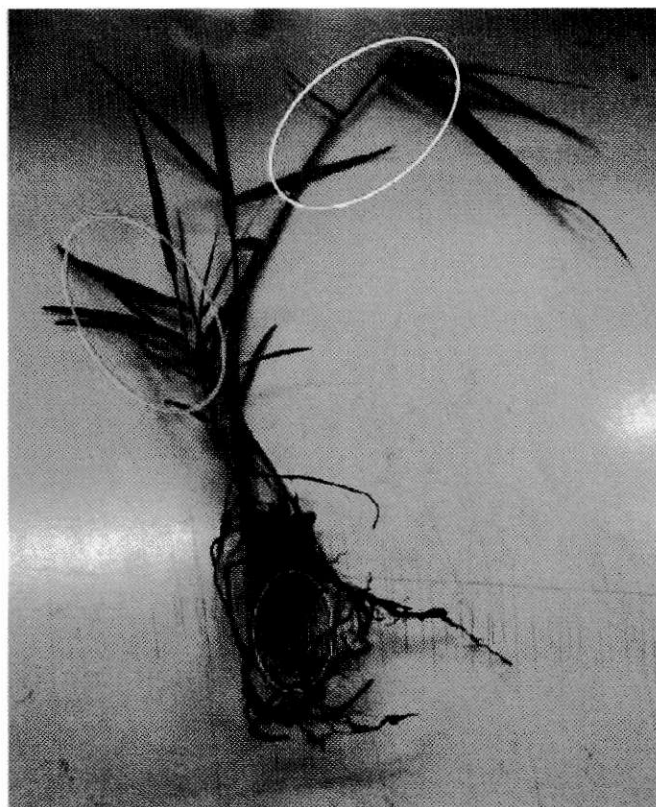


Figura 12: Muestra de planta al final del tratamiento con RIL minero. En amarillo se ven las hojas secas, en verde se muestran las hojas que se desarrollaron durante la experimentación y en rojo se destacan las raíces crecidas durante el tratamiento.

Tabla 5: Observaciones realizadas en plantas bajo tratamiento con solución de CuSO_4 $15\mu\text{M}$

Tiempo	Días	Observaciones
T ₁	2	No se observan cambios en los 2 días transcurridos
T ₂	7	Se apreció un leve deterioro en las hojas de estos individuos. Sus hojas comenzaron a secarse, tornándose parcialmente de un color amarillo, pero no tan pronunciado como en las plantas expuestas al RIL. Sus raíces no presentaron alteraciones.
T ₃	15	Se observó la aparición de pequeños brotes (hojas y raíz), con un grado de desarrollo un poco mayor al observado en controles con agua Milli-Q. El deterioro observado de las hojas antiguas en el tiempo anterior aumentó, siendo este superior al 50% del total.
T ₄	30	Toda su estructura foliar inicial se secó, pero los brotes aparecidos en T ₂ ya alcanzaron una altura de 10 cm aproximadamente. En cuanto a la raíz, se observó nuevas estructuras, que alcanzaron los 6cm de longitud en promedio.

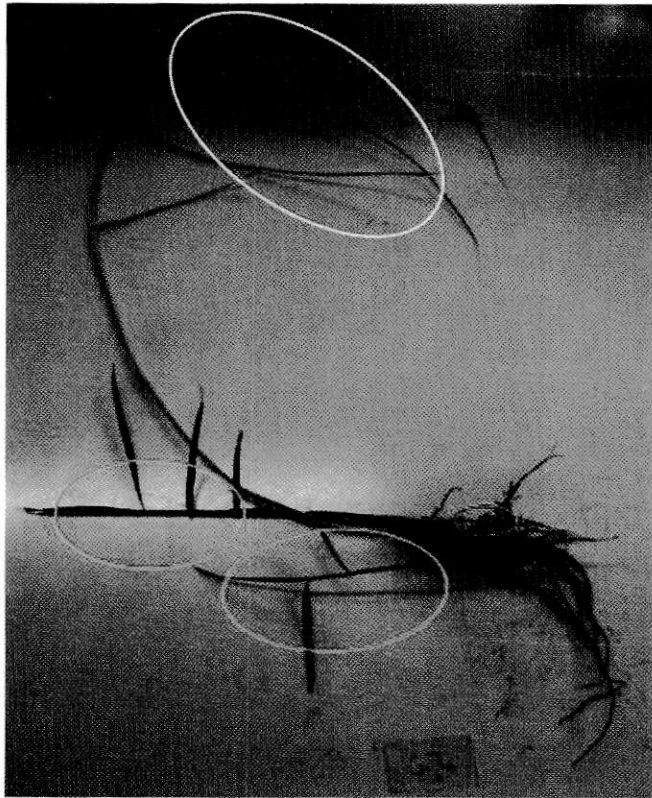


Figura 13: Muestra de planta al final del tratamiento con solución de CuSO_4 $15\mu\text{M}$. En amarillo se ven las hojas secas, en verde se muestran las hojas que se desarrollaron durante la experimentación y en rojo se destacan las raíces crecidas durante el tratamiento.

3.2. Contenido de metales en medios líquidos y en el tejido vegetal

3.2.1. Hierro

La determinación de Fe en los sustratos arrojó valores por debajo del límite de detección (Tabla 6.), por lo que se informa solamente el contenido de Fe en el tejido vegetal (Ver Anexo III).

Tabla 6: Concentración de Fe en sustratos

Tiempo (días)	Fe en RIL (mg/L)	Fe en solución de Cu (mg/L)	Control H ₂ O (mg/L)	Control Phost (mg/L)
0	<LDD	<LDD	<LDD	0,033
2	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD
7	0,033	<LDD	<LDD	<LDD
15	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD
30	0,031	0,024	<LDD	0,059

Las Figuras 14 y 15 muestran la variación del contenido de Hierro en la planta. En ellos se puede ver que no hay un comportamiento atribuible a los tratamientos, al no existir diferencias estadísticamente significativas. Estas variaciones se pueden explicar con la variabilidad del contenido natural de Hierro en la planta bajo condiciones naturales. En un estudio realizado por Baldantoni & col (2004), se reportó un contenido máximo de Hierro en raíces de *Phragmites australis* de 3500 mg/Kg p.s., el cual se encuentra bastante por encima del máximo informado en este trabajo (Figura 14).

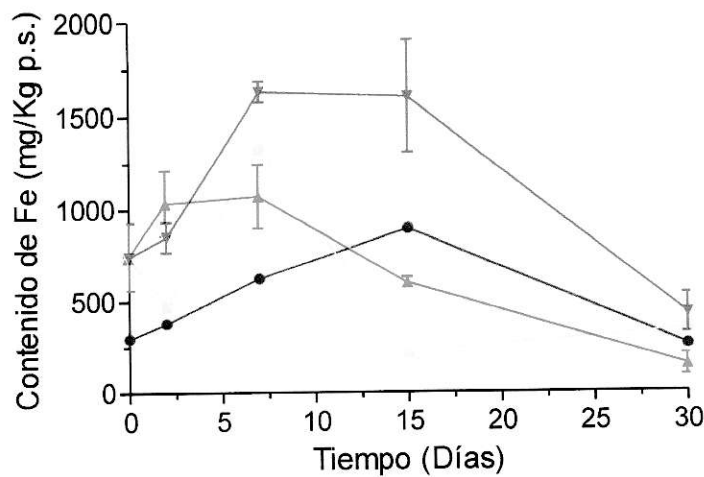


Figura 14: Absorción de Fe por raíces de *Phragmites australis* según tratamiento.
 Leyenda: ▼ Tratamiento con solución de CuSO₄ 15µM ▲ Tratamiento con RIL ◻ Control Solución Phostrogen 0,3g/L ● Control Agua Milli-Q.

Una situación muy similar se observa en la Figura 14, ya que, en el mismo estudio citado previamente, se reportó un máximo de 259 mg/Kg p.s., valor similar a los 255mg/Kg p.s., determinados en este trabajo.

De esta forma es que las variaciones encontradas se atribuyen únicamente a la variabilidad entre individuos y no al efecto del tiempo o de los tratamientos.

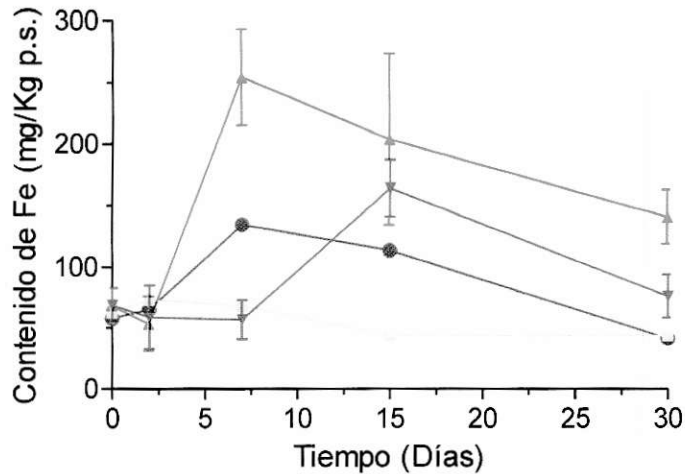


Figura 15: Absorción de Fe por hojas de *Phragmites australis* según tratamiento.
 Leyenda: ▼ Tratamiento con solución de CuSO₄ 15µM ▲ Tratamiento con RIL □ Control
 Solución Phostrogen 0,3g/L ● Control Agua Milli-Q.

3.2.2. Zinc

La Figura 16, muestra que no existen variaciones estadísticamente significativas de la concentración de Zn en los sustratos, a lo largo de los tratamientos. De igual forma, en las Figuras 17 y 18, se puede observar que la concentración de Zn en el tejido vegetal no presentó diferencias estadísticamente significativas durante los tratamientos. Esto, sumado a que la máxima concentración registrada corresponde al contenido de Zinc en plantas expuestas a la solución control con Agua Milli-Q, sugiere que los distintos valores obtenidos, se deben a la variabilidad del contenido natural de este metal en individuos de *Phragmites australis*. En este caso, los valores registrados en este trabajo, son bastante menores a los informados por (Vymazal & col, 2007), quienes encontraron 202 mg/Kg p.s. de Zn en raíces y 277 mg/Kg p.s. de Zn en hojas de *Phragmites australis*. Con estos datos, se descarta cualquier efecto de los tratamientos sobre la

planta y las variaciones registradas en la concentración de Zn se pueden atribuir a la variabilidad entre individuos, como se ha informado en la determinación de metales en individuos de *P. australis* (Vymazal y col, 2007).

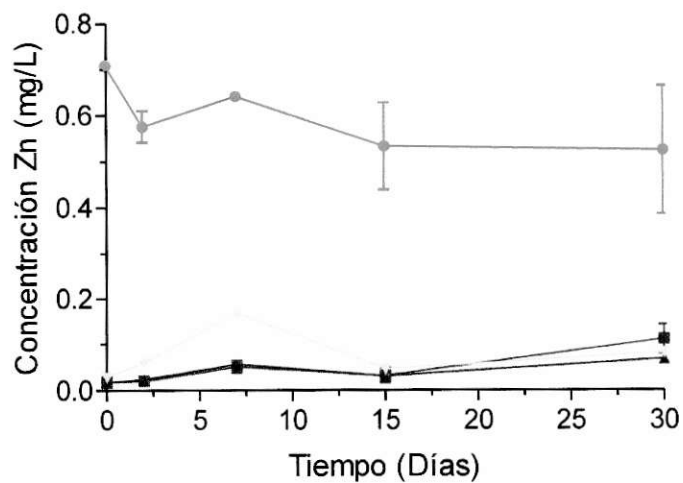


Figura 16: Variación de contenido de Zinc en los distintos sustratos.

Leyenda: ■ Concentración de Zn en solución de CuSO₄ 15µM ● Concentración de Zn en RIL
▲ Concentración de Zn en Solución Phostrogen 0,3g/L ▲ Concentración de Zn en Agua Milli-Q.

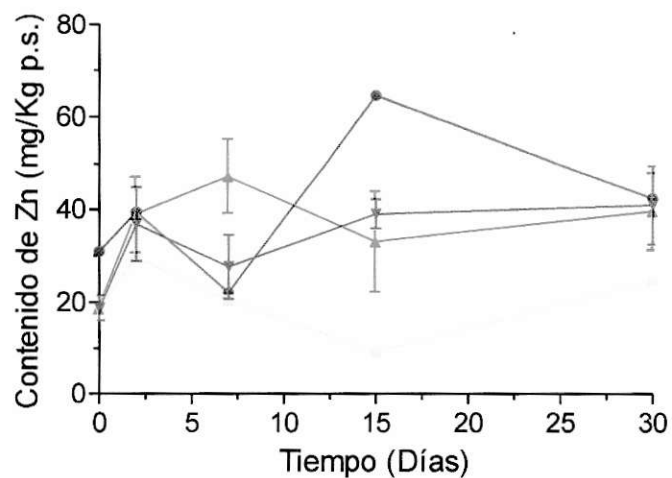


Figura 17: Absorción de Zn por raíces de *Phragmites australis* según tratamiento.
 Leyenda: ▼ Tratamiento con solución de CuSO₄ 15μM ▲ Tratamiento con RIL ■ Control Solución Phostrogen 0,3g/L ● Control Agua Milli-Q.

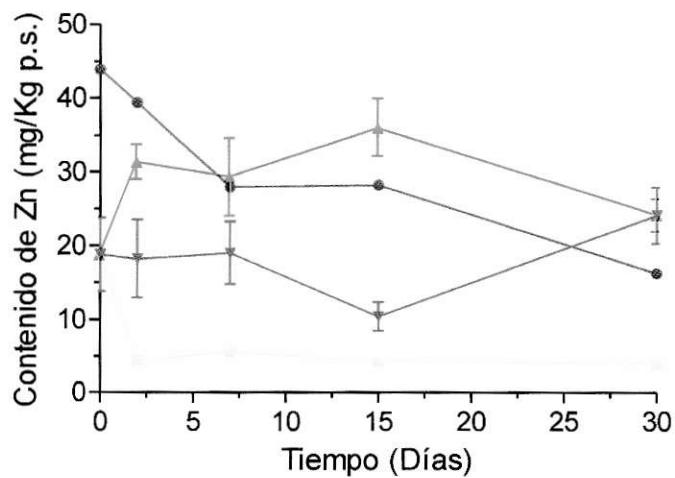


Figura 18: Absorción de Zn por hojas de *Phragmites australis* según tratamiento.
 Leyenda: ▼ Tratamiento con solución de CuSO₄ 15μM ▲ Tratamiento con RIL ■ Control Solución Phostrogen 0,3g/L ● Control Agua Milli-Q.

3.2.3. Manganeso

La Figura 19, muestra el contenido de Manganeso registrado en las distintas soluciones utilizadas, la cual no se observan variaciones estadísticamente significativas.

Siguiendo la tendencia del contenido de los otros metales en *Phragmites australis*, nuevamente se observó un comportamiento aleatorio en las concentraciones medidas de Manganeso. En este caso particular, las Figuras 20 y 21, muestran que el contenido de Manganeso se mantiene prácticamente constante entre el inicio y el final del tratamiento, salvo en el caso de las hojas de plantas tratadas con RIL, donde se registra un aumento importante, desde 22 mg/Kg p.s. a 50 mg/Kg p.s. pasados los 30 días de experimentación.

El contenido natural de Manganeso en *P. australis* abarca un amplio rango de concentraciones. Por ejemplo, se ha encontrado que en condiciones naturales de crecimiento, el contenido promedio de este metal en raíces es de 198 mg/Kg p.s., y 305 mg/Kg p.s. en hojas (Baudo y col 1985), valores bastantes mayores a los encontrados en el presente trabajo. De esta forma, se deduce que el tratamiento al cual fue sometida la planta no tuvo efectos sobre el contenido de Manganeso.

La concentración de metal en planta no está directamente relacionada con el contenido de este en el agua, de hecho, la disponibilidad de los metales para plantas

acuáticas es compleja y depende de otros factores asociados al metal y al sustrato (Mays & Edwards 2001).

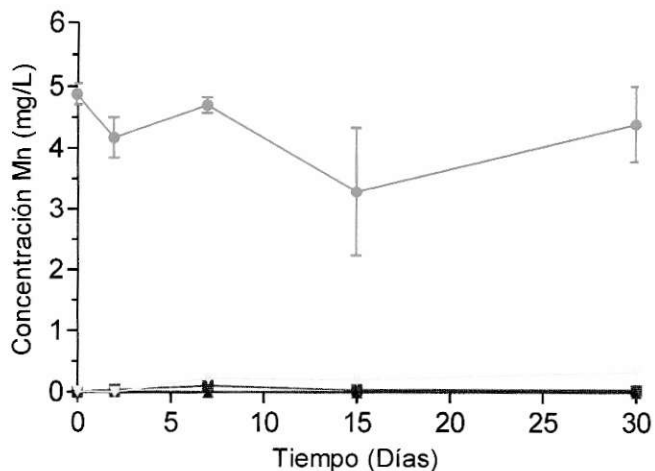


Figura 19: Variación de contenido de Manganeso en los distintos sustratos.
 Leyenda: ■ Concentración de Mn en solución de CuSO₄ 15µM ● Concentración de Mn en RIL
 ▲ Concentración de Mn en Solución Phostrogen 0,3g/L ▲ Concentración de Mn en Agua Milli-Q.

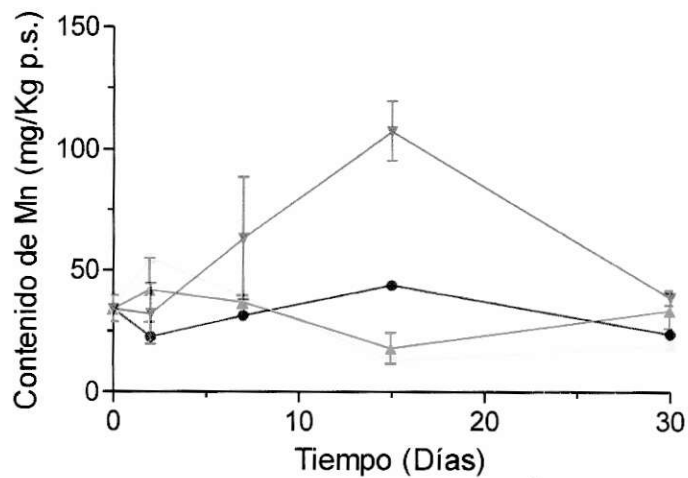


Figura 20: Absorción de Mn por raíces de *Phragmites australis* según tratamiento.
 Leyenda: ▼ Tratamiento con solución de CuSO₄ 15µM ▲ Tratamiento con RIL ■ Control Solución Phostrogen 0,3g/L ● Control Agua Milli-Q.

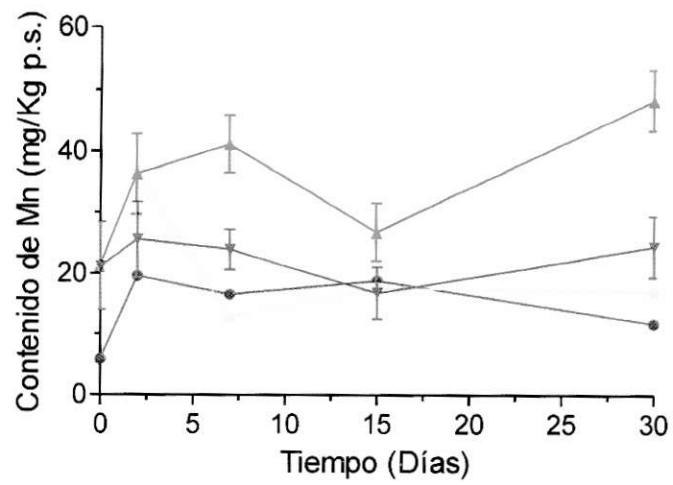


Figura 21: Absorción de Mn por hojas de *Phragmites australis* según tratamiento.
 Leyenda: ▼ Tratamiento con solución de CuSO₄ 15µM ▲ Tratamiento con RIL ◐ Control Solución Phostrogen 0,3g/L ● Control Agua Milli-Q.

3.2.4. Cobre

En los tres casos expuestos anteriormente, las concentraciones iniciales de cada metal en el RIL, para el caso del Zinc y del Manganeseo; y en el RIL y la solución de CuSO_4 para el caso del Cobre, fueron más altas que las medidas en ambos controles. Sin embargo, como se puede apreciar en las Figuras 16 y 19, no se observaron diferencias estadísticamente significativas que indiquen variaciones en la concentración del metal, como producto de la acción de la planta a lo largo de cada tratamiento.

En la Figura 22, se puede apreciar una clara tendencia a la disminución de la concentración de Cobre, tanto para el RIL, como para la solución de CuSO_4 , que se confirmó con el análisis estadístico, el cual exhibe las diferencias que existen a lo largo de los tratamientos. En este caso, se observó que en los 2 primeros días de tratamiento, la concentración de cobre en solución disminuyó drásticamente en ambos sustratos, alcanzándose la concentración mínima en el caso de la solución de CuSO_4 . Durante el tratamiento con el RIL, la concentración mínima de Cobre fue alcanzada a los 15 días.

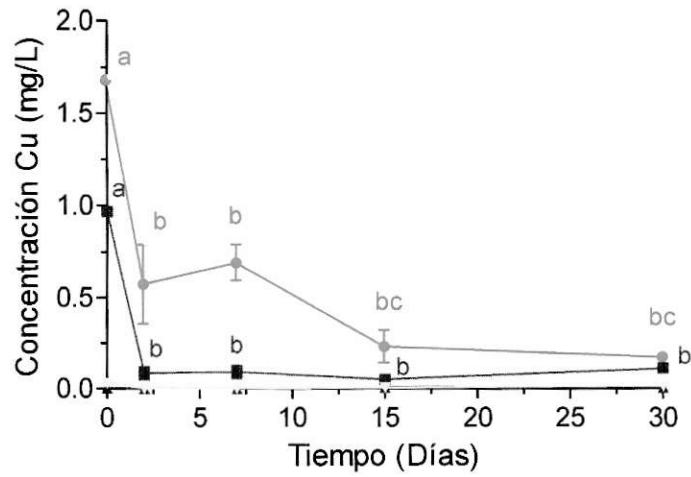


Figura 22: Variación de contenido de Cobre en los distintos sustratos.
 Leyenda: ■ Concentración de Cu en solución de CuSO₄ 15 μM ● Concentración de Cu en RIL
 ▲ Concentración de Cu en Solución Phostrogen 0,3g/L ▲ Concentración de Cu en Agua Milli-Q.

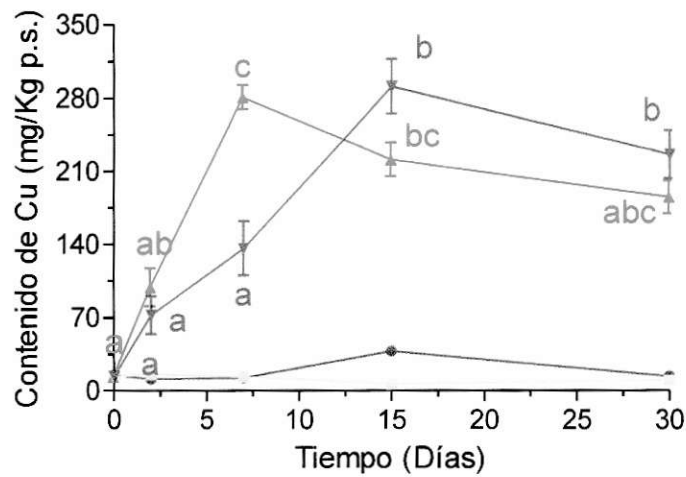


Figura 23: Absorción de Cu por raíces de *Phragmites australis* según tratamiento.
 Leyenda: ▼ Tratamiento con solución de CuSO₄ 15 μM ▲ Tratamiento con RIL ● Control Solución Phostrogen 0,3g/L ● Control Agua Milli-Q.

Respecto al contenido de Cu en los tejidos vegetales, la Figura 23 muestra un notorio aumento en el contenido de Cobre en la raíz de la planta, cuando es sometida a tratamiento, alcanzando el máximo a los 7 y 15 días, cuando es tratada con RIL y solución de CuSO_4 , respectivamente.

Una situación similar a la expuesta anteriormente se observó en el contenido de Cu en hojas (Figura 24), donde si bien, las diferencias de concentración entre los tratamientos y los controles no son tan marcadas como en la raíz y las variaciones de concentración en la planta no son estadísticamente significativas, se ve un claro aumento de la concentración de Cobre en las hojas bajo tratamiento, lo cual indica movilización del elemento desde la raíz hacia la parte aérea. Este aumento de Cobre en el tejido vegetal, se condice con la disminución de la concentración de Cobre registrada en los sustratos (Figura 22).

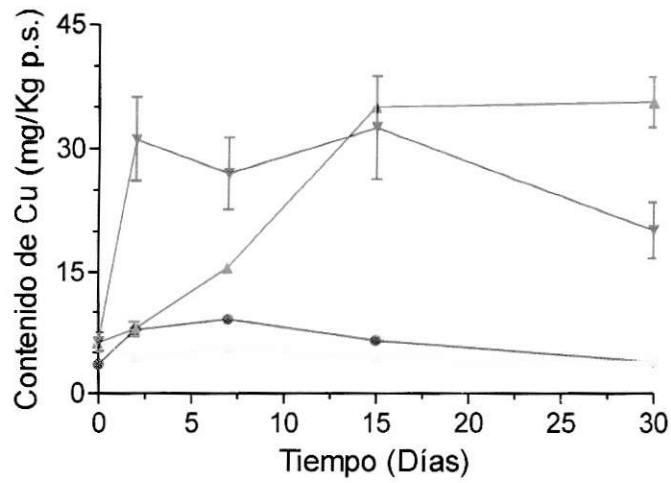


Figura 24: Absorción de Cu por hojas de *Phragmites australis* según tratamiento.
 Leyenda: ▼ Tratamiento con solución de CuSO₄ 15µM ▲ Tratamiento con RIL □ Control Solución Phostrogen 0,3g/L ● Control Agua Milli-Q.

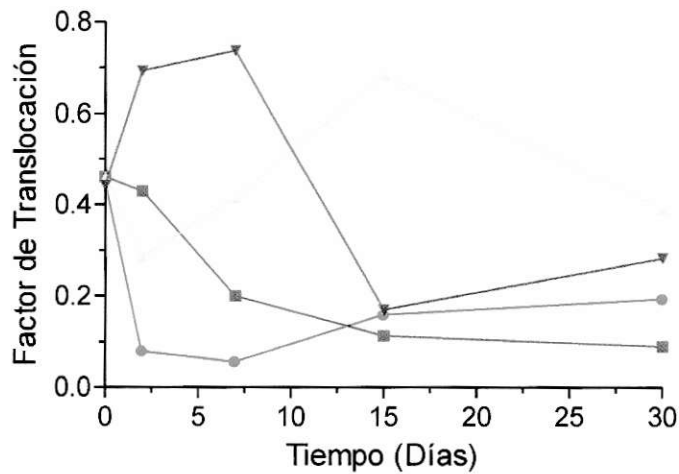


Figura 25: Factor de Translocación (FT) de Cu por *Phragmites australis* según tratamiento.
 Leyenda: ▼ Tratamiento con solución de CuSO₄ 15µM ▲ Tratamiento con RIL □ Control Solución Phostrogen 0,3g/L ● Control Agua Milli-Q.

La Figura 25 muestra el comportamiento de la translocación del metal a lo largo del tratamiento. Al ser este un cociente entre la concentración del metal en hoja, sobre la concentración del metal en raíz, un valor menor a 1 indica que la concentración del metal sería mayor en la raíz que en la porción aérea de la planta. A lo largo de los tratamientos este factor disminuye, hasta hacerse constante en 0,19 para las plantas bajo tratamiento con RIL y 0,16 para las plantas bajo tratamiento con solución de CuSO_4 , a partir de los 15 días.

A lo largo del tiempo, se observó una disminución en el factor de Translocación de *P. australis*, salvo en los individuos tratados con la Solución Phostrogen. Este resultado es atípico, ya que, en la literatura se encontró que este factor rara vez aumenta en el tiempo. Por ejemplo, Veselý y col, (2007), informaron un descenso en el FT de Cadmio, Plomo y Zinc, durante 3 semanas de experimentación con *Pistia stratiote* (especie hiperacumuladora), sometida a soluciones con alto contenido de dichos metales pesados. Además, en este mismo estudio se concluye que el FT de plantas jóvenes es mayor, en comparación al FT de plantas viejas de la misma especie.

Por otro lado, Ye y col, (2009), reportaron que en plantas de *Phragmites australis*, de 1 mes de edad, tratadas durante 4 meses con una solución que contenía 0,366 mg/L de Cu, el FT de Cobre es 0,45, valor casi 3 veces mayor que los FT obtenidos en el presente trabajo, sin embargo, es importante notar que en este último, las

plantas utilizadas tienen 4 meses de vida, lo cual explica la diferencia entre ambos FT calculados para una misma especie.

3.3. Contenido de Ácidos Orgánicos en Sustratos y Tejido Vegetal

3.3.1. Exudación de Ácidos Orgánicos

En los ensayos cromatográficos realizados a los sustratos, no se detectó ácidos orgánicos, lo que pudo deberse a tres situaciones: (1) No existe exudación, (2) el límite de detección del método es demasiado alto y (3) alta incidencia del efecto de la dilución. Comparando los límites de detección obtenidos en este trabajo, con los valores de concentración de exudados orgánicos obtenidos por otros autores, se puede esperar que estos sean similares, lo cual indicaría que el método utilizado debería arrojar resultados. Por ejemplo, Klugh-Stewart & Cumming (2009), reportaron concentraciones que variaron entre los 36 μM y los 88 μM , para Ácido Acético en exudados de *Andropogon virginicus* y el límite de detección calculado en el presente estudio para este ácido es 41,8 μM . En el caso del Ácido Málico, las concentraciones registradas variaron entre 49 μM y 171 μM , mientras que en el presente trabajo, el límite de detección fue de 62 μM . Por lo tanto, de haber exudación, la razón por la que no fue detectable, puede atribuirse a un efecto de la dilución. En el estudio citado, el diseño experimental consideraba un volumen total de trabajo de 40 mL, de los cuales se extrajeron 8 mL y se concentraron en 1 mL, lo que equivale a un factor de dilución igual a 5, condiciones de trabajo bastante diferentes a las seleccionadas en el presente trabajo, donde se utilizó un

volumen total de 170 mL, luego se extrajo una muestra de 4 mL y finalmente se concentró en 2 mL, con un factor de dilución igual a 85, lo cual afecta negativamente la detección de cualquier analito, sobre todo si estos se encuentran en bajas concentraciones.

Un último factor que pudo haber incidido en la ausencia de exudados detectados, sobre todo en los sustratos control, es decir, Agua Milli-Q y Solución Phostrogen (considerando el efecto bactericida del cobre), es la degradación de los ácidos, por acción de microorganismos. En varios estudios (Jones and Darrah, 1994; Rosas y col, 2007; Meier y col, 2012), el tiempo de recolección de las muestras de exudados es solamente de 2 horas, ya que, después de este plazo, la degradación por microorganismos se ve intensificada. Para evitar esta situación, algunos autores como Gaumé y col,(2001a,b) y Mariano & Keltjens (2003), esterilizan las semillas a utilizar, con soluciones de Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) 18 M, etanol 96% y Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 10% y etanol 96% e Hipoclorito de Sodio ($NaClO$) 1,5%, respectivamente, además de autoclavar todo el material utilizado.

Si bien, con los antecedentes presentados, no se puede concluir ciertamente si hay o no Ácidos Orgánicos exudados, se tiene más claridad acerca de las condiciones de análisis en estudios posteriores.

3.3.2. Concentración de Ácidos Orgánicos en Raíces de *Phragmites australis*

De los 8 Ácidos Orgánicos estudiados (Ácidos Acético, Cítrico, Fórmico, Fumárico, Maleico, Málico, Oxálico y Oxámico), solamente fueron detectados los Ácidos Acético, Málico, Fórmico y Oxámico, de los cuales, fue posible cuantificar los Ácidos Acético y Málico, ya que, los ácidos Fórmico y Oxámico se encontraron bajo el límite de cuantificación (Ver ANEXO II).

Las Figuras 26 y 27, corresponden a los cromatogramas de los estándares de ácido Acético y Málico, respectivamente. En la Figura 26 se observó la señal cromatográfica de una muestra estándar de ácido acético de 500 mgL^{-1} , la cual aparece a los 15,16 minutos. Por su parte, en la figura 27, se observó que a los 10,01 minutos aparece la señal del ácido Málico, correspondiente a una muestra estándar de 300 mgL^{-1} .

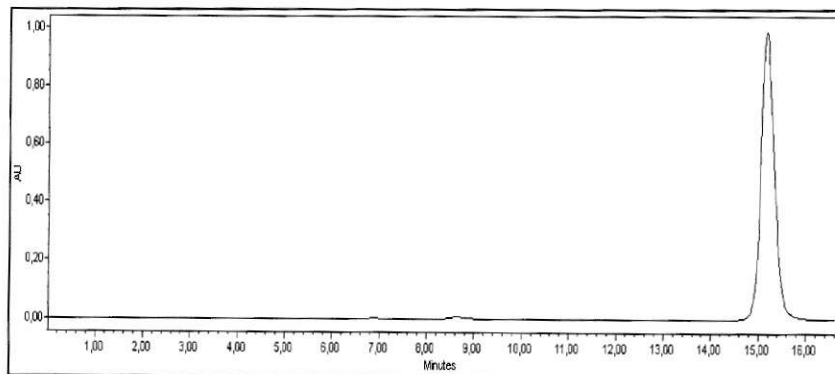


Figura 26: Señal cromatográfica del estándar de Ácido Acético 500 mgL^{-1} .

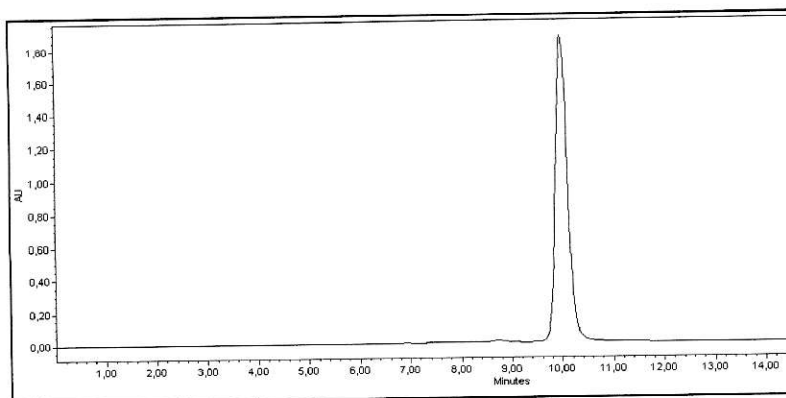


Figura 27: Señal cromatográfica del estándar de Ácido Málico 300 mgL⁻¹.

Para ejemplificar el análisis cromatográfico de los extractos de las muestras vegetales, se exponen a continuación los cromatogramas obtenidos para las muestras T₄Phost A (Figura 28) y T₂Ril C (Figura 29). En ellas se observó la presencia de ácido Acético (Figura 28) con tiempo de retención (t_R) de 15,18 minutos, similar al de su estándar y por otro lado, la presencia de ácido Málico (Figura 29) con un t_R de 10,66; presentando un desplazamiento de 0,6 minutos en su t_R , el cual se observó en la totalidad de las muestras donde se encontró este compuesto orgánico.

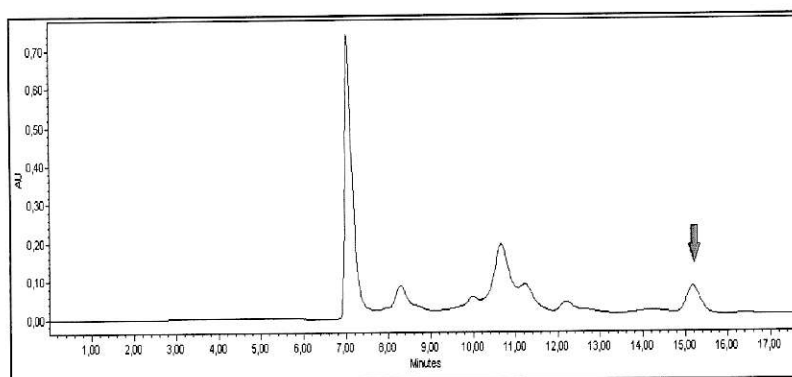


Figura 28: Señal cromatográfica de la muestra T₄Phost A. La flecha roja indica el pico cromatográfico correspondiente a la señal del ácido Acético.

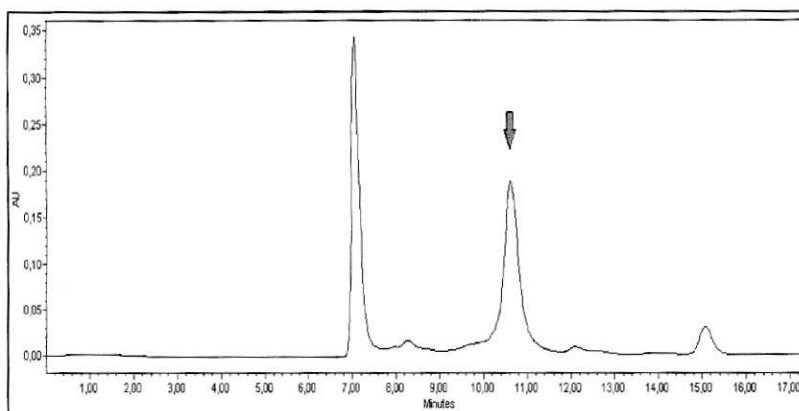


Figura 29: Señal cromatográfica de la muestra T₂ Ril A. La flecha roja indica el pico cromatográfico correspondiente a la señal del ácido Máfico.

Tabla 7: Tiempo de Retención (t_R) de los Ácidos Orgánicos estudiados.

Ácido Orgánico	t_R Estándar	t_R Muestra
Ácido Acético	15, 13	15,26
Ácido Máfico	10,19	10,42

En la Tabla 7 se muestra una comparación entre los tiempos de retención de los ácidos en los estándares y de los ácidos en las muestras estudiadas. Se observó que existe un aumento en los tiempos de retención de los ácidos en las muestras, respecto de los estándares, atribuible a la presencia de otros compuestos presentes en las muestras, el cual podría generar confusiones. Sin embargo, la especificidad de la columna Aminex HPX-87H y la adición de una pequeña cantidad de estándar de ácidos acético y málico a cada muestra, permite confirmar la presencia de estos ácidos, ya que, esta columna sólo detecta ácidos orgánicos y ambas señales se vieron aumentadas (Salazar y col, 2011).

3.3.2.1. Concentración de Ácido Acético en raíces de *Phragmites australis*

La Figura 26 muestra el comportamiento de la acumulación del Ácido Acético en la raíz de *Phragmites australis*. Como se puede apreciar, en condiciones normales, el contenido de este ácido orgánico aumentó en el tiempo. Pero, una vez que la planta es sometida a tratamiento con RIL minero o con solución de CuSO_4 , la concentración de Ácido Acético tendió a mantenerse prácticamente constante durante los 30 días de experimentación. Las diferencias entre las plantas mantenidas en las soluciones control y las plantas bajo tratamiento, presentaron significancia estadística ($P < 0.01$), no obstante, la acumulación de Cobre en la raíz de *Phragmites australis*, no es atribuible al Ácido Acético, dado que este posee una baja capacidad para complejar metales en solución (Jones, 1998), pero una posible exudación genera un microambiente de mayor solubilidad del metal en las raíces de la planta (Oburger y col, 2009).

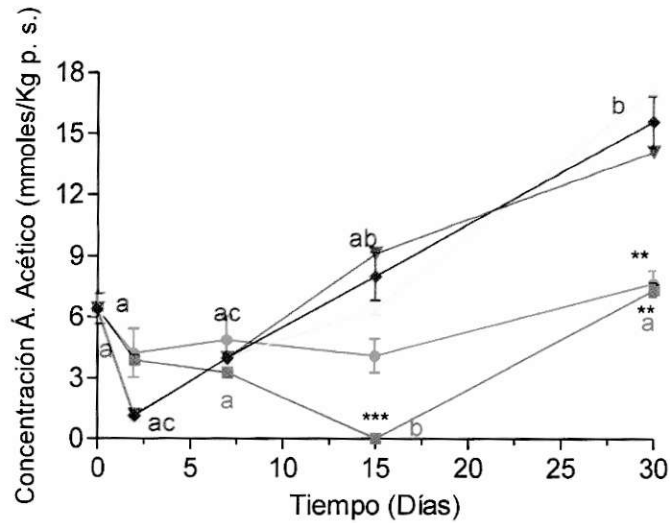


Figura 30: Contenido de Ácido Acético en raíces de *Phragmites australis* según tratamiento. Leyenda: ■ Tratamiento con solución de CuSO₄ 15µM ● Tratamiento con RIL ▲ Control con Solución Phostrogen 0,3g/L ▼ Control con Agua Milli-Q, ◆ Promedio controles.

En los últimos años, se han realizado pocos estudios que busquen dar explicación al origen del aumento del contenido de Ácido Acético en raíces, como una respuesta a situaciones de stress ocasionadas por la exposición a metales. Tal como se cita en el trabajo de Miranda de Andrade y col (2011), en las últimas dos décadas, sólo existe un estudio enfocado a resolver esta interrogante. En éste, se demostró que el Ácido Acético participa en la formación de Ácido Málico, a través del Ciclo de Krebs (Basu y col, 1994). Para llegar a esta conclusión, se trabajó con raíces de trigo y con acetato marcado con C¹⁴ y se estudiaron todos los ácidos orgánicos producidos. De ellos, únicamente el Ácido Málico contenía estos átomos de C¹⁴ en su estructura. Esto explicaría el

comportamiento visto anteriormente con el Ácido Acético, el cual deja de aumentar en el tiempo, en plantas sometidas a tratamiento con RIL y solución de CuSO_4 (Figura 30).

3.3.2.2. Ácido Málico

En la Figura 31 se muestra el contenido de Ácido Málico durante los tratamientos, en las raíces de *Phragmites australis*. Se observa que en todos los casos estudiados, el ácido málico disminuyó transcurridos los dos primeros días de tratamiento, para luego aumentar, registrándose el máximo de concentración a los 7 días (T_2). El brusco descenso registrado al comienzo del tratamiento, es atribuible al estrés producto del cambio de medio al momento de comenzar la experimentación. Luego de alcanzar el máximo, la concentración descendió, llegando a 62 mmoles/Kg p.s. y a 93 mmoles/Kg p.s. en el RIL y en la solución de CuSO_4 , respectivamente. Es importante notar que la concentración de este ácido es siempre mayor en individuos que se encuentran bajo tratamiento con RIL y con solución de CuSO_4 , respecto de las plantas control.

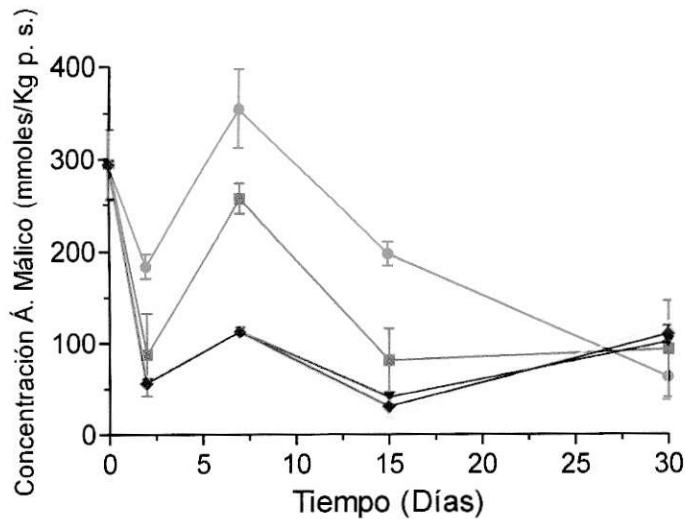


Figura 31: Contenido de Ácido Málico en raíces de *Phragmites australis* según tratamiento
 Leyenda: ■ Tratamiento con solución de CuSO₄ 15µM ● Tratamiento con RIL ▲ Control con Solución Phostrogen 0,3g/L ▼ Control con Agua Milli-Q ◆ Promedio controles.

A pesar de que la concentración de Ácido Málico sigue la misma tendencia tanto en plantas mantenidas en los controles como en las plantas bajo tratamiento, este aumento podría ser la respuesta de la planta ante los altos niveles de Cu en el RIL y en la solución de CuSO₄, ya que, se sabe que normalmente una planta requiere entre 10^{-8} y 10^{-10} µM de Cu para su normal desarrollo (Yruela, 2009). En cuanto a las tendencias observadas en el gráfico, se puede ver que existió una disminución a partir del séptimo día de tratamiento. En el caso de las plantas mantenidas en el RIL, la disminución de la concentración de Ácido Málico se sostuvo hasta el final del tratamiento. Por su parte, en las plantas mantenidas con solución de CuSO₄, la concentración final de Ácido Málico se mantuvo constante desde los 15 días en adelante, luego del descenso observado.

Estudios realizados en distintas especies por Miranda de Andrade y col (2011) e Yruela (2005), permiten concluir que este descenso del contenido de Ácido Málico en raíces, se debe a la translocación del ácido complejado al metal, descartando cualquier flujo de salida, lo cual sería consistente con los resultados del presente trabajo, ya que, no se detectó exudación. Este fenómeno es considerado un mecanismo de tolerancia, mediante el cual, las plantas eliminan compuestos tóxicos, movilizándolos hacia las hojas o peciolo, para eliminarlos posteriormente, al cambiar sus hojas (Lytle y col, 1998).

Estudios realizados en células fotosintéticas de soja (*Glycine max* var. Corsoy), mantenidas en CuSO_4 10 μM durante 21 días, demostraron la presencia de depósitos de Cu y un aumento en el contenido de Ácido Málico en las células estudiadas (Bernal y col, 2006), lo cual permite asociar el aumento de la concentración de este ácido orgánico, con el aumento de cobre registrado en las raíces de *Phragmites australis*.

3.4. Parámetros Físico-Químicos de las soluciones de tratamiento

3.4.1. Temperatura

Las tendencias observadas son similares entre los controles y los tratamientos, por lo que se descarta cualquier incidencia de estos sobre las temperatura registradas. Los cambios de temperatura se deben únicamente a las condiciones climáticas correspondientes a los días en que se realizó el registro (Figura 32).

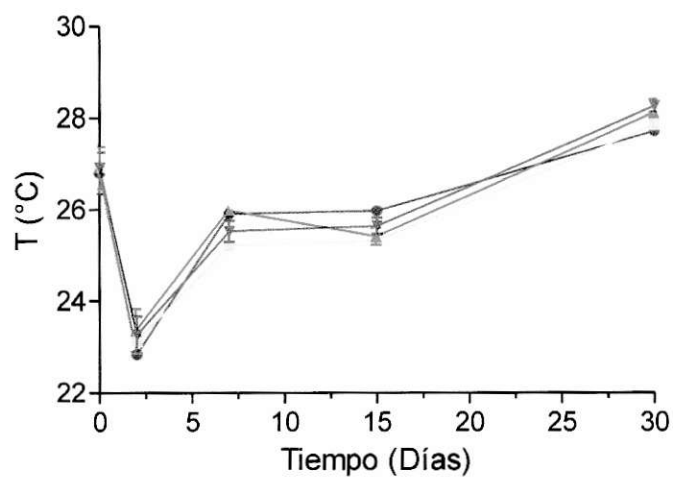


Figura 32: Variación de la temperatura a lo largo del tiempo en las distintas soluciones.
Leyenda: ▼ Solución de Cu ▲ RIL □ Solución Phostrogen ● Agua Milli-Q.

3.4.2. Conductividad

Según la figura 34, se puede apreciar que tanto en los controles como en el tratamiento con solución de Cobre, se observó leves alzas en el valor de Conductividad. Por otro lado, en el tratamiento con RIL, se observó un importante alza entre los valores final e inicial, siendo este de aproximadamente 4000 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Como era de esperar, los valores de Conductividad son mayores en el RIL y en la solución de Phostrogen, confirmando la presencia de materiales y nutrientes disueltos (disponibles para la planta).

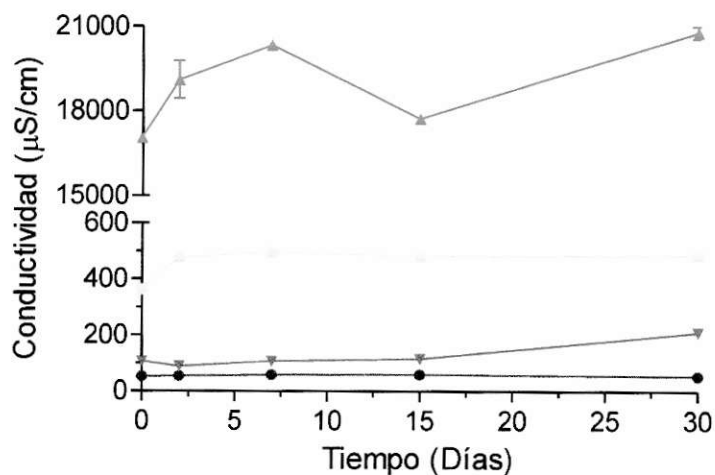


Figura 33: Variación de la conductividad a lo largo del tiempo en las distintas soluciones.
Leyenda: ▼ Solución de Cu ▲ RIL □ Solución Phostrogen ● Agua Milli-Q.

3.4.3. Oxígeno Disuelto

El oxígeno disuelto es un importante indicador de la calidad de ambientes acuáticos. Las macrófitas y/o perifitonos son frecuentemente quienes conducen las fluctuaciones de los niveles de OD en este tipo de ambientes (He y col, 2011).

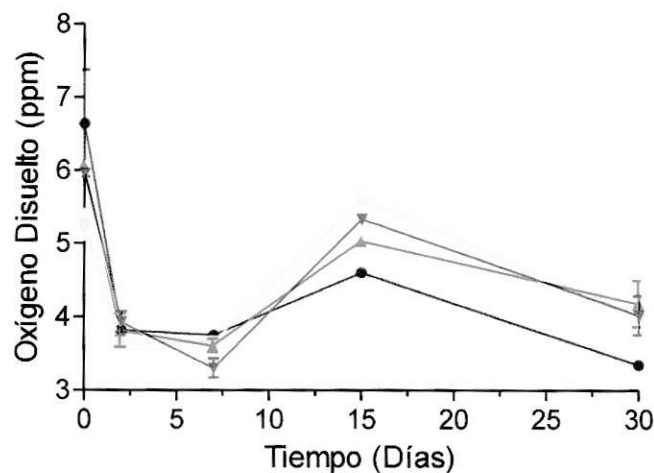


Figura 34: Variación del Oxígeno Disuelto a lo largo del tiempo en las distintas soluciones.
Leyenda: ▼ Solución de Cu ▲ RIL ■ Solución Phostrogen ● Agua Milli-Q.

En la Figura 35 se observa un importante descenso en el valor registrado inicialmente. Se observa que el Oxígeno Disuelto disminuyó en aproximadamente 2 ppm (mg/L) entre el inicio y el final del tratamiento, 6 ppm a 4 ppm, a pesar de que se registró un segundo máximo de OD, a los 15 días. Esta información es totalmente coherente con los valores de Temperatura y POR reportados en los apartados 6.2.2 y 6.2.4, respectivamente, ya que, un aumento de la temperatura de la solución implica un descenso en el oxígeno disuelto y a su vez, la disminución de las condiciones oxidantes

del medio (Vila, 2003). Como se explicó anteriormente, las macrófitas, como el caso de *Phragmites australis*, pueden alterar en gran medida el nivel de OD de su entorno, mediante sus actividades de respiración y fotosíntesis (He y col, 2011), principalmente la respiración de la parte aérea que quedó cubierta bajo el Parafilm utilizado para evitar las pérdidas de sustrato por evaporación, el cual también acabó impidiendo el intercambio de gases con la atmósfera, facilitando el agotamiento del Oxígeno disuelto en los sustratos.

3.4.4. pH

Determinar este parámetro es fundamental, ya que se sabe en conjunto con el Potencial de Óxido Reducción (POR) afectan directamente la distribución de los distintos metales presentes en la rizósfera. Tanto es así que el pH es considerado como la variable maestra en el control de la movilidad y, por lo tanto, la biodisponibilidad de los metales (Lim y col, 2002).

En la Figura 36, se puede apreciar que a lo largo del periodo de experimentación, la tendencia seguida fue hacia la neutralidad. En el caso del tratamiento con RIL, con solución de Cobre y el control Phostrogen, el pH inicial es cercano al 5,5 y terminó en torno a 7 (neutro). En el caso del control Agua Milli-Q, el pH inicial es 6,8 y terminó aproximadamente en 6,5.

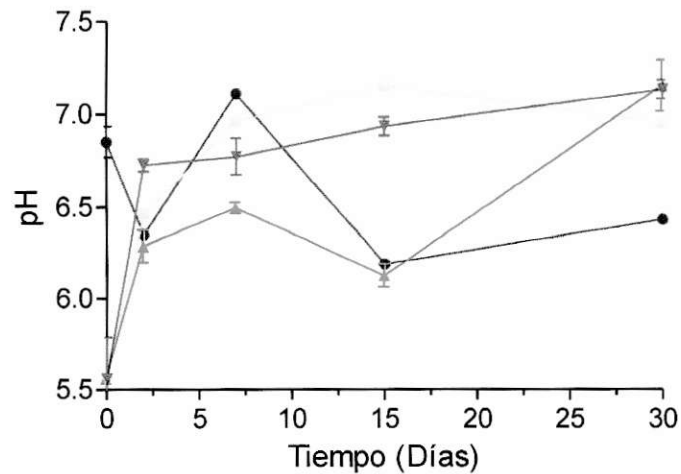


Figura 35: Variación del pH a lo largo del tiempo en las distintas soluciones.
 Leyenda: ▼ Solución de Cu ▲ RIL ■ Solución Phostrogen ● Agua Milli-Q

Es sabido que las plantas secretan una serie de compuestos que pueden alterar las condiciones de su entorno, como es el caso del pH, de manera que este se adapte a sus necesidades (Niu y col, 2007). También cabe la posibilidad de la formación de compuestos nitrogenados, como producto de la descomposición de las raíces que van muriendo, producto del estrés al cual fueron sometidas, luego de cambiarlas a las distintas soluciones tratamiento. Estos compuestos podrían ser una de las causas del aumento del pH.

3.4.5. Potencial de Óxido Reducción

En la Figura 37 se aprecia una clara tendencia a la disminución del potencial de Óxido Reducción del medio en ambos controles y tratamientos. Al final del tratamiento, el potencial Redox alcanzó valores cercanos a los 0 mV, perdiendo las condiciones oxidantes del medio. Esto puede ser consecuencia de dos de los factores analizados previamente. Por un lado, lo observado con el oxígeno disuelto, el cual muestra un importante descenso. Y por otro, debido al aumento del pH. Un estudio realizado por Lissner y col, (2003), se demostró que el pH tiene una relación lineal con el POR, en el rango de pH fisiológico de *P. australis* (pH 5,5- 8,0), donde un aumento de una unidad de pH implica una disminución de 50 mV en el POR. En definitiva, la sumatoria de estos factores estaría incidiendo en el brusco descenso del POR

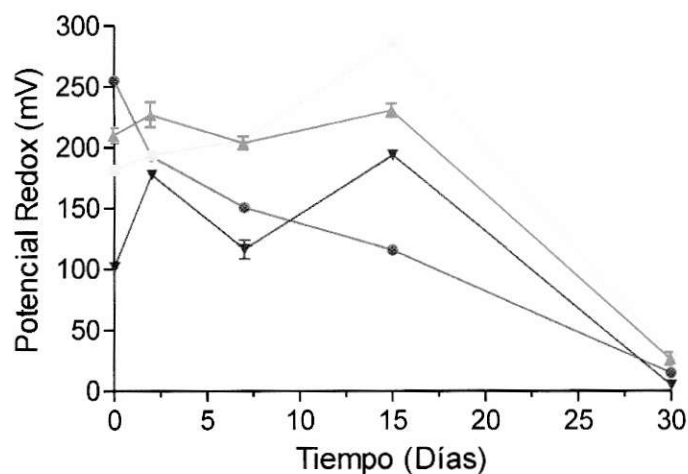


Figura 36: Variación del Potencial de Óxido Reducción a lo largo del tiempo en las distintas soluciones. Leyenda: ▼ Solución de Cu ▲ RIL ◊ Solución Phostrogen ● Agua Milli-Q

3.5. Especiación de Cobre

Considerando los resultados de la medición de los parámetros fisicoquímicos en los sustratos, se puede establecer una aproximación del estado en que se encontró el Cobre, a lo largo de los tratamientos. Las figuras 38 y 39, resumen el estado de oxidación del Cobre en los sustratos, en relación al pH y al Potencial de Óxido Reducción. Según el diagrama Eh(V) v/s pH (Figura 38), durante los primeros 15 días (T₀-T₃), este se encontraría como Cu²⁺, situación favorable para la absorción de Cobre desde la raíz, ya que, la mayoría de las proteínas encargadas del transporte de metales hacia el interior de las células, la familia de las COPTs (Copper Transport Proteins, Figura 40), presentan mayor afinidad a este catión divalente, por sobre el Cu(I) (Colangelo & Guerinot, 2006) (Figura 40). Además, es importante considerar que el Cu(I) es inestable y tiende a formar complejos, dificultando aún más su incorporación al tejido vegetal.

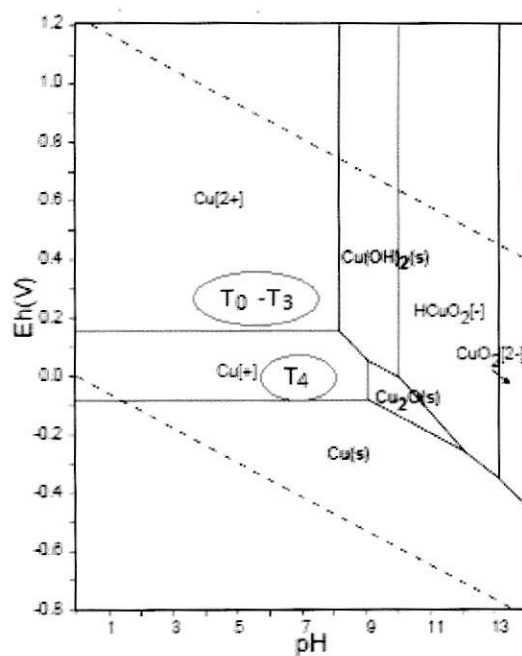


Figura 37: Diagrama Eh(V) v/s pH del sistema Cu-O-H.

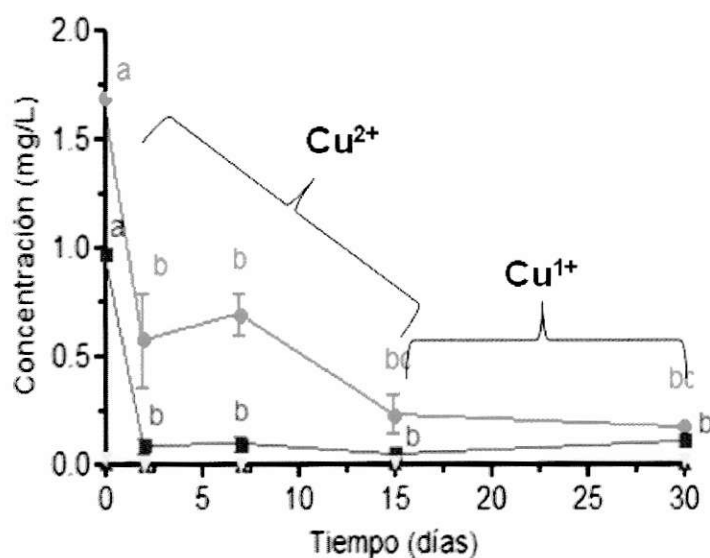


Figura 38: Especiación y variación de contenido de Cobre en los distintos sustratos.
 Leyenda: ■ Concentración de Cu en solución de CuSO_4 15 μM ● Concentración de Cu en RIL
 ▲ Concentración de Cu en Solución Phostrogen 0,3g/L ▲ Concentración de Cu en Agua Milli-Q.

Durante los primeros 15 días, donde se produce la totalidad de la absorción de Cobre. En el periodo posterior a T₃ (15 días), la concentración de Cu se vuelve constante en el RIL y en la solución de CuSO₄ y además, deja de aumentar en el tejido vegetal (Figuras 23 y 24). Esto indica que la planta se satura de Cobre y también baja su tasa de absorción por la baja afinidad de las proteínas transportadoras con los complejos de Cu(I), que predomina en la solución, por sobre el Cu(II).

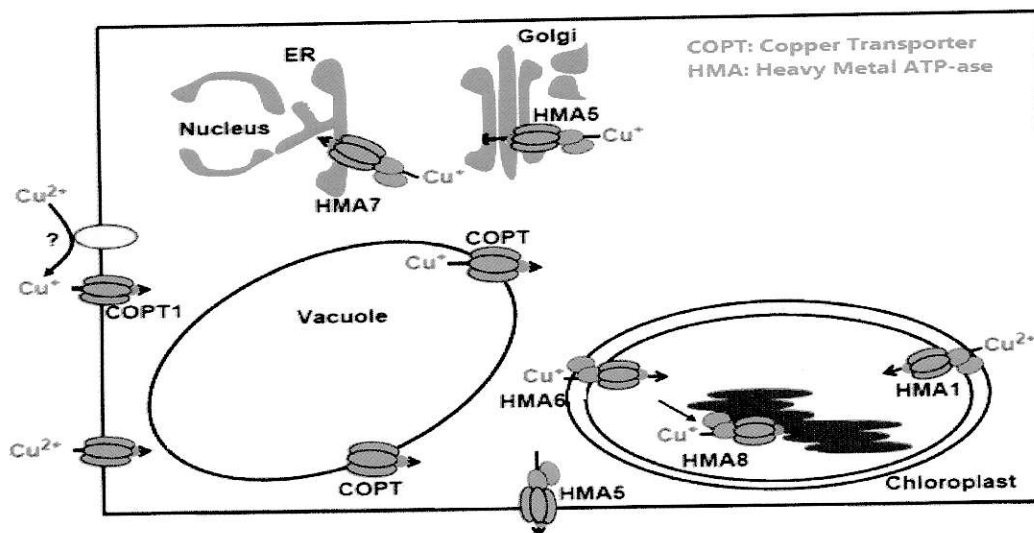


Figura 39: Esquema del funcionamiento de las proteínas transportadoras de Cu (COPTs) (Yruela, 2009).

Se han realizado pocos estudios conducentes a evaluar la resistencia de *Phragmites australis* ante la exposición al cobre. Un ejemplo de estos estudios, es el realizado por Ye y col, (1997), donde someten plantas de *P. australis* a soluciones de CuSO₄ de distintas concentraciones, encontrando resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo. Si bien, las concentraciones utilizadas en el estudio citado son

bastante menores, la planta tuvo un comportamiento similar, acumulando mayor contenido de cobre en las raíces durante las 3 semanas de experimentación. Lamentablemente, este estudio no considera las variaciones en la concentración durante este plazo, informando la concentración final. Otro resultado similar obtenido y que da indicios de la resistencia de estas plantas a la exposición al cobre, es el desarrollo observado en sus raíces, el cual demostró una notoria elongación en ambos estudios.

Tabla 8: Concentraciones máximas de Cu y Ácido Málico

Analito	Concentración Máxima en Raíz (mg/Kg p.s.)	Tiempo al cual se alcanzó (días)
Cu (R)	281 (mg/Kg p.s.)	7
Á. Málico (R)	354 (milimoles/Kg p.s.)	7

También es importante notar que al séptimo día de tratamiento, (T_2), se produjeron los máximos de concentración de Ácido Málico y de Cu, en la raíz de *Phragmites australis* (Tabla 8), evidenciando la participación de este ácido orgánico en la retención del metal al interior de las raíces (Bernal y col, 2006). Analizando las Figuras 30 y 22, se puede ver que la concentración del ácido y del Cu en raíces de plantas tratadas con RIL, descendió luego de T_2 , lo cual es coherente con el aumento apreciado en el factor de translocación de Cu calculado para plantas tratadas con RIL (Figura 24). Si bien, este aumento es pequeño, queda en evidencia que a partir de T_2 , la planta comienza a movilizar el metal hacia las hojas, razón por la cual, la concentración de Cu en raíces de plantas tratadas con RIL, comienza a decaer luego pasados los primeros 7 días de tratamiento. En muchas situaciones, como por ejemplo ante

deficiencia de nutrientes como Fósforo (P), las plantas tienden a acumular ácidos orgánicos para mantener regulado el pH intracelular (Neumann & Römheld, 1999), pero para mantener el balance de cargas, deben recurrir a la translocación de estos hacia la sección foliar de la planta (Jeschke y col, 1997).

IV. CONCLUSIONES

1. La especie *Phragmites australis* muestra selectividad en la absorción de metales, al ser tratada con un RIL minero en un cultivo hidropónico, ya que, de un total de cuatro cationes estudiados (Cobre, Hierro, Manganeso y Zinc), solamente absorbió Cobre en niveles significativos.
2. El tratamiento con plantas de *P. australis* generó una disminución del contenido de cobre tanto en el RIL como en la solución de CuSO_4 . En el RIL el contenido de Cobre cayó desde 1,68 mg/L, hasta 0,17 mg/L y en la solución de CuSO_4 15 μM , el cobre bajó desde 0,98 mg/L hasta 0,11 mg/.
3. En relación a la exudación y/o acumulación de ácidos orgánicos por parte de *P. australis* se puede establecer lo siguiente:
 - No fue posible comprobar ni descartar la exudación de ácidos orgánicos. Se identificaron posibles causas de esta situación, pero se necesitan estudios más profundos para tener resultados concluyentes.
 - En cuanto a la acumulación de ácidos orgánicos en el tejido radicular de *P. australis*, de un total de ocho ácidos orgánicos estudiados (Ácidos Acético, Cítrico, Fórmico, Fumárico, Maleico, Málico, Oxálico y Oxámico), solamente fue posible detectar y cuantificar niveles significativos de Ácido Acético y Málico.

4. Según los resultados obtenidos y la información recopilada de la literatura, se puede concluir que el Ácido Málico juega un papel importante en la retención y translocación de Cobre al interior de la planta. Además, la especie *Phragmites australis* puede ser una importante herramienta para el abatimiento de Cobre en aguas contaminadas con dicho catión si se manejan las condiciones apropiadas para el buen desempeño de esta planta.

V. REFERENCIAS

Baldantoni D., Alfani A., Di Tommasi P., Bartoli G., Virzo De Santo A. 2004. Assessment of macro and microelement accumulation capability of two aquatic plants. *Environmental Pollution*. **130**:149-156.

Barrios S., Peña-Cortés F., Osses S. 2004. Efectos de la contaminación atmosférica por material particulado en las enfermedades respiratorias agudas en menores de 5 años. *Ciencia y Enfermería* **2**:21-29.

Basu U., Godbold D., Taylor G. 1994. Aluminum Resistance in *Triticum aestivum* Associated with Enhanced Exudation of Malate. *Journal of Plant Physiology*. **144(6)**:747-753

Baudo R., Canzian E., Galanti R., Guilizzoni P., Rapetti G. 1985. Relationship between heavy metals and aquatic organisms in lake mezzola hydrographic system (Northern Italy). 6. Metal concentration in two species emergent of macrophytes; Mem. Ist. Ital. Idrobiol. **43**:161-180.

Bernal M, Sánchez-Testillano P, Risueño MC, Yruela I. 2006. Excess copper induces structural changes in cultured photosynthetic soybean cells. *Functional Plant Biology*. **33**: 1001-1012

Blanckenburg F., Wirén N., Guelke M., Weiss D., Bullen T. 2009. Fractionation of Metal Stable Isotopes by Higher Plants. *Elements* **5(6)**: 375-380.

Blaylock, M., Salt D., Dushenkov S., Zakharova O., Gussman C., Kapulnik Y., Ensley B. y Raskin I. 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian Mustard by soil-applied chelating agents. *Environ. Sci. Technol.* **31**:860-865.

Blanco E. Fundamentos de Depuración en lagunas facultativas. Factores que Afectan la Depuración en Lagunas Facultativas. Biblioteca Virtual del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico del Agua (CIDTA), Universidad de Salamanca. Disponible en: <http://aulavirtual.usal.es/aulavirtual/demos/edar/unidades/LIBROS/DLAR-MO/parte-I/cap6/cap6,1.html> Visitada el 16 de abril de 2012 16:15 hrs.

Blaylock, M. 2000. Field demonstrations of phytoremediation of lead-contaminated soils. En: Terry N.; Bañuelos G. (Ed.). *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Pp 1-12. Lewis Publishers, Florida

Bonanno G., Lo Giudice R. 2010. Heavy metal bioaccumulation by the organs of *Phragmites australis* (common reed) and their potential use as contamination indicators. *Ecological Indicators* **10**: 639–645.

Boominathan R. y Doran P. 2003. Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species. *Journal of Biotechnology*. **101(2)**: 131–146.

Carpena R., Bernal P. 2007. Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos, *Revista Ecosistemas* **16**: 1-3.

Chehregani A., Noori M., Yazdi H. 2009. Phytoremediation of heavy-metal-polluted soils: Screening for new accumulator plants in Angouran mine (Iran) and evaluation of removal ability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **72(5)**:1349–1353.

Colangelo E., Guerinot M. 2006. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. *Current Opinion in Plant Biology*. **9(3)**: 322–330.

Consejo Minero. 2007. Informe Económico. Disponible en: http://www.consejominero.cl/home/doc/Mem_07.pdf. Visitada el 23 de Mayo, a las 15:09hrs.

Cuadros-Rodríguez, L., García-Campaña, A.M., Jiménez-Linares, C., Román-Ceba, M. 1993. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Anal. Lett.* **26**:1243-1258.

Curl E. and Truoglove B. 1986. *The Rhizosphere. Chapter 3. Root Exudates.* Springer-Verlag, Berlin.

García S. 2010. Material Particulado y enfermedad cardiovascular. *Rev Chil Cardio.* **29**: 357 - 358

García-Lorenzo M., Pérez-Sirvent C., Martínez-Sánchez M., Molina-Ruiz J. 2012. Trace elements contamination in an abandoned mining site in a semiarid zone *Journal of Geochemical Exploration.* **113**: 23-35.

García M., Suárez V., Romera F., Alcántara E., Pérez-Vicente R. 2011. A new model involving ethylene, nitric oxide and Fe to explain the regulation of Fe-acquisition genes in Strategy I plants. *49(5)*: 537–544.

Gaume A., Mächler F., De León C., Narro L. y Frossard E. 2001. Low-P tolerance by maize (*Zea mays* L.) genotypes: Significance of root growth, and organic acids and acid phosphatase root exudation. *Plant and Soil.* **228**: 253–264.

Gaume A., Mächler F., y Frossard E. 2001. Aluminum resistance in two cultivars of *Zea mays* L.: Root exudation of organic acids and influence of phosphorus nutrition. *Plant and Soil.* **234**: 73–81.

González D. y Zapata O. (2008) Mecanismos de Tolerancia a Elementos Potencialmente Tóxicos en Plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* **82**: 41-49.

Graham D., Stangoulis J. 2003. Trace Element Uptake and Distribution in Plants. *J. Nutr.* **133(5)**: 1502-1505.

Han F., Shan X., Zhang S., Wen B., Owens G. 2006. Enhanced cadmium accumulation in maize roots—the impact of organic acids. *Plant Soil* **289**:355–368.

Harada E., Sugase K., Namba K., Iwashita T., Murata Y. 2007. Structural elements responsible for the Fe (III)–phytosiderophore specific transport by HvYS1 transporter in barley. **581(22)**: 4298–4302.

He J., Chu A., Ryan M., Valeo C. y Zaitlin B. 2011. Abiotic influences on dissolved oxygen in a riverine environment. *Ecological Engineering*. **37(11)**: 1804–1814.

Hoogewijs M., Rijsselaere T., De Vlieghe S., Vanhaesebrouck E., De Schauwer C., Govaere J., Thys M. 2010. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. *Theriogenology*. **74(1)**:118-26

Jeschke D., Kirkby E., Peuke A., Pate J. y Hartung W. 1997. Effects of P deficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) *J. Exp. Bot.* **48**: 75–91.

Jones D., y Darrah P. 1994. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant and Soil* **166**: 247–257.

Jones, David L. 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil* **205**: 25–44.

Kidd P., Becerra C., García M., Monterroso. C. 2007. Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género *Alyssum* L., Revista Ecosistemas **16**: 26- 43.

Kirkby, E. y Römheld V. 2007. Proceedings 543. *En* Micronutrients in plant physiology: functions, uptake and mobility. Proceedings 543.pp1-51. The International Fertilizer Society. York, UK..

Klugh-Stewart K. y Cumming J. 2009. Organic acid exudation by mycorrhizal *Andropogon virginicus* L. (broomsedge) roots in response to aluminum. Soil Biology and Biochemistry. **41(2)**:367–373.

Kwong Y., Beauchemin S., Hossain M., Gould W. 2007. Transformation and mobilization of arsenic in the historic Cobalt mining camp, Ontario, Canada. Journal of Geochemical Exploration. **92(2–3)**:133–150

Lei L., Song .Xie X., Li Y., Wang F. (2010). Acid mine drainage and heavy metal contamination in groundwater of metal sulfide mine at arid territory (BS mine, Western Australia). Trans. Nonferrous Met. Soc. China. **20**: 1488-1493.

Lim T., Tay J., Teh C. 2002. Contamination time effect on lead and cadmium fractionation in a tropical coastal clay. Environ Qual. **31**: 806–812.

Lissner J., Mendelssohn I. y Anastasiou C. 2003. A method for cultivating plants under controlled redox intensities in hydroponics. *Aquatic Botany*. **76(2)**: 93–108.

Lytle C., Lytle F. y Yang N. 1998. Reduction of Cr(VI) to Cr(III) by wetland plants: potential for *in situ* heavy metal detoxification. *Environ Sci Technol*. **32**: 3087–3093.

Ma J., Ryan P., Delhaize E. 2005. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*. **6(6)**: 273–278.

Maksaev V. 2010. Impacto ambiental de la actividad minera. Biblioteca Virtual del Centro de Computación, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile. Disponible en: <http://www.cec.uchile.cl/~vmaksaev/IMPACTO%20AMBIENTAL%20DE%20LA%20ACTIVIDAD%20MINERA.pdf>. Visitada el 24 de abril de 2012, 16:46 hrs.

Magdziak Z., Kozłowska M., Kaczmarek Z., Mleczek M. 2010. Influence of Ca/Mg ratio on phytoextraction properties of *Salix viminalis*. II. Secretion of low molecular weight organic acids to the rhizosphere. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74(1)**: 33-40.

McCutcheon S. and Schnoor J. 2003. *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*. Wiley, New York. Disponible en: <http://www.certified->

easy.com/aa.php?isbn=ISBN:0471394351&name=Phytoremediation,_Transformation_and_Control_of_Contaminants Visitada el 25 de abril de 2012, 14:13 hrs.

Mariano E. y Keltjens W. 2003. Evaluating the role of root citrate exudation as a mechanism of aluminium resistance in maize genotypes. *Plant and Soil*. **256**: 469–479.

Marín I. y Morales M. 2008. Estudio del efecto de *Polypogon australis* sobre las propiedades fisicoquímicas de un sustrato de relave minero de la planta Santo Domingo, Paposo, II Región de Chile. Trabajo de Titulación de Ingeniería de Ejecución en Ambiente, Universidad de Santiago de Chile.

Mays P. y Edwards G. 2001. Comparison of heavy metal accumulation in a natural wetland and constructed wetlands receiving acid mine drainage. *Ecol. Eng.*, **16**:487–500.

Meier S., Alvear M., Borie F., Aguilera P., Ginocchio R. y Cornejo P. 2012. Influence of copper on root exudate patterns in some metallophytes and agricultural plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **75**: 8–15.

Ministerio de Minería. 2002. Historia de la minería en Chile. Disponible en: <http://www.minmineria.gob.cl/la-mineria-en-chile/historia-de-la-mineria-en-chile/>.

Visitada el 20 de Abril de 2012, 01:30hrs.

Miller J., Hudson-Edwards K., Lechler P., Preston D, Macklin M. (2004). Heavy metal contamination of water, soil and produce within riverine communities of the Río Pilcomayo basin, Bolivia. *Science of the Total Environment* **320**:189–209.

Miranda de Andrade L., Ikeda M., Velho do Amaral L., Ishizuka J. 2011. Organic acid metabolism and root excretion of malate in wheat cultivars under aluminium stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. **49(1)**: 55–60.

Nascimento C., Xing B. 2006. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)*.**63**:299-311.

Narváez J., Richter P., Toral M. 2007. Preliminary Physical Chemical Characterization of River Waters and Sediments Affected by Copper Mining Activity in Central Chile. Application of Multivariate Analysis. *J. Chil. Chem. Soc.* **52(3)**: 1261-1265.

Ning L., Liyuana Y., Jirui D., Xugui P. 2011. Heavy Metal Pollution in Surface Water of Linglong Gold Mining Area, China. *Procedia Environmental Sciences* **10**:914 – 917.

Niu Z., Sun L., Sun T., Li Y., Wang H. 2007. Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. *Journal of Environmental Sciences*. **19**: 961–967.

Oburger E., Kirk G., Wenzel W., Puschenreiter M. y Jones D. 2009. Interactive effects of organicacids in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*. **41(3)**: 449–457.

Ortiz C., Alcaide O., Li Kao J. 2008. Distribución de cobre en hojas y raíces de plantas que crecen sobre relaves mineros de cobre en el norte de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* **81**: 489-499.

Quesada M. Revista On-Line “Saber de Ciencias”, Apuntes de Microbiología; Efectos de los agentes físicos y químicos sobre la vida bacteriana. Disponible en: <http://www.saberdeciencias.com.ar/index.php/apuntes-de-microbiologia/168-microbiologia-efectos-de-los-agentes-fisicos-y-quimicos-sobre-la-vida-bacteriana>.

Visitada el 16 de febrero de 2012 22:05 hrs.

Rascio N., Navari-Izza F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*. **180(2)**: 169–181.

Rosas A., Rengel Z. y Mora M. 2007. Manganese Supply and pH Influence Growth, Carboxylate Exudation and Peroxidase Activity of Ryegrass and White. Clover. *Journal of Plant Nutrition*, **30**: 253–270.

Salazar R., Garcia-Segura S., Ureta-Zañartu M.S., Brillas E. 2011. Degradation of disperse azo dyes from waters by solar photoelectro-Fenton. *Electrochimica Acta* **56**:6371– 6379

Salazar R., Brillas E., Sirés I. 2012. Finding the best Fe²⁺/Cu²⁺ combination for the solar photoelectro-Fenton treatment of simulated wastewater containing the industrial textile dye Disperse Blue 3. *Applied Catalysis B: Environmental* **115– 116**: 107– 116

Shan X., Wang H., Zhang S., Zhou H., Zheng Y., Yu H., Wen B. 2003. Accumulation and uptake of light rare earth elements in a hyperaccumulator *Dicropteris dichotoma*. *Plant Science*. **165(6)**:1343–1353

Shen H., Yan X., Zhao M., Zheng S., Wang X. 2002. Exudation of organic acids in common bean as related to mobilization of aluminum- and iron-bound phosphates. *Environmental and Experimental Botany*. **48(1)**: 1–9.

Smith E., Naik D., Cumming J. 2011. Genotypic variation in aluminum resistance, cellular aluminum fractions, callose and pectin formation and organic acid accumulation in roots of *Populus* hybrids. *Environmental and Experimental Botany* **72(2)**:182–193

Southichak B., Nakano K., Nomura M., Chiba N., Nishimura O. 2006. *Phragmites australis*: A novel biosorbent for the removal of heavy metals from aqueous solution. *Water research* **40**: 2295 – 2302.

Suarez M., Vidal M., Gómez R. “Ecología de Aguas Continentales”, Lección 4. Tipología y origen de los materiales presentes en el agua, Universidad de Murcia.

Disponible en: <http://ocw.um.es/ciencias/ecologia/material-de-clase-1/leccion-4-1>

Visitada el 16 de abril de 2012 16:00 hrs.

Tong C., Zhang L., Wang W., Gauci V., Marrs R., Liu B., Jia R. y Zeng C. 2011. Contrasting nutrient stocks and litter decomposition in stands of native and invasive species in a sub-tropical estuarine marsh. *Environmental Research*.**111**(7): 909–916.

USEPA. 2000. Introduction to Phytoremediation. EPA 600-R-99-107

USEPA. 2001. Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water at Hazardous Waste Sites. Ground Water Issue EPA/540/S-01/500

Vila I. 2003. Caracterización de ecosistemas acuáticos. Interacciones sedimento-agua. En: Alicia Fernández Cirelli (Ed). *El Agua en Iberoamérica, Aportes para la integración entre los organismos de gestión y los centros de investigación*. Pp 18-20. Programa Iberoamericano De Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.

Vivas A., Azcón R., Biró B., Barea J., Ruiz-Lozano J..2003. Influence of bacterial strains isolated from lead polluted soil and their interactions with arbuscular mycorrhizae on the growth of *Trifolium pratense* L. under lead toxicity. *Can. J. Microbiol.* **49**: 577–588.

Vesely T., Tlustoš P., Száková J. 2007. Organic salts enhanced soil risk elements leaching and bioaccumulation in *Pistia stratiotes*. *Plant Soil Environ.* **57**: 166–172.

Vymazal J., Svehla J., Kropfelova L., Chrastny V. 2007. Trace Metals in *Phragmites australis* and *Phalaris arundinaceas* growing in constructed and natural wetlands. Sci. Tot. Environ. **380**: 154-162.

Wu P., Liu C., Zhang G. 2002. Characteristics of Heavy Metal Pollution in stream Zinc Smelting Area, Northwest of Guizhou [J]. Agro-environmental Protection. **21(5)**: 443-446.

Yang X., Feng Y., He Z., Stoffella P. 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology., **18(4)**:339–353.

Ye Z., Baker A., Wong M., Willis A. 1997. Zinc, Lead and Cadmium Tolerance, Uptake and Accumulation by the Common Reed, *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. Annals of Botany **80**: 363-370.

Yeh T., Chou C., Pan C. 2009. Heavy metal removal within pilot-scale constructed wetlands receiving river water contaminated by confined swine operations. Desalination. **249(1)**: 368–373.

Yruela I (2005) Copper in plants. Braz J Plant Physiol **17**: 145-146.

Yruela I. (2009). Copper in plants: Acquisition, Transport and Interactions. Functional Plant Biology. **36(5)**: 409-430.

Zeng F., Chen S., Miao Y., Wu F., Zhang G. 2009. Changes of organic acid exudation and rhizosphere pH in rice plants under chromium stress. *Environmental Pollution*. **155(2)**: 284–289.

Zhang B., Zheng J., Sharp R. 2010. Phytoremediation in Engineered Wetlands: Mechanisms and Applications. *Procedia Environmental Sciences* **2**:1315–1325

VI. ANEXOS

ANEXO I. Curvas de Calibración y Límites de Detección y Cuantificación para análisis de metales

Previo a la determinación de las concentraciones de metales en las distintas muestras trabajadas, se debió seleccionar los metales que serán objeto de estudio y elaborar las respectivas curvas de calibración. Para esto, se tomó como referencia un estudio previo de caracterización del RIL proveniente del Tranque de Relaves “El Talabre (Espinoza, 2011), el cual entregó algunas referencias respecto de los metales presentes y sus concentraciones. La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos:

Tabla 9: Concentración de metales en RIL “Talabre”.

Metal	Concentración Promedio (μM)	Concentración Promedio (mg/L)
Cadmio	0,098	0,011
Cobre	2,81	0,179
Zinc	1,70	0,111
Manganeso	26,96	1,48
Níquel	0,042	0,002
Plomo	0,083	0,017
Hierro	6,3	0,352

Según estos resultados, sólo Cobre (Cu), Zinc (Zn), Manganeso (Mn) y Hierro (Fe) se encuentran en cantidades significativas, por lo que se seleccionaron para los análisis realizados. El resto de los metales se presenta en concentraciones bajas, cercanas o incluso menores al límite de detección del equipo ICP-OES (0,010 mg/L).

Las curvas de calibración elaboradas se muestran a continuación:

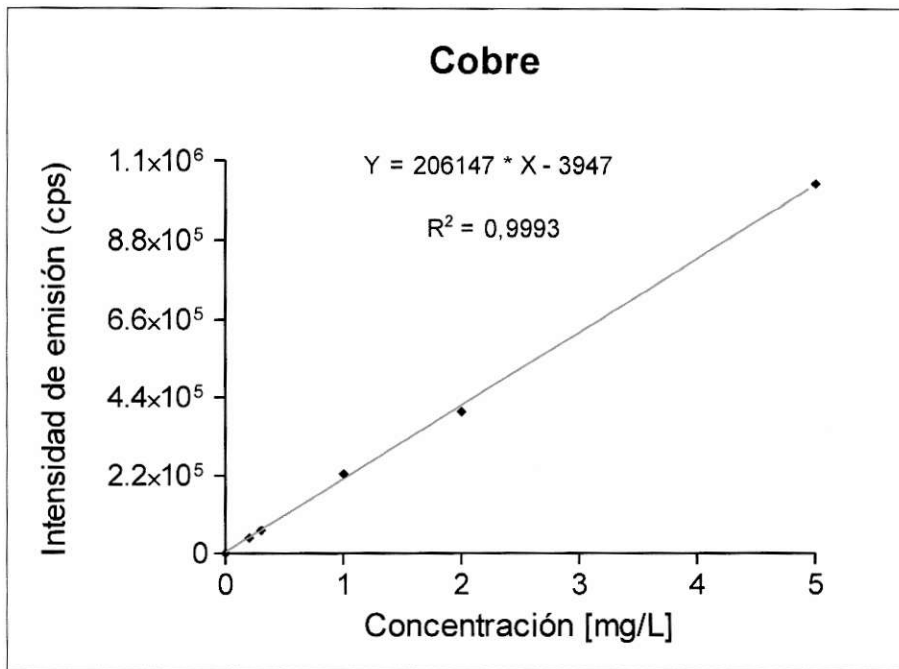


Figura 40: Curva de Calibración para Cobre

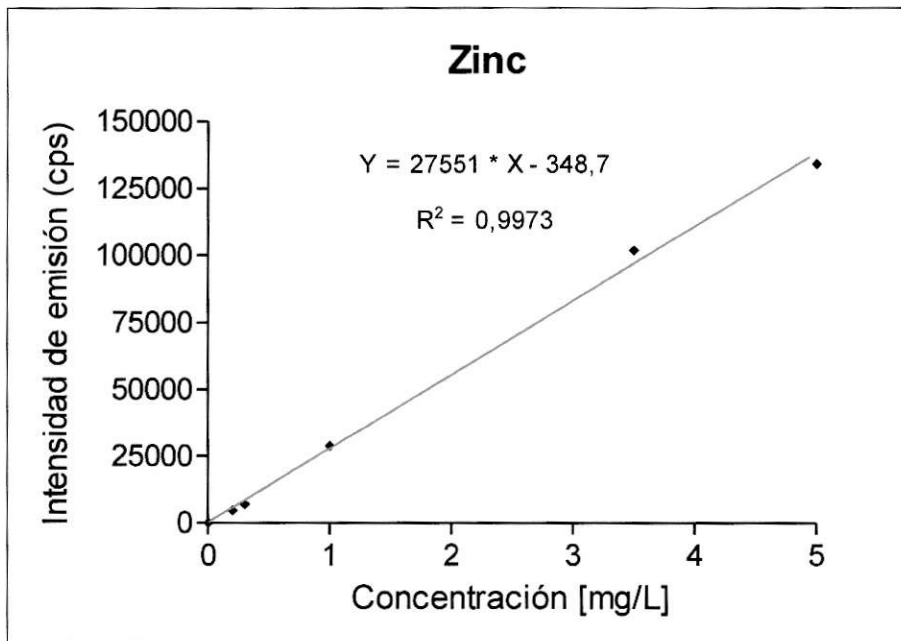


Figura 41: Curva de Calibración para Zinc

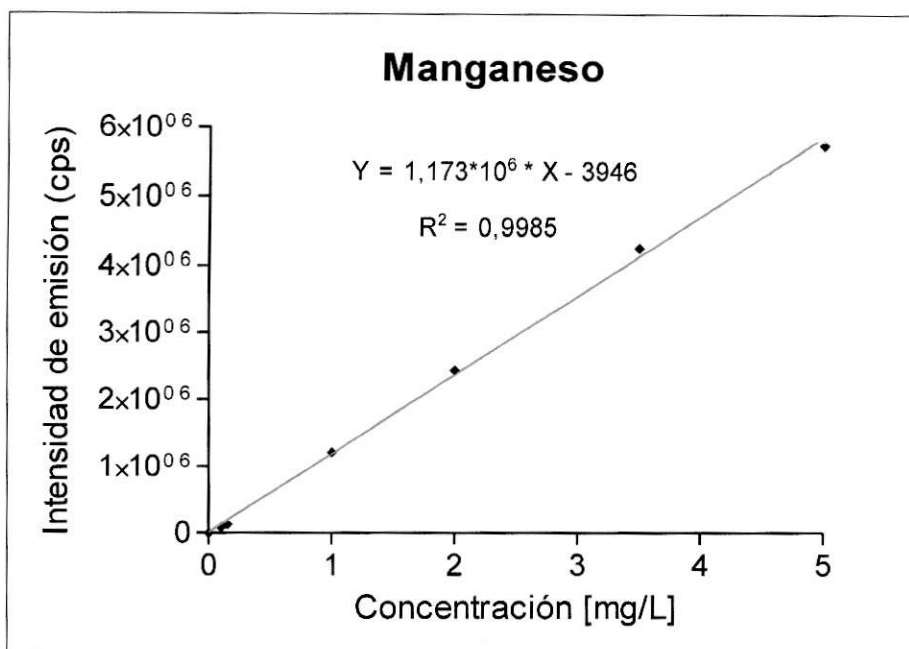


Figura 42: Curva de Calibración para Manganeso

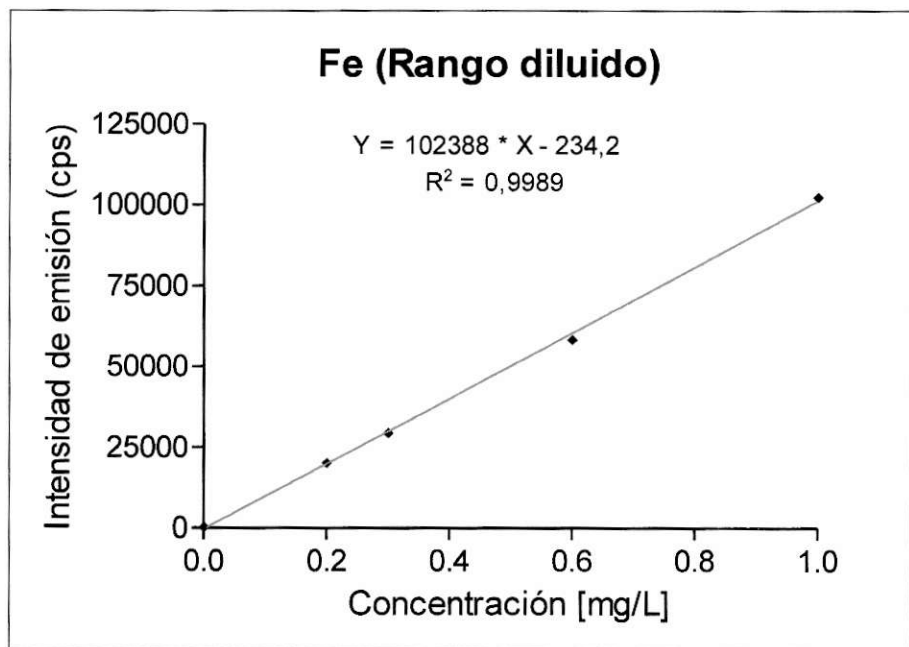


Figura 43: Curva de Calibración para Hierro para concentraciones bajas

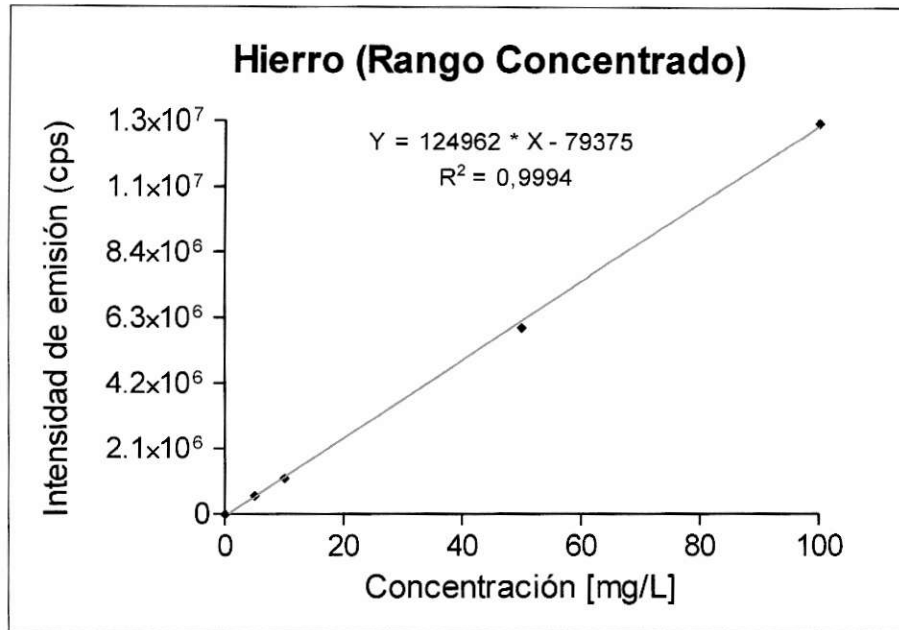


Figura 44: Curva de Calibración para Hierro para concentraciones altas.

Para el cálculo de los Límites de Detección (LDD) y Límites de Cuantificación (LDC) se utilizaron las ecuaciones descritas en (Cuadros y col, 1993). De esta manera, se tiene que el LDD corresponde a:

$$LDD = 3 \left(\frac{DS_{y/x}}{m} \right) * \frac{\sqrt{N-1}}{N-2}$$

Y el LDC corresponde a:

$$LDC = 10 \left(\frac{DS_{y/x}}{m} \right) * \frac{\sqrt{N-1}}{N-2}$$

Donde:

$DS_{y/x}$: Desviación estándar del ajuste de la curva de calibración

m : Pendiente de la curva de calibración

N : Número de puntos de la curva de calibración

Entonces, con los valores de m , N y $DS_{y/x}$, entregados por el programa GraphPad Prism 5 al momento de graficar las curvas de calibración, y la utilización de estas ecuaciones, se calcularon los respectivos LDD y LDC para cada método analítico:

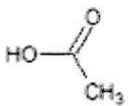
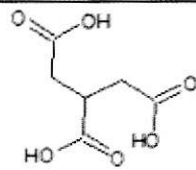

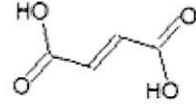
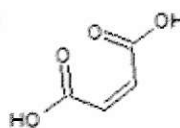
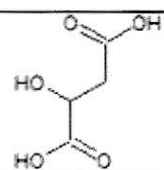
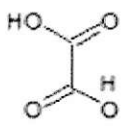
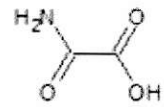
Tabla 10: Límites de detección y cuantificación para cada método analítico.

Metal	LDD (mg/L)	LDC (mg/L)
Cobre	$1,69 \cdot 10^{-2}$	$5,63 \cdot 10^{-2}$
Zinc	$1,49 \cdot 10^{-2}$	$4,90 \cdot 10^{-2}$
Manganeso	$1,60 \cdot 10^{-2}$	$5,33 \cdot 10^{-2}$
Hierro Dil.	$1,90 \cdot 10^{-2}$	$6,71 \cdot 10^{-2}$
Hierro Conc.	2,33	7,76

ANEXO II. Curvas de Calibración y Límites de Detección y Cuantificación para análisis Ácidos Orgánicos

Debido a que no se tenía certeza de cuáles ácidos orgánicos (A.O.) se encontrarían en la planta, se realizaron ensayos con patrones de los A. O. encontrados con mayor frecuencia en especies vegetales con potencial en fitorremediación, para estudiar sus señales y luego elaborar las curvas de calibración. De los A. O. reportados en la literatura, se seleccionaron los 8 más comunes:

Tabla 11: Compuestos seleccionados y rango de concentración de las curvas de calibración

Nombre General	Estructura ¹	Rango de Concentración	Nombre General	Estructura ¹	Rango de Concentración
Acido acético		5-100mg L	Acido cítrico		5-10 mg L
Acido fórmico		10-100 mg L	Acido fumárico		1-10 mg L
Acido Maleico		5-10 mg L	Acido málico		10-100 mg L
Acido oxálico		2-10 mg L	Acido oxámico		1-10mg L

¹ Fuente: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

El rango de concentraciones utilizado en cada curva tiene que ver directamente con la intensidad de las señales registradas en las inyecciones de prueba, los que permitieron tener una idea de las concentraciones presentes en las plantas. A continuación se presentan las curvas de calibración de los A.O. detectados en las raíces de *Phragmites australis*:

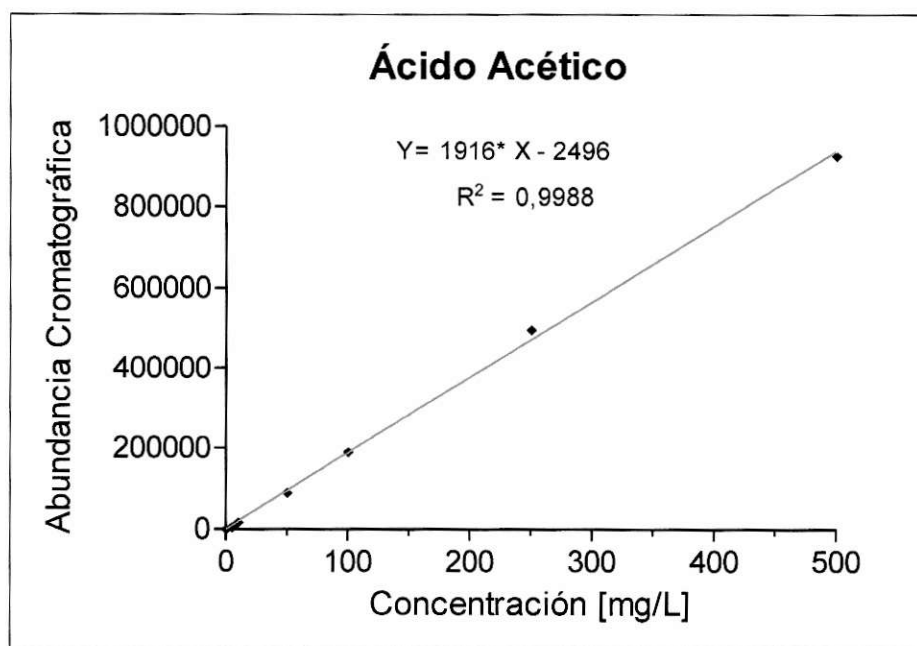


Figura 45: Curva de Calibración para Ácido Acético

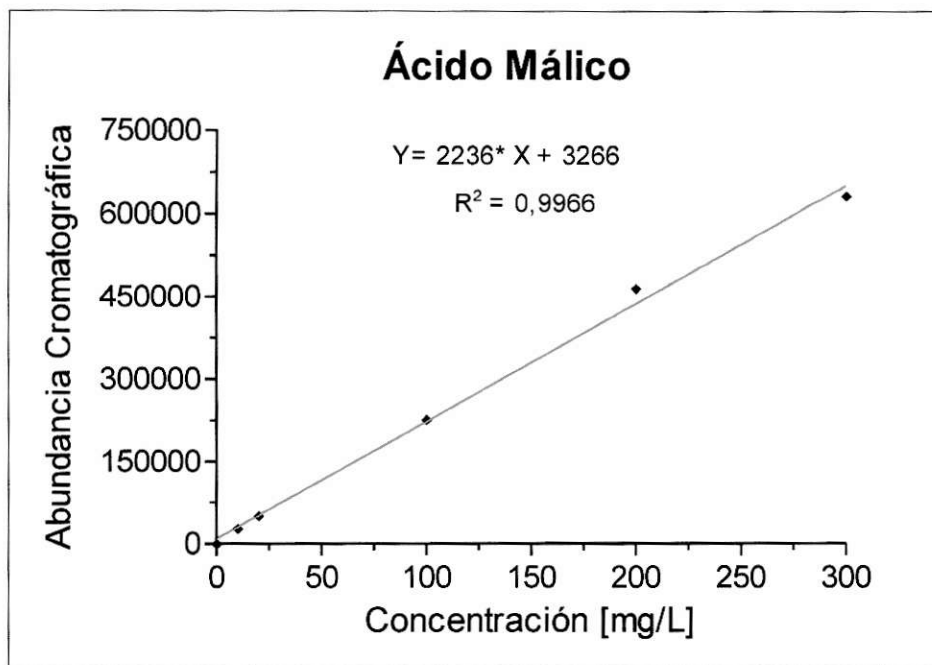


Figura 46: Curva de Calibración para Ácido Málico

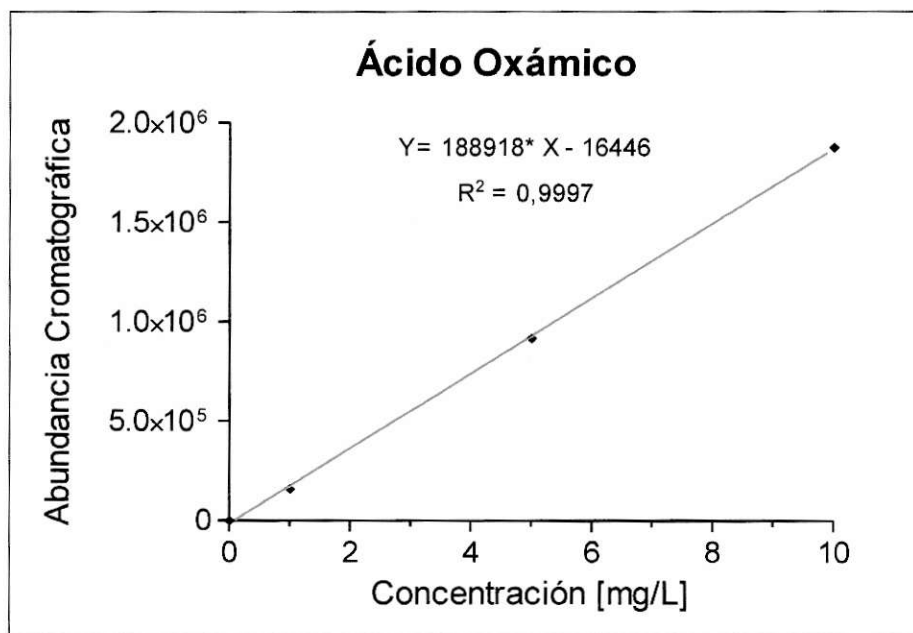


Figura 47: Curva de Calibración para Ácido Oxámico

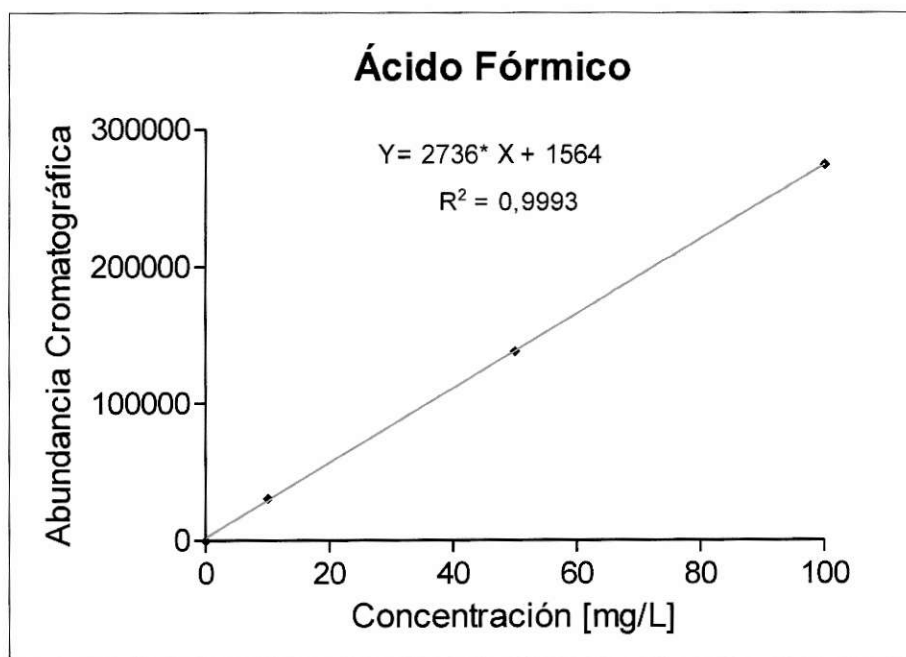


Figura 48: Curva de Calibración para Ácido Fórmico

Para el cálculo de los Límites de Detección (LDD) y Límites de Cuantificación (LDC) se utilizó el mismo procedimiento descrito en el ANEXO I. De esta manera, se obtuvieron los valores mostrados en la Tabla 11.

Tabla 11: Límites de Detección y Cuantificación para análisis de Ácidos Orgánicos

Ácido Orgánico	LDD (mg/L)	LDC (mg/L)	Rangos de Concentración Detectados
Ácido Acético	2,51	8,36	36,14- 312,95 mg/L
Ácido Málico Dil.	8,36	9,41	66,59- 9285,1 mg/L
Ácido Málico Conc.	156,2	520,0	
Ácido Oxámico	0,23	0,96	0,91- 1,07 mg/L
Ácido Fórmico	3,48	11,61	4,01- 6,12 mg/L

ANEXO III. Concentración de metales en muestras vegetales y sustratos

1. Concentración de metales en sustratos.

En las tablas que se exponen a continuación, se presentan la variación de la concentración de los distintos metales estudiados, en cada uno de los sustratos utilizados.

Tabla 13: Concentración de Fe en sustratos

Tiempo (Días)	Fe en RIL		Fe en solución de CuSO_4 15 μM		Fe en Agua Milli-Q		Fe en Phost	
	Contenido (mg/L)	ES	Contenido (mg/L)	ES	Contenido (mg/L)	ES	Contenido (mg/L)	ES
0	<LDD	-	<LDD	-	<LDD	-	0,033	0,003
2	<LDD	-	<LDD	-	<LDD	-	<LDD	-
7	0,033	0,016	<LDD	-	<LDD	-	<LDD	-
15	<LDD	-	<LDD	-	<LDD	-	<LDD	-
30	0,031	0,015	0,024	0,016	<LDD	-	0,059	-

Tabla 14: Concentración Cu en los distintos sustratos líquidos utilizados.

Tiempo (Días)	Cu en RIL		Cu en solución de CuSO_4 15 μM		Cu en Agua Milli-Q		Cu en Phost	
	Contenido (mg/L)	ES	Contenido (mg/L)	ES	Contenido (mg/L)	ES	Contenido (mg/L)	ES
0	1,683	0,019	0,966	0,007	0,005	-	0,031	0,003
2	0,572	0,217	0,083	0,034	0,000	-	0,001	-
7	0,691	0,099	0,090	0,034	0,000	-	0,000	-
15	0,231	0,090	0,050	0,010	0,007	-	0,004	-
30	0,173	0,025	0,109	0,013	0,006	-	0,013	-

Tabla 15: Concentración Zn en los distintos sustratos líquidos utilizados.

Tiempo (Días)	Zn en RIL		Zn en solución de CuSO_4 15 μM		Zn en Agua Milli-Q		Zn en Phost	
	Contenido (mg/L)	ES	Contenido (mg/L)	ES	Contenido (mg/L)	ES	Contenido (mg/L)	ES
0	0,710	0,006	0,018	0,005	0,017	-	0,029	0,009
2	0,577	0,034	0,020	0,003	0,024	-	0,058	-
7	0,643	0,010	0,051	0,013	0,056	-	0,167	-
15	0,535	0,094	0,032	0,016	0,031	-	0,046	-
30	0,526	0,139	0,110	0,032	0,067	-	0,081	-

Tabla 16: Concentración Mn en los distintos sustratos líquidos utilizados.

Tiempo (Días)	Mn en RIL		Mn en solución de CuSO ₄ 15µM		Mn en Agua Milli-Q		Mn en Phost	
	Contenido (mg/L)	ES	Contenido (mg/L)	ES	Contenido (mg/L)	ES	Contenido (mg/L)	ES
0	4,880	0,170	0,007	0,006	0,002	-	0,015	0,001
2	4,177	0,328	0,036	0,023	0,014	-	0,005	-
7	4,710	0,127	0,101	0,092	0,003	-	0,223	-
15	3,295	1,049	0,035	0,029	0,001	-	0,203	-
30	4,400	0,605	0,035	0,032	0,005	-	0,332	-

2. Concentraciones efectivas de metal en plantas

En las tablas que se exponen a continuación, se presentan los valores totales de metal absorbidos por la planta, según el tratamiento al cual fueron sometidas.

a. Contenido de metales en *Phragmites australis* bajo tratamiento con RIL “Talabre”

Tabla 17: Concentración efectiva de Cu en Raíces de *Phragmites australis* bajo tratamiento con RIL “Talabre”

Tiempo (Días)	Cu en Raíz de planta bajo tratamiento (mg/Kg p.s.)	Cu en Raíz de planta control (mg/Kg p.s.)	Balance (mg/ Kg p.s.)
0	13,7	13,7	0,0
2	99,3	15,2	84,1
7	281,4	13,4	268,0
15	221,9	6,3	215,6
30	185,5	10,2	175,4

Tabla 18: Concentración efectiva de Cu en Hojas de *Phragmites australis* bajo tratamiento con RIL “Talabre”

Tiempo (Días)	Cu en Hoja de planta bajo tratamiento (mg/Kg p.s.)	Cu en Hoja de planta control (mg/Kg p.s.)	Balance (mg/ Kg p.s.)
0	6,3	6,3	0,0
2	7,9	4,3	3,6
7	15,7	5,6	10,1
15	35,2	4,3	30,9
30	35,9	3,9	31,9

Tabla 19: Concentración efectiva de Zn en Raíces de *Phragmites australis* bajo tratamiento con RIL “Talabre”

Tiempo (Días)	Zn en Raíz de planta bajo tratamiento (mg/Kg p.s.)	Zn en Raíz de planta control (mg/Kg p.s.)	Balance (mg/ Kg p.s.)
0	18,8	18,8	0,0
2	39,1	29,6	9,5
7	47,5	20,5	27,0
15	33,3	9,1	24,2
30	39,9	24,8	15,0

Tabla 20: Concentración efectiva de Zn en Hojas de *Phragmites australis* bajo tratamiento con RIL “Talabre”

Tiempo (Días)	Zn en Hoja de planta bajo tratamiento (mg/Kg p.s.)	Zn en Hoja de planta control (mg/Kg p.s.)	Balance (mg/ Kg p.s.)
0	18,8	18,8	0,0
2	31,4	4,3	27,1
7	29,4	5,5	23,8
15	36,1	4,3	31,8
30	24,2	3,9	20,2

Tabla 21: Concentración efectiva de Mn en Raíces de *Phragmites australis* bajo tratamiento con RIL “Talabre”

Tiempo (Días)	Mn en Raíz de planta bajo tratamiento (mg/Kg p.s.)	Mn en Raíz de planta control (mg/Kg p.s.)	Balance (mg/ Kg p.s.)
0	34,1	34,1	0,000
2	42,0	54,5	0,0
7	37,2	38,7	0,0
15	18,2	12,4	5,7
30	33,7	18,9	14,8

Tabla 22: Concentración efectiva de Mn en Hojas de *Phragmites australis* bajo tratamiento con RIL “Talabre”

Tiempo (Días)	Mn en Hoja de planta bajo tratamiento (mg/Kg p.s.)	Mn en Hoja de planta control (mg/Kg p.s.)	Balance (mg/ Kg p.s.)
0	21,2	21,2	0,0
2	36,4	36,3	0,09
7	41,3	12,9	28,4
15	26,9	17,7	9,3
30	48,5	17,0	31,4

Tabla 23: Concentración efectiva de Fe en Raíces de *Phragmites australis* bajo tratamiento con RIL “Talabre”

Tiempo (Días)	Fe en Raíz de planta bajo tratamiento (mg/Kg p.s.)	Fe en Raíz de planta control (mg/Kg p.s.)	Balance (mg/ Kg p.s.)
0	743,9	743,9	0,0
2	1039,7	471,4	568,3
7	1078,1	1330,0	0,0
15	604,5	218,2	386,4
30	148,7	346,4	0

Tabla 24: Concentración efectiva de Fe en Hojas de *Phragmites australis* bajo tratamiento con RIL “Talabre”

Tiempo (Días)	Fe en Hoja de planta bajo tratamiento (mg/Kg p.s.)	Fe en Hoja de planta control (mg/Kg p.s.)	Balance (mg/ Kg p.s.)
0	68,6	62,7	5,8
2	53,7	72,8	0,0
7	255,1	67,9	187,2
15	204,6	43,5	161,1
30	141,3	43,6	97,6

b. Contenido de metales en *Phragmites australis* bajo tratamiento con Solución de CuSO₄

Tabla 25: Concentración efectiva de Cu en Raíces de *Phragmites australis* bajo tratamiento con Solución de CuSO₄ 15µM

Tiempo (Días)	Cu en Raíz de planta bajo tratamiento (mg/Kg p.s.)	Cu en Raíz de planta control (mg/Kg p.s.)	Balance (mg/ Kg p.s.)
0	13,7	13,7	0,0
2	72,4	15,2	57,2
7	136,2	13,4	122,8
15	291,2	6,3	284,9
30	226,3	10,2	216,1

Tabla 26: Concentración efectiva de Cu en Hojas de *Phragmites australis* bajo tratamiento con Solución de CuSO₄ 15µM

Tiempo (Días)	Cu en Raíz de planta bajo tratamiento (mg/Kg p.s.)	Cu en Raíz de planta control (mg/Kg p.s.)	Balance (mg/ Kg p.s.)
0	6,3	6,3	0,0
2	31,1	4,3	26,7
7	27,0	5,5	21,5
15	32,6	4,3	28,3
30	20,2	3,9	16,2

Tabla 27: Concentración efectiva de Zn en Raíces de *Phragmites australis* bajo tratamiento con Solución de CuSO₄ 15µM

Tiempo (Días)	Zn en Raíz de planta bajo tratamiento (mg/Kg p.s.)	Zn en Raíz de planta control (mg/Kg p.s.)	Balance (mg/ Kg p.s.)
0	18,8	18,8	0,0
2	36,8	29,6	7,2
7	27,7	20,5	7,2
15	39,1	9,1	29,9
30	41,0	24,8	16,2

Tabla 28: Concentración efectiva de Zn en Hojas de *Phragmites australis* bajo tratamiento con Solución de CuSO₄ 15µM

Tiempo (Días)	Zn en Raíz de planta bajo tratamiento (mg/Kg p.s.)	Zn en Raíz de planta control (mg/Kg p.s.)	Balance (mg/ Kg p.s.)
0	18,8	18,8	0,0
2	18,2	4,3	13,9
7	18,9	5,5	13,5
15	10,4	4,3	6,1
30	24,0	3,9	20,1

Tabla 29: Concentración efectiva de Mn en Raíces de *Phragmites australis* bajo tratamiento con Solución de CuSO₄ 15µM

Tiempo (Días)	Mn en Raíz de planta bajo tratamiento (mg/Kg p.s.)	Mn en Raíz de planta control (mg/Kg p.s.)	Balance (mg/ Kg p.s.)
0	34,1	34,1	0,0
2	31,9	54,5	0,0
7	63,2	38,7	24,5
15	107,5	12,4	95,0
30	38,6	18,9	19,7

Tabla 30: Concentración efectiva de Mn en Hojas de *Phragmites australis* bajo tratamiento con Solución de CuSO₄ 15μM

Tiempo (Días)	Mn en Raíz de planta bajo tratamiento (mg/Kg p.s.)	Mn en Raíz de planta control (mg/Kg p.s.)	Balance (mg/ Kg p.s.)
0	21,2	21,2	0,0
2	25,6	36,3	0,0
7	23,9	12,9	11,0
15	16,9	17,7	0,0
30	24,5	17,0	7,4

Tabla 31: Concentración efectiva de Fe en Raíces de *Phragmites australis* bajo tratamiento con Solución de CuSO₄ 15μM

Tiempo (Días)	Mn en Raíz de planta bajo tratamiento (mg/Kg p.s.)	Mn en Raíz de planta control (mg/Kg p.s.)	Balance (mg/ Kg p.s.)
0	743,9	743,9	0,0
2	850,0	471,4	378,6
7	1633,5	1330,0	303,5
15	1607,2	218,2	1389,0
30	428,2	346,4	81,8

Tabla 32: Concentración efectiva de Fe en Hojas de *Phragmites australis* bajo tratamiento con Solución de CuSO₄ 15μM

Tiempo (Días)	Mn en Raíz de planta bajo tratamiento (mg/Kg p.s.)	Mn en Raíz de planta control (mg/Kg p.s.)	Balance (mg/ Kg p.s.)
0	68,6	62,7	5,8
2	58,5	72,8	0,0
7	56,7	67,9	0,0
15	164,3	43,5	120,8
30	75,9	43,6	32,30

ANEXO IV. Factores de Translocación (FT).

En este punto, se exponen los Factores de Translocación de cobre calculados para *Phragmites australis*. Para la obtención de este factor, se utilizó la siguiente expresión descrita por Veselý y col, (2011):

$$FT = \frac{[C_h]}{[C_r]}$$

Donde:

FT : Factor de Translocación

C_h : Concentración del metal en la hoja.

C_r : Concentración del metal en la raíz.

De esta forma, se obtienen los siguientes resultados:

Tabla 33: Factor de Translocación de cobre en raíces de *P. australis* tratadas con RIL “Talabre”.

Tiempo (Días)	Concentración de Cu (mg/Kg p.s.)		FT
	Hoja	Raíz	
0	6,3	13,7	0,46
2	7,9	99,3	0,08
7	15,7	281,4	0,06
15	35,2	221,9	0,16
30	35,9	185,5	0,19

Tabla 34: Factor de Translocación de cobre en raíces de *P. australis* tratadas con solución de CuSO_4 15 μM .

Tiempo (Días)	Concentración de Cu (mg/Kg p.s.)		FT
	Hoja	Raíz	
0	6,3	13,7	0,5
2	31,1	72,4	0,4
7	27,0	136,2	0,2
15	32,6	291,2	0,1
30	20,2	226,3	0,1

Tabla 35: Factor de Translocación de cobre en raíces de *P. australis* tratadas con Agua Milli-Q.

Tiempo (Días)	Concentración de Cu (mg/Kg p.s.)		FT
	Hoja	Raíz	
0	3,6	14,6	0,44
2	7,8	11,3	0,69
7	9,1	12,4	0,74
15	6,5	38,3	0,17
30	3,9	13,8	0,28

Tabla 36: Factor de Translocación de cobre en raíces de *P. australis* tratadas con Phostrogen 0,3g/L.

Tiempo (Días)	Concentración de Cu (mg/Kg p.s.)		FT
	Hoja	Raíz	
0	6,3	13,7	0,46
2	4,3	15,2	0,29
7	5,5	13,4	0,41
15	4,3	6,3	0,69
30	3,9	10,2	0,39

ANEXO V. Concentración de Ácidos Orgánicos.

En las tablas expuestas a continuación, se detallan las concentraciones de ácidos orgánicos encontradas en la raíces de *Phragmites australis*.

a. Ácido Acético

Tabla 37: Contenido de Ácido Acético en Raíces de *Phragmites australis* según tratamiento al cual fueron sometidas.

Tiempo (Días)	Á. Acético en RIL		Á. Acético en solución de CuSO ₄ 15µM		Á. Acético en Agua Milli-Q		Á. Acético en Phostrogen	
	Contenido (mmoles/Kg p. s.)	ES	Contenido (mmoles/Kg p. s.)	ES	Contenido (mmoles/Kg p. s.)	ES	Contenido (mmoles/Kg p. s.)	ES
0	6,385	0,7538	6,385	0,7538	6,385	0,7538	6,385418	0,7538
2	4,214	1,1907	3,855	0,0945	1,121	-	1,170000	-
7	4,863	1,1731	3,243	0,1731	3,967	-	3,966866	-
15	4,093	0,8252	0,000	0,0000	6,367	-	9,117313	-
30	7,657	0,6417	7,314	0,3302	17,159	-	14,104850	-

a. Ácido Málico

Tabla 38: Contenido de Ácido Málico en Raíces de *Phragmites australis* según tratamiento al cual fueron sometidas.

Tiempo (Días)	Á. Málico en RIL		Á. Málico en solución de CuSO ₄ 15µM		Á. Málico en Agua Milli-Q		Á. Málico en Phostrogen	
	Contenido (mmoles/Kg p. s.)	ES	Contenido (mmoles/Kg p. s.)	ES	Contenido (mmoles/Kg p. s.)	ES	Contenido (mmoles/Kg p. s.)	ES
0	294,30	38,259	294,30	38,259	294,30	38,259	294,30	38,259
2	184,82	13,449	87,70	45,064	59,93	-	56,72	-
7	354,87	42,517	256,64	16,383	113,45	-	113,45	-
15	198,16	13,051	81,10	34,703	22,57	-	41,13	-
30	63,82	25,267	92,87	52,475	119,07	-	101,29	-

ANEXO IV. Parámetros Físico-Químicos.

a. Temperatura (T)

Tabla 39: Temperatura de los distintos sustratos líquidos utilizados.

Tiempo (Días)	RIL		Solución de CuSO ₄ 15µM		Agua Milli-Q		Phost 0,3g/L	
	T(°C)	ES	T(°C)	ES	T(°C)	ES	T(°C)	ES
0	26,9	0,46	26,9	0,46	26,8	0,45	26,9	0,46
2	23,4	0,47	23,3	0,39	22,9	-	23,1	-
7	25,9	0,05	25,5	0,23	25,9	-	25,2	-
15	25,4	0,19	25,6	0,18	25,9	-	25,3	-
30	28,1	0,11	28,3	0,14	27,7	-	27,8	-

b. Sólidos Totales Disueltos (STD)

Tabla 40: Sólidos Totales Disueltos en los distintos sustratos líquidos utilizados.

Tiempo (Días)	RIL		Solución de CuSO ₄ 15µM		Agua Milli-Q		Phost 0,3g/L	
	STD(ppm)	ES	STD(ppm)	ES	STD(ppm)	ES	STD(ppm)	ES
0	463,7	1,7	32,0	1,53	37,1	0,6	126,3	12,67
2	497,2	4,3	28,7	2,03	43,7	-	237,0	-
7	510,5	2,0	40,7	2,03	37,5	-	248,0	-
15	640,3	7,84	46,0	1,01	76,4	-	298,0	-
30	518,8	7,62	35,0	1,53	90,8	-	151,0	-

ANEXO IV. Composición porcentual de nutriente Phostrogen.

Tabla 45: Composición porcentual de nutriente Phostrogen.

Componente	Porcentaje (%)
Nitrógeno Total	10
Nitrógeno Nítrico	8
Nitrógeno Amoniacal	3,5
Nitrógeno ureico	2,5
fosfórico (p2o5) soluble en citrato de amonio neutro y agua	10
Acido fosfórico (p2o5) soluble en agua	10
Oxido de potasio (k2o) soluble en agua	27