



**Universidad
Andrés Bello**

Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias de la Vida

Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**Desarrollo de una metodología de recuperación de suelos altamente
contaminados con metales pesados utilizando remediación fisicoquímica y
fitorremediación**

*Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de
Magister en Biotecnología*

Director de Tesis:
Carlos Calderón A.
Gerente I+D
BioTecnos S.A.

Julio Enrique Jara Medina

Viña del Mar, Chile

Enero, 2018



**Universidad
Andrés Bello**

Facultad de Ciencias de la Vida
Escuela de Ingeniería en Biotecnología

“Desarrollo de una metodología de recuperación de suelos altamente contaminados con metales pesados utilizando remediación fisicoquímica y fitorremediación”

Julio Enrique Jara Medina

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr(c) Carlos Calderón A., Gerente de I+D en la empresa BioTecnos S.A.

Dr(c) Carlos Calderón A.

Director de Tesis

Dr. Enrique Vinés

Comisión Evaluadora

Dr. Humberto Díaz

Comisión Evaluadora

Dra. M. Isabel Oliver P.

Directora de Carrera Ingeniería en Biotecnología

Viña del Mar, Chile

Enero 2018

“Dedicado a mis adorados e increíbles padres Julio y Liliana que gracias a su inmenso esfuerzo y dedicación hicieron de esto algo posible, a mis hermanos Violeta y Rafael por aguantarme y apoyarme en todo, a mi amada compañera de vida Camila que ha sido mi soporte en los momentos complejos y ha sido mi hinchada número uno en todo, a mi Tata un grandioso hombre, a mi familia, una familia inmensa de la cual estoy orgulloso de ser parte, finalmente a mis amigos los cuales a pesar de la distancia siempre están ahí, gracias por creer y confiar en mí”

“No estás tarde, no estás temprano, estás justo a tiempo...”

Agradecimiento

A la empresa BioTecnos S.A. por abrirme las puertas para poder desarrollar mi tesis tanto de Pregrado como Magister.

A mi director de tesis Carlos Calderón, por la confianza, apoyo y amistad entregados en este proceso, a Oscarín Evrard por su desinteresada ayuda en todo momento y amistad, ambos que conforman el equipo BioTecnos, me brindaron conocimientos, experiencia y motivación en todo momento y también a Aldo Silva por su gran ayuda en la etapa final de este trabajo.

Al Dr. Patricio Leyton Bongiorno, quien sin pensarlo depositó su confianza en mí, aceptándome para realizar mi primera pasantía en laboratorio y adicionalmente siendo mi mentor en mi primera práctica de laboratorio.

A la profesora Pamela Luttgés, al Dr. Enrique Vinés, Dra. Ximena Ortega, Dra. Francisca Blanco y Dra. Gloria Arriagada, de quienes aprendí muchísimo y de los cuales doy fe de su increíble compromiso docente, con una entrega y dedicación sorprendentes, personas a las cuales respeto y admiro muchísimo. Son simplemente ejemplos a seguir.

A la Dra. María Isabel Oliver de la escuela de Biotecnología Viña del Mar, quien estuvo ahí siempre para apoyar en todos los temas universitarios, siempre con gran disposición y empatía.

A mi comisión de tesis integrada por el Dr. Humberto Díaz y Dr. Enrique Vinés, por darse el tiempo de evaluar el trabajo realizado y sus consejos.

A mis queridos amigos de la universidad María José Álvarez, Angélica Bravo, Leonard Agurto con quienes sé podré contar siempre.

A mis increíbles compañeros Diego Tapia, Tomas Schwenke, Gianfranco Pietrantoni, Johan Quezada, Rodrigo Ibarra, Ignacio Valencia, Cristian Vásquez, Esteban Jeria, Constanza Saldías, Valentina López, con los cuales reí muchísimo, compartí y siempre que lo necesite me ayudaron y apoyaron en distintos momentos de mi etapa universitaria.

A Guillermo Díaz y Juan Ignacio Alfaro por su apoyo en experimentos del trabajo de tesis.

Índice

1. Resumen	11
1.1 Abstract.....	12
2. Introducción.....	13
2.1 Problemas en el ecosistema.....	13
2.2 Suelo, agua y aire	13
2.3 El suelo.....	15
2.4 Clasificación de suelos	18
2.5 Principales actividades de producción y daños al ambiente	19
2.6 La minería y su impacto.....	21
2.7 Polvos de fundición.....	22
2.8 Metales pesados	23
2.8.1 Biodisponibilidad de metales pesados.....	25
2.9 Normativas	29
2.9.1 Criterios de protección de calidad de suelos en relación a metales pesados	29
2.9.2 Análisis de riesgo.....	31
2.10 Remedación de suelos.....	34
2.10.1 Tecnologías en remedación de suelos en la actualidad	38
2.10.1.1 Remedación fisicoquímica	38
2.10.1.2 Remedación biológica.....	41
3 Hipótesis	46
4 Objetivos	46
4.1 Objetivo general	46
4.2 Objetivos específicos.....	46
5 Metodología	47
5.1 Objetivo específico I.....	47
5.1.1 Estrategia de tamizado.....	47
5.1.1.1 Análisis granulométrico.....	47
5.1.1.2 Caracterización de parámetros del suelo.....	48
5.1.1.2.1 Medición de pH.....	48
5.1.1.2.2 Contenido de metales pesados totales	50
5.1.1.3 Caracterización microbiológica del suelo	50

5.1.1.3.1 Aislamiento de bacterias	50
5.1.1.3.2 Morfología de colonias.....	51
5.1.1.3.3 Identificación bacteriana.....	51
5.1.1.3.4 Aislamiento de hongos	53
5.1.1.4 Extracción química secuencial de fases	53
5.2 Objetivo específico II.....	54
5.2.1 Extracción de metales pesados	54
5.2.1.1 Extracción con agua destilada y agua potable	54
5.2.1.2 Extracción con ChemSol A.....	54
5.2.1.3 Reducción volumen de ChemSol A con metales en rotoevaporador	54
5.2.1.4 Extracción con ChemSol C.....	55
5.2.1.5 Extracción con ChemSol S	55
5.2.1.6 Recuperación ChemSol S.....	56
5.2.1.7 Extracción con quitosano.....	56
5.2.1.8 Extracción con zeolita.....	57
5.2.1.8.1 Activación zeolita por NH ₄ Cl y HCl	57
5.2.1.8.2 Activación de zeolita por Surfactante.....	58
5.2.1.8.3 Extracción con zeolita natural y activada de ChemSol A	58
5.2.1.8.4 Recuperación de zeolita.....	59
5.2.2 Curvas de equilibrio por saturación	60
5.3 Objetivo específico III.....	60
5.3.1 Fitorremediación.....	60
5.4 Objetivo específico IV	62
5.4.1 Proceso secuencial de remediación	62
5.4.2 Validación a escala de laboratorio	63
6 Resultados	64
6.1 Objetivo específico I.....	64
6.1.1 Estrategia de tamizado.....	64
6.1.1.1 Análisis granulométrico.....	64
6.1.1.2 Caracterización de parámetros del suelo.....	66
6.1.1.2.1 Medición de pH	66
6.1.1.2.2 Contenido de metales pesados totales	67

6.1.1.3 Caracterización microbiológica del suelo	68
6.1.1.3.1 Aislamiento de bacterias	68
6.1.1.3.2 Morfología de colonias.....	68
6.1.1.3.3 Identificación bacteriana.....	72
6.1.1.3.4 Aislamiento de Hongos.....	73
6.1.1.4 Extracción química secuencial de fases	73
6.2 Objetivo específico II.....	74
6.2.1 Extracción de metales pesados	74
6.2.1.1 Extracción con agua destilada y agua potable	75
6.2.1.2 Extracción con ChemSol A.....	75
6.2.1.3 Extracción con ChemSol C.....	75
6.2.1.4 Extracción con ChemSol S	75
6.2.1.5 Recuperación ChemSol S.....	77
6.2.1.6 Reducción volumen de ChemSol A	77
6.2.1.6 Extracción con quitosano.....	78
6.2.1.7 Extracción con zeolita.....	80
6.2.1.7.1 Extracción con zeolita natural y activada.....	80
6.2.1.7.4 Recuperación de zeolita.....	81
6.2.2 Curvas de equilibrio por saturación	81
6.3 Objetivo específico III.....	82
6.3.1 Fitorremediación.....	82
6.4 Objetivo específico IV	91
6.4.1 Proceso secuencial de remediación	91
6.4.2 Validación a escala de laboratorio	91
7 Discusión	94
8 Conclusión	101
9 Referencias	102

Índice de figuras

Figura 1. Relación suelo, agua y aire	14
Figura 2. Partícula de suelo típica	17
Figura 3. Fuentes de contaminación de suelos	21
Figura 4. Minería, A. Terreno de explotación minera; B. Voladura de roca para posterior extracción de minerales.....	22
Figura 5. Polvos de fundición.....	23
Figura 6. Procesos para el análisis de riesgos ambientales	32
Figura 7. Clasificación de técnicas de remediación	36
Figura 8. Geotech Sand Shaker y ejemplo de fracciones de tamizado	48
Figura 9. Extracción química secuencial de fases	53
Figura 10. Proceso de lavado común para cada agente químico	56
Figura 11. Extracción de metales con zeolita	59
Figura 12. Recuperación de zeolita	59
Figura 13. Representación proceso de fitorremediación	61
Figura 14. Proceso de fitoextracción de metales a nivel de planta	62
Figura 15. Composición granulométrica del suelo contaminado.....	64
Figura 16. Contenido de metales pesados por fracción granulométrica	65
Figura 17. Caracterización morfológica de microorganismos aislados	70
Figura 18. Caracterización morfológica de microorganismos aislados	71
Figura 19. Gel de agarosa 1%. Amplificación gen ribosomal 16 S de bacterias aisladas desde suelo contaminado.....	72
Figura 20. Representación colorimétrica de cada extracción	74
Figura 21. Extracción de metales con soluciones orgánicas	76
Figura 22. Precipitación ChemSol S	77
Figura 23. Preparación perlas de quitosano.	78
Figura 24. ChemSol A a diferentes pH con quitosano	79
Figura 25. Representación gráfica de recuperación de ChemSol A versus un control sin tratar	80
Figura 26. Bacterias productoras de sideróforos	83
Figura 27. Proceso de fitorremediación armado	84

Figura 28. Crecimiento de <i>Acacia caven</i> al cabo de 72 días.	85
Figura 29. Representación de la toma de muestras de <i>Acacia caven</i> por cada ensayo.	86
Figura 30. Proceso de digestión con ácido nítrico al 63%.	86
Figura 31. Acumulación de arsénico por un proceso de fitorremediación utilizando <i>Acacia caven</i>	88
Figura 32. Acumulación de cobre por un proceso de fitorremediación utilizando <i>Acacia caven</i>	89
Figura 33. Acumulación de plomo por un proceso de fitorremediación utilizando <i>Acacia caven</i>	90
Figura 34. Esquema secuencial de remediación	91

Índice de tablas

Tabla 1a. Toxicidad de algunos metales y compuestos de metales de importancia	26
Tabla 2. Factores del suelo que afectan a la disponibilidad de metales pesados	28
Tabla 3. Límites máximos de concentración (mg/kg) de metales pesados en suelos establecidos en distintos países.	33
Tabla 4. Tecnologías de remediación de suelos contaminados con metales pesados .	35
Tabla 5. Compuestos orgánicos e inorgánicos utilizados en remediación de suelos contaminados con metales pesados.	37
Tabla 6. Algunas plantas hiperacumuladoras y acumuladoras de metales pesados	44
Tabla 7. Métodos de medición de concentración de metales pesados totales en suelo	48
Tabla 8. Concentraciones iniciales en cultivos selectivos	51
Tabla 9. Caracterización fisicoquímica del suelo	66
Tabla 10. Mediciones de pH del suelo	67
Tabla 11. Concentraciones de metales al inicio y final del proceso de aislamiento de microorganismos	68
Tabla 12. Microorganismos identificados desde suelos contaminados con metales pesados.....	73

Tabla 13. Concentraciones de metal en ChemSol A antes y después de la reducción del volumen y concentraciones en agua.	78
Tabla 14. Representación cumplimiento de Valores Objetivo de Remediación (VOR) .	82
Tabla 15. Contenido metales pesados totales posterior a remediación fisicoquímica ..	92
Tabla 16. Concentración de metales pesados. Valores obtenidos para antes y después del proceso de remediación, comparados con normas extranjeras y suelos aledaños.	93

Índice de gráficos

Gráfico 1. Contenido de metales pesados en suelo sin tratar	67
Gráfico 2. Extracción química secuencial de fases. Representación de disponibilidad de metales pesados en suelo	74
Gráfico 3. Recuperación de ChemSol A con perlas de quitosano	79
Gráfico 4. Recuperación de ChemSol A con zeolita natural y modificada	80
Gráfico 5. Curvas de equilibrio por saturación con ChemSol A para cada metal.	81
Gráfico 6. Curvas de equilibrio por saturación con ChemSol S para cada metal.	82

1. Resumen

La remediación de metales pesados utilizando métodos fisicoquímicos y biológicos de suelos mineros contaminados con polvos de fundición en la Región de Antofagasta, es una investigación cuyo fin fue generar una metodología efectiva y nueva para la eliminación de este tipo de contaminante. Se tomaron muestras de suelo de hasta 2 metros de profundidad, estas se caracterizaron y luego fueron separadas granulométricamente para obtener las fracciones más finas, esto bajo la hipótesis de que las partículas de menor tamaño, al poseer mayor área de superficie de contacto pueden contener una mayor concentración de contaminantes, las cuales también se caracterizaron (arena fina y limo), estas fueron pasadas por un proceso de lavado de suelos utilizando ChemSol A y ChemSol S, de manera secuencial, los cuales fueron evaluados previamente de forma independiente, posteriormente las fracciones gruesas descartadas fueron mezcladas con las finas tratadas, para así generar un suelo reconstituido, el cual fue caracterizado obteniendo porcentajes de remediación del suelo de 73% para As, 68% para Cu y 78% para Pb.

Se realizó la evaluación de un proceso de fitorremediación, para monitorear el comportamiento de una planta arbórea con capacidad acumuladora de metales denominada *Acacia caven* en contacto con el suelo contaminado, a raíz de ello se obtuvieron resultados con proyección de escalamiento ya que las plantas fueron capaces de acumular por sobre 6000 ppm de Cu en su raíz, siendo esta condición precursora de la muerte de ellas, también presentaron acumulaciones de 131 ppm de Pb y 49 ppm de As. Adicionalmente, se establecieron metodologías de recuperación de las soluciones de lavado primero de ChemSol S, logrando un 94% de reutilización del sustrato y segundo, respecto al volumen de ChemSol A conteniendo metales extraídos, fue reducido en un 82% con el fin de evaluar su disposición final.

Con este trabajo se logró la validación auspiciosa de una metodología de remediación de suelos, sentándose las bases para el desarrollo futuro de una planta móvil para pilotajes de remediación en terrenos de la industria minera.

1.1 Abstract

The remediation of heavy metals using physicochemical and biological methods of mineral soils contaminated with casting powders in the Antofagasta Region, is an investigation whose purpose was to generate a new and effective methodology for the elimination of this type of pollutant. Up to 2 meters of depth soil samples were taken, they were characterized and were then separated granularly to obtain finer fractions, under the hypothesis of that the particles of smaller size, having more surface area of contact may contain a higher concentration of pollutants, which were also characterized (fine sand and silt), these were passed through a process of washing of floors using ChemSol A and ChemSol S, which were evaluated sequentially, previously in independent way, subsequently discarded coarse fractions were mixed with fines treated, to generate a reconstituted soil, which was characterized by obtaining percentages of remediation for soil of 73% for As, 68% for Cu and 78% for Pb.

The evaluation of a phytoremediation process was done, to monitor the behavior of a tree plant with accumulating capacity of metals known as *Acacia caven* in contact with contaminated soil, as a result of it we obtained data showing escalation projections because the plants were able to accumulate above 6000 ppm of Cu at the roots, this was a precursor condition of death, being also presented accumulations of 131 ppm Pb and 49 ppm of As. Additionally, washing solutions recovery methodologies were established first for ChemSol s, achieving 94% of reuse of the substrate, and second, with regard to the volume of ChemSol containing metals extracted, was reduced by 82% in order to assess its final disposition.

With this work we were able to do an auspicious validation of a methodology for soil remediation, laying the groundwork for the future development of a mobile plant for pilings of remediation in areas of the mining industry.

2. Introducción

2.1 Problemas en el ecosistema

La explotación de recursos naturales, así como diversos procesos productivos, junto con aportar al crecimiento económico y social de los países, en algunos casos también generan problemas e impactos ambientales, como la contaminación del aire, suelos y aguas (Irrázabal *et al*, 2011). Actualmente la contaminación medioambiental es un factor que afecta a la salud y que limita la calidad de vida de las personas (Anicet, 2010). Entre las principales actividades o fuentes que presentan potencial de contaminar, se pueden mencionar las industrias extractivas; mineras y petroleras, las actividades industriales, incluyendo el almacenamiento, transporte y distribución de sustancias peligrosas; la actividad petrolera en fase de refinación, así como el almacenamiento, transporte y distribución de combustibles líquidos derivados del petróleo; la actividad agrícola y forestal, y la disposición final de residuos peligrosos (Irrázabal *et al*, 2011).

El mantenimiento y la preservación de los recursos naturales, se han convertido en uno de los retos más importantes del siglo XXI. Esta gestión del medio ambiente, debidamente coordinada y complementada con el desarrollo social, la entendemos y definimos actualmente como sostenibilidad. Este nuevo y complejo concepto económico, social y ecológico entorno a las relaciones entre las sociedades y el medio ambiente se ha ido consolidando progresivamente como una demanda social imperativa (Anicet, 2010).

2.2 Suelo, agua y aire

Los recursos naturales son todos los factores abióticos o bióticos de la naturaleza que el hombre puede utilizar con el fin de satisfacer sus necesidades, dentro de ellos existen compartimentos ambientales que actúan como contenedores y difusores de residuos contaminantes debido a su vulnerabilidad frente a estos y es necesario recalcar su relevancia.

El suelo, el aire y el agua son esenciales para la vida y se encuentran constantemente en estrecha relación (figura 1). El suelo actúa de regulador central de la larga cadena de factores y procesos que tienen lugar en el medio ambiente, contienen

gran cantidad de microorganismos descomponedores de residuos, encargados de procesos de óxido-reducción de compuestos, procesos de nitrificación y desnitrificación, entre otros (Maldonado *et al.*, 2007). Por otra parte, los procesos hidrológicos determinan igualmente la movilización y transporte de materiales, contaminantes o no, de origen natural o antrópico. El aire es el contenedor de oxígeno y gases en la Tierra, y es donde se liberan todos los contaminantes tóxicos gaseosos.

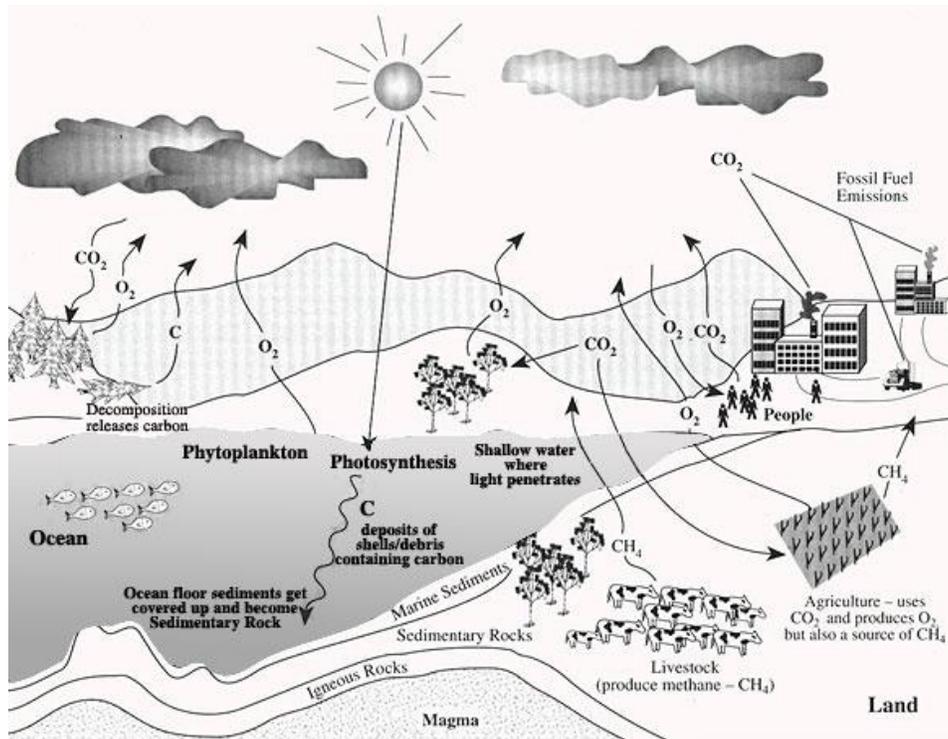


Figura 1. Relación suelo, agua y aire. Fuente: bigelow.org/foodweb/carbon_cycle.jpg

Suelo: es uno de los compartimentos ambientales más vulnerables debido a la alteración de sus propiedades físicas, químicas y biológicas ocasionadas por los contaminantes. Como ejemplo de la alteración de las propiedades físicas está la formación de una capa impermeable que reduce el intercambio de gases y la penetración de agua; de las propiedades químicas, los cambios en las reacciones de óxido-reducción; de las propiedades biológicas, la inhibición de la actividad microbiana (bacterias, hongos, protozoos, etc.), o daños en las plantas y los animales que viven en

o sobre el suelo, e inclusive, en sus consumidores o depredadores (Essien y John, 2010; Izdebska-Mucha y Trzcinski, 2008; Pen-Mouratov *et al.*, 2008).

Aire: es un bien común limitado y un elemento indispensable para la vida, por tanto, su utilización debe estar sujeta a normas que eviten el deterioro de su calidad por abuso o uso indebido del mismo (Acosta, 2007). Su contaminación es causada por diferentes procesos antrópicos y naturales. Entre los contaminantes de mayor interés pueden citarse al material particulado, el dióxido de nitrógeno (NO₂) y el monóxido de carbono (CO), (ICLAM 2004). Asimismo, existe preocupación a nivel mundial con relación a la contaminación por transporte atmosférico de metales pesados a gran escala debido a su capacidad de asociación a masas de aire; por efectos de la recirculación de los vientos, dichos metales tienden a depositarse en áreas alejadas a su fuente de origen (Imperato *et al.*, 2003).

Agua: es un recurso natural escaso, indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente, que, como consecuencia del rápido desarrollo humano y económico y del uso inadecuado que se ha hecho de ella como medio de eliminación, ha sufrido un alarmante deterioro (Barceló, 2008). Numerosos efluentes industriales, plaguicidas y otros productos químicos usados en la agricultura y arrastrados por las lluvias, contribuyen al igual que fuentes de origen natural, a deteriorar la calidad de las aguas.

En base a lo expuesto, la afección que se pudiese producir en cada uno de los recursos naturales provocaría impactos a nivel global, dentro de la vulnerabilidad de cada recurso el suelo puede generar impactos importantes a nivel trófico, englobando microorganismos, animales y plantas, un ejemplo claro es la presencia de metales pesados en niveles tóxicos.

2.3 El suelo

El suelo puede definirse, de acuerdo con el glosario de la Sociedad Americana de la Ciencia del Suelo (1984), como el material mineral no consolidado en la superficie de la tierra, que ha estado expuesto a la influencia de factores ambientales y genéticos (material parental, clima, macro y microorganismos y topografía), estando presentes durante un determinado período. Se considera también como un cuerpo natural involucrado en interacciones dinámicas con la atmósfera y con los estratos que están

debajo de él, que influye en el clima y en el ciclo hidrológico del planeta, y que sirve como medio de crecimiento para diversos organismos (GEO México, 2004). Además, éste juega un papel ambiental de gran importancia, ya que se puede considerar como un reactor bio-físico-químico en donde se descompone material de desecho que es reciclado dentro de él (Hillel, 1998).

Los suelos son enlaces complejos de sólidos, líquidos y gases. Por ejemplo, en un suelo típico de marga de légamo que es ideal para el crecimiento vegetal, el componente sólido en la superficie representa sobre el 50% del volumen (aproximadamente 45% mineral y 5% materia orgánica), los gases (aire) abarcan cerca de 20–30%, y el agua típicamente completa el restante 20–30% (figura 2). Por supuesto, la distribución de gases y del agua en el componente poroso del espacio puede cambiar rápidamente dependiendo de las condiciones atmosféricas y otros factores (GEO México, 2004).

El suelo sufre una degradación acelerada como consecuencia, principalmente, de diversas actividades humanas. Su deterioro se encuentra asociado a la falta de conocimiento sobre el papel ambiental que juega el suelo, así como de los límites para su aprovechamiento en función de sus aptitudes y acerca de las técnicas apropiadas para que pueda ser sustentable. Este desconocimiento se traduce, entre otros aspectos, en la falta de políticas de usos del recurso natural y en prácticas que lejos de contribuir a su protección, aceleran su degradación, sin tomar en cuenta que su pérdida puede ser irreversible.

Esta matriz, como integrante del ecosistema, ocupa una posición clave en los ciclos globales de la materia. En él existe una amplia variedad de cadenas y redes alimenticias, lo cual permite que ocurra un intercambio intenso de materia y energía entre el aire, el agua y las rocas que lo componen.

El suelo es un componente muy específico de la biosfera porque este no es solamente un matriz geoquímico para contaminantes sino también actúa como un amortiguador natural controlando el transporte de elementos químicos y sustancias a la atmósfera, hidrósfera y biota. Sin embargo, el rol más importante de este es su productividad, la cual es básica para la supervivencia humana. Por tanto, el

mantenimiento de la ecología y funciones agrícolas del suelo es nuestra responsabilidad.

La mayoría de los suelos que cubren la tierra están formados por la meteorización de las rocas. Los geólogos emplean el término meteorización de las rocas para describir todos los procesos externos, por medio de los cuales la roca experimenta descomposición química y desintegración física, proceso mediante el cual masas de roca se rompen en fragmentos pequeños.

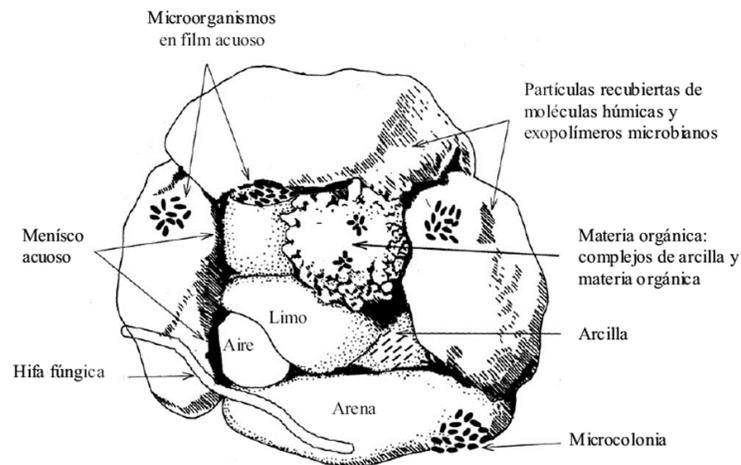


Figura 2. Partícula de suelo típica. Fuente: Dias R., 2011

Suelos residuales se originan cuando los productos de la meteorización de las rocas no son transportados como sedimentos, sino que se acumulan *in situ*. Entre los factores que influyen sobre la velocidad de alteración en la naturaleza de los productos de meteorización está el clima (temperatura y lluvia), el tiempo, la naturaleza de la roca original, la vegetación, el drenaje y la actividad bacteriana. Los suelos residuales suelen ser más abundantes en zonas húmedas, templadas, favorables a ataque químico de las rocas y con suficiente vegetación para evitar que los productos de meteorización sean fácilmente arrastrados.

Suelos sedimentarios se relacionan directamente con la formación, transporte y el depósito de sedimentos. Está constituido por la meteorización química y física de las rocas en la superficie terrestre. En general las partículas de limo, arena y grava se

forman por la meteorización física de las rocas, mientras que las partículas arcillosas proceden de la alteración química de las mismas.

Los sedimentos pueden ser transportados por cualquiera de los cinco siguientes agentes: agua, aire, hielo, gravedad y organismos vivos. El transporte afecta a los sedimentos de dos formas principales: primero modifica la forma, el tamaño y la textura de las partículas por abrasión, desgaste, impacto y disolución; segundo, produce una clasificación o graduación de las partículas (Muelas, 2010).

2.4 Clasificación de suelos

La clasificación de suelos consiste en incluir un suelo en un grupo que presenta un comportamiento semejante. La correlación de unas ciertas propiedades con un grupo de un sistema de clasificación suele ser un proceso empírico puesto a punto a través de muchos años de experiencia.

La mayoría de las clasificaciones de suelos utilizan ensayos muy sencillos, para obtener las características del suelo necesarias para poderlo asignar a un determinado grupo. Las propiedades ingenieriles básicas que suelen emplear las distintas clasificaciones son la distribución granulométrica, los límites de atterberg, el contenido en materia orgánica, entre otros.

Los dos sistemas principales de clasificación de suelos actualmente en uso son el sistema de la American Association of State Highway and Transportation Officials (AASHTO) y el de Unified Soil Classification System (USCS). El primero se usa principalmente para la evaluación cualitativa de la conveniencia de un suelo como material para la construcción de explanadas de carreteras. El USCS (por sus siglas en inglés) fue propuesto inicialmente por Casagrande en 1942 y después revisado por el Bureau of Reclamation de Estados Unidos. Este sistema es el más extendido para la amplia variedad de problemas geotécnicos.

El sistema USCS clasifica los suelos en base a su granulometría, los límites de Atterberg y el contenido en materia orgánica.

En función de la granulometría, los suelos se clasifican en cuatro grandes grupos: gravas, arena, limo y arcillas.

Gravas, con tamaño de grano entre unos 80 mm y 4.75 mm. Los granos son observados directamente, existen grandes huecos entre las partículas y no retienen el agua.

Arenas, con partículas de tamaño entre 4.75 mm y 0.075 mm. Estas son observables a simple vista y se mantienen inalterables en presencia de agua.

Limos, con partículas comprendidas entre 0.075 mm y 0.002 mm. Retienen el agua y si se forma una pasta limo-agua y se coloca sobre la mano, al golpear con la mano se aprecia como el agua se exuda con facilidad.

Arcillas, cuyas partículas tienen tamaños inferiores a 0.002 mm. Son partículas de tamaño gel y están formadas por minerales silicatados, constituidos por cadenas de elementos tetraédricos y octaédricos, unidas por enlaces covalentes débiles y pudiendo entrar las moléculas de agua entre las cadenas, produciendo aumentos de volumen, a veces muy importantes. Por tanto, presentan una gran capacidad de retención de agua, con un porcentaje de huecos muy elevado (huecos pequeños pero con una gran superficie de absorción en las partículas). Debido a que el tamaño de los huecos es muy pequeño (aunque el índice de huecos es elevado), exhiben unos tiempos de expulsión de agua muy elevados y una permeabilidad muy baja.

2.5 Principales actividades de producción y daños al ambiente

En la creciente actividad industrial el modelo actual altera el flujo natural de materiales e introduce nuevos químicos en el medio ambiente (Faisal y Hasnain, 2004), conllevando problemas de contaminación ambiental, y daño en los ecosistemas, generando la acumulación de contaminantes tóxicos, como metales pesados (Pino *et al.*, 2006). Su presencia en aguas residuales de varios procesos como galvanizado, purificación de metales, extracción metalúrgica, generación de residuos químicos por procesos industriales, manufactura de baterías, etc., han causado preocupaciones medioambientales debido a su toxicidad (Kang *et al.*, 2007).

Al hablar de contaminantes siempre surgen una gran y amplia variedad de ellos que según diferentes parámetros llegan a ser considerados como tal, de ese gran grupo existen tres que toman una relevancia muy importante y que desencadenan una cuarta y esto porque se originan a partir de industrias muy potentes económicamente (figura 3).

Industria Minera: los metales pesados a raíz de la industria minera se han convertido en un tema actual tanto en el campo ambiental como en el de salud pública. Los daños que causan son tan severos y en ocasiones tan ausentes de síntomas, que las autoridades ambientales y de salud de todo el mundo ponen mucha atención en minimizar la exposición de la población, en particular de la población infantil, a estos elementos tóxicos.

Industria petrolera: también está presente la contaminación con hidrocarburos en diferentes ecosistemas, la cual se ha incrementado a lo largo de los años debido al aumento en la actividad de exploración y producción de la Industria Petrolera (Ortiz E. et al., 2005). Los derrames de petróleo y sus derivados son considerados de gran impacto al ambiente por los nefastos daños que ocasionan en los ecosistemas impactados. Las investigaciones relacionadas con la biorremediación como alternativa eficiente para la recuperación de los mismos han ido cobrando cada vez mayor importancia (Ortiz E. et al., 2005).

Sector agropecuario: este sector es el principal usuario del agua en la mayor parte del mundo, así como el mayor generador de contaminación difusa (Waisberg et al., 2003). Se estima que un alto porcentaje de la polución de los cuerpos de agua se origina en las actividades agropecuarias; por ejemplo, dos terceras partes del nitrógeno en el agua provienen de este sector: un tercio corresponde a desechos animales y otro tanto a la escorrentía de agroquímicos procedente de los cultivos (Lacroix y Balduchi, 1995). Por ejemplo los plaguicidas son productos químicos muy empleados por el hombre para el control de plagas agrícolas (Ferrer y Cabral 1993; Bolognesi, 2003; Mansour, 2004). Estos contienen con frecuencia compuestos o impurezas que han sido restringidos por su peligrosidad pues constituyen una amenaza para la salud humana y para el ambiente (OMS, 1990).

A partir de estos tres sectores industriales, se genera una cuarta fuente contaminante que corresponde a la disposición de residuos y desechos, en procesos de confinamiento, que si no son bien ejecutados desencadenan problemas de gran relevancia e impacto.



Figura 3. Fuentes de contaminación de suelos. Fuente: Irrarázabal et al., 2011

2.6 La minería y su impacto

Tomando en cuenta la información anterior cabe destacar en primera instancia la importancia que posee cada tipo de contaminación generada a niveles industriales, pero hay una industria que por su constante producción y explotación de recursos toma gran relevancia, la cual corresponde a la minería, los residuos que genera la actividad minera son inmensamente más grandes que los productos que genera. En el caso hipotético de una explotación de cobre de un yacimiento con ley 1% de 1 tonelada de roca mineralizada solo se extraerán (con eficiencia del 100%) 10 Kg de cobre como máximo, eso significa que 990 Kg serán residuos (Oyarzún et al., 2011).

En este sentido se hace énfasis en los residuos mineros masivos, que provienen tanto de los procesos asociados a la exploración y explotación (figura 4), así como de los procesos de transformación pirometalúrgicos, hidrometalúrgicos y refinación de sustancias minerales. Cabe señalar que existen aproximadamente 150 faenas activas

de mediana y gran minería y 867 depósitos de relaves en Chile, de los cuales 121 se encuentran en operación (SERNAGEOMIN, 2011).

La minería es la fuente principal de conflictos por contaminación, uso y calidad del agua, acceso a la tierra y beneficios, lo que ha llevado a que, a nivel internacional, haya quienes planteen posiciones de moratoria. El problema es que cada país basa su desarrollo en algún tipo de actividad productiva y, eventualmente, no tiene alternativas (Pulgar, 2009).

La actividad minero-metalúrgica, tiene tres formas principales de interacción con la atmósfera: Primero emisiones de CO_2 como cualquier otra actividad industrial; segundo, emisiones de SO_2 desde las fundiciones de sulfuros; tercero, emisiones de metales y metaloides desde las fundiciones de sulfuros. (Oyarzún *et al.*, 2011).



Figura 4. Minería, A. Terreno de explotación minera; B. Voladura de roca para posterior extracción de minerales. Fuente: <http://cantumarca.pieb.org>; <http://ingenieroenminas.com>

2.7 Polvos de fundición

Durante el procesamiento de los concentrados sulfurosos de cobre para la obtención de cobre catódico, se generan diferentes desechos tales como: gases de combustión con altas concentraciones de dióxido de azufre, polvos del horno instantáneo y polvos de horno eléctrico (figura 5) (Serna, 2010). Con respecto a estos últimos, además de ser partículas muy finas y que como consecuencia provocan problemas serios para su manejo, son químicamente muy complejos pues contienen una gran variedad de elementos, algunos de gran valor económico como el zinc, cobre y bismuto, y otros como el arsénico, plomo y cadmio que lo hacen tóxico y difícil de disponer al medio ambiente por estar en contra de las legislaciones ambientales actuales (Ros, 2013).

Los gases que salen de un horno de fusión, siempre contienen polvo, el que fluctúa entre un 3 y un 15% de la carga alimentada. El polvo consiste principalmente de pequeñas partículas de concentrado y pequeñas gotas de material semifundido que no alcanzaron a asentarse en el interior del horno siendo arrastradas por los gases. Los polvos contienen entre un 25 y 30% de cobre, por esta razón, generalmente son recirculados al horno para recuperar el cobre contenido en ellos (Shulz, 2003).



Figura 5. Polvos de fundición. *Origen: cobre-y-metales.com*

2.8 Metales pesados

Los metales pesados son aquellos elementos químicos que presentan una densidad igual o superior a 5g/cm^3 cuando están en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo los metales alcalinos y alcalinotérreos) (Yacomelo, 2014). Estos se consideran “tóxicos” para la célula. Sin embargo, en realidad cualquier elemento que a priori es benéfico para la célula, en concentraciones excesivas puede llegar a ser tóxico (Navarro-Aviño *et al.*, 2007).

Dentro de los metales pesados se distinguen dos grupos:

Oligoelementos o micronutrientes: son aquellos requeridos en pequeñas cantidades, o cantidades traza, y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital, pero se convierten en tóxicos pasado cierto umbral de concentración. Estos metales son: arsénico, boro, cobalto, cromo, cobre, molibdeno, manganeso, níquel, selenio y cinc (Yagnentkovsky, 2011).

Metales pesados sin función biológica conocida: son aquellos cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos lleva aparejadas disfunciones en el

funcionamiento de sus organismos. Resultan altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos. Ellos son, principalmente: bario, cadmio, mercurio, plomo, antimonio y bismuto. Su persistencia, acumulación progresiva y/o su transferencia a otros supone una amenaza para la salud humana y la de los ecosistemas (Navarro *et al.*, 2007).

La contaminación del suelo por metales pesados está fundamentalmente relacionada con diferentes tipos de actividades humanas (Pagnanelli *et al.*, 2004). Minerales, metales o metaloides, esenciales o tóxicos, están presentes en sedimentos o suelo en varias formas, variando su biodisponibilidad, toxicidad y movilidad (Shiowatana *et al.*, 2001).

La industria minera no es la única fuente de acumulación de metales pesados, adicionalmente destacan: materiales agrícolas y hortícolas, deposición atmosférica, combustión de combustibles fósiles, industrias metalúrgicas, industria microelectrónica, industria química, eliminación de residuos, actividades deportivas, guerras y entrenamientos militares (Alloway, 1995).

Los mecanismos por los que los metales pesados actúan induciendo su toxicidad en los organismos vivos son: desactivación de la actividad enzimática, alteración de la permeabilidad de las membranas por interacción con éstas e inhibiendo sus grupos reactivos, competencia con otras metaloenzimas, alteración de la mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis, reacción con grupos imino, amino, sulfhidrido de las proteínas, actuación como antimetabolitos, formación de quelatos o precipitación con los metabolitos esenciales (Pérez, 2005).

Los efectos de la exposición a cualquier sustancia dependen del tipo de exposición, la concentración de la sustancia y la cantidad del tiempo de la exposición. Los factores adicionales que deben ser considerados son la edad, el género, la dieta, las características familiares, el estilo de vida y la condición de salud.

Los metales pesados tienden a bioacumularse y esto quiere decir que se genera un aumento en la concentración de este producto químico en un organismo biológico en un cierto plazo, comparado a la concentración del producto químico en el ambiente (Schmidt, 2004).

Los metales pesados más peligrosos son el Plomo, Mercurio, Arsénico, Cadmio, Cromo, Zinc y Cobre. Estos metales son muy utilizados en la industria, y también se emplean en ciertos plaguicidas y medicinas.

El efecto de los metales pesados en la vida de los organismos del suelo y en los principales procesos biológicos (degradación de la materia orgánica, fijación de nitrógeno, respiración) es de consideración. Los microorganismos son más sensibles al estrés por metales pesados que los animales del suelo o plantas (Giller *et al.*, 1998). La mayor parte del riesgo ecológico se asocia con los metales pesados que están biológicamente disponibles para la absorción (Basta, 2004). Los metales pesados no son degradados en los suelos y muchos son considerados como toxinas bioacumulativas persistentes. El riesgo para la salud humana (tabla 1) y los ecosistemas depende de la solubilidad y biodisponibilidad de metales pesados en el suelo, por ende, la inmovilización química de estos contaminantes reduciría el riesgo ecológico (Basta, 2004).

2.8.1 Biodisponibilidad de metales pesados

En el suelo los metales se asocian con distintas fracciones: i) en solución, como iones de metal libre y complejos metálicos solubles, ii) adsorbida en los sitios de intercambio de los constituyentes inorgánicos del suelo, iii) ligada a la materia orgánica, iv) precipitadas como óxidos, hidróxidos y carbonatos, v) como fracción residual en las estructuras de los minerales silicatados (Rieuwerts *et al.*, 1998; Lassat, 2001; Reichaman, 2002; Basta, 2004).

Para que se produzca extracción de los metales éstos deben estar biodisponibles para ser absorbidos. La biodisponibilidad depende de la solubilidad y movilidad de los metales en la solución suelo (tabla 2). Sólo los metales asociados con las fracciones 1 y 2 están realmente disponibles para que las plantas los extraigan, por ello, la concentración total de los metales en el suelo no refleja necesariamente los niveles de metales biodisponibles. (Elliot y Shields, 1988; Sims y Kline, 1991; Ma y Rao, 1997; Rieuwerts *et al.*, 1998; Lassat, 2001; Silveira *et al.*, 2003).

Tabla 1a. Toxicidad de algunos metales y compuestos de metales de importancia

Metal o Metaloide	Compuesto químico	Riesgos toxicológicos para la salud
Arsénico (As)	Arsénico elemental	Dolor torácico, dolor abdominal, tos, Cefalea, debilidad, vértigo, irritación de la piel, Diarrea, náuseas, vómito, Cáncer.
	Trióxido de Arsénico (As ₂ O ₃)	Tos, cefalea, mareos, debilidad falta de aire, dolor en el pecho, Enrojecimiento de ojos, quemaduras en la piel, dolor, conjuntivitis, Constricción de la garganta, vómitos, dolor abdominal, diarrea, mucha sed, calambres musculares, shock.
	Pentóxido de Arsénico (As ₂ O ₅)	Tos, mareos, cefalea, falta de aire, debilidad, dolor en el pecho, Enrojecimiento de ojos, dolor, conjuntivitis, Constricción de la garganta, dolor abdominal, diarrea, vómitos, mucha sed, calambres musculares, shock.
Cadmio (Cd)	Cadmio elemental	Tos, cefalea, Enrojecimiento y dolor de ojos, Dolor abdominal, diarrea, náuseas, vómitos. Cáncer de próstata y pulmón.
	Óxido de Cadmio (CdO)	Tos, dificultad para respirar (edema pulmonar), falta de aire, Enrojecimiento de piel, Enrojecimiento y dolor de ojos, Cólicos abdominales, diarrea, náuseas, vómitos, cáncer de próstata y pulmón.
	Sulfuro de Cadmio (CdS)	Cáncer de Próstata y Pulmón.
Cobalto (Co)	Cobalto elemental	Tos, dificultad para respirar, falta de aire, asma, Enrojecimiento de piel y ojos, Dolor abdominal, vómitos.
	Óxido de Cobalto (Co ₂ O ₃)	Tos, dificultad para respirar, falta de aire, Enrojecimiento de ojos
Cobre (Cu)	Cobre elemental	Tos, cefalea, falta de aire, dolor de garganta, Enrojecimiento de piel y ojos, dolor de ojos, Dolor abdominal, náuseas, vómitos, Anemia.
	Óxido de Cobre (Cu ₂ O)	Tos, gusto metálico, fiebre por humos metálicos, Enrojecimiento de ojos, Cólicos abdominales, diarrea, náuseas, vómito.
Cromo (Cr)	Cromo elemental	Irritación de ojos y piel, Diarrea, náuseas, desvanecimiento, vómitos
	Dióxido de Cromo (CrO ₂)	Irritación en el revestimiento interno de la nariz, úlceras nasales, secreción nasal, problemas respiratorios tales como asma, tos, dificultad para respirar o sibilancias.

Fuente: elaboración propia

Tabla 1b. Toxicidad de algunos metales y compuestos de metales de importancia

Metal o Metaloide	Compuesto químico	Riesgos toxicológicos para la salud
Mercurio (Hg)	Mercurio elemental	Irritación pulmonar, tos, se puede absorber por la piel, Irritación de ojos, temblores, insomnio, cefalea, debilidad.
	Óxido de Mercurio II (HgO)	Tos, Se puede absorber por la piel, enrojecimiento de piel y ojos, Dolor abdominal, diarrea.
	Metilmercurio ([CH ₃ Hg] ⁺)	Daño pulmonar, náuseas, vómitos, diarrea, aumento de la presión arterial o de la frecuencia cardíaca, sarpullido e irritación de los ojos, daños permanentes en el cerebro, los riñones y fetos en desarrollo.
Molibdeno (Mo)	Molibdeno elemental	Irritación en los ojos, la piel y paredes nasales, fatiga, dolores de cabeza y dolores en las articulaciones.
Plomo (Pb)	Plomo elemental	Cefalea, náuseas, espasmo abdominal, dolor de garganta, debilidad, insomnio, palidez facial, falta de coordinación, cólicos, anemia, encefalopatías, enfermedad renal, hipotensión.
	Óxido de Plomo II (PbO)	Daños al sistema nervioso central, riñones y sangre.
Cinc (Zn)	Cromato de cinc (ZnCrO ₄)	Tos, Enrojecimiento de ojos, Dolor abdominal, diarrea, vómitos.
	Fósforo de cinc (Zn ₃ P ₂)	Tos, diarrea, cefalea, fatiga, náuseas, vómitos Dolor abdominal, tos, diarrea, mareos, cefalea, dificultad para respirar, náuseas, desvanecimiento, vómitos, ataxia, fatiga.
Hierro (Fe)	Hierro elemental	conjuntivitis, coriorretinitis y retinitis (contacto muy prolongado)

Fuente: elaboración propia

Tabla 2. Factores del suelo que afectan a la disponibilidad de metales pesados

Factores	Características
pH y Eh	<ul style="list-style-type: none">*La mayoría de los metales están más disponibles a pH ácido, excepto As, Mo, Se, Cr.*Suelos a pH más básico presentan, en general una mayor adsorción de metales que los de pH más ácido.*El potencial redox (Eh) es responsable de que el metal se encuentre en su estado oxidado o reducido.
Textura y Estructura	<ul style="list-style-type: none">*Suelos ricos en arcilla tienden a adsorber los metales pesados, que quedan retenidos en sus posiciones de cambio.*Los suelos arenosos carecen de la capacidad de fijación, por lo que los metales pasan rápidamente al subsuelo y pueden contaminar los niveles freáticos.*De la estructura depende la entrada e infiltración de metales en el suelo.*Suelos arcillosos tienen una baja infiltración mientras que los arenosos más elevada.
Mineralogía de Arcillas	<ul style="list-style-type: none">*Cada mineral de la arcilla tiene unos determinados valores de superficie específica y carga eléctrica.*Cuanto mayor es la superficie activa de un filosilicato, mayores son sus posibilidades de adsorber metales.
Salinidad	<ul style="list-style-type: none">*El incremento de la salinidad de un suelo puede aumentar la movilización de metales por 2 mecanismos:*Los cationes de las sales (frecuentemente Na y K), pueden reemplazar a metales pesados en los lugares de adsorción.*Los aniones cloruro pueden formar complejos estables con metales pesados tales como Cd, Zn y Hg.
Materia Orgánica	<ul style="list-style-type: none">*Reacciona con los metales formando complejos y quelatos.*Se pueden formar complejos órgano-metálicos, lo que facilita la solubilidad del metal, la disponibilidad y dispersión.
Capacidad de cambio	<ul style="list-style-type: none">*El poder de intercambio catiónico depende del tipo de minerales de arcilla, de la materia orgánica, de la valencia y del radio iónico hidratado del metal.*A mayor tamaño y menor valencia, menos frecuentemente quedan retenidos.
Óxidos e hidróxidos de Fe, Al y Mn	<ul style="list-style-type: none">*Tienen una alta capacidad de fijar e inmovilizar a los metales pesados.*Se encuentran finamente diseminados en la masa de suelo por lo que son muy activos.*Poseen una alta capacidad sorcitiva.
Carbonatos	<ul style="list-style-type: none">*Garantiza el mantenimiento de los altos valores de pH, en los que tienden a precipitar los metales pesados.*Los metales pueden ser adsorbidos por los carbonatos.

Fuente: *Elaboración propia*

2.9 Normativas

2.9.1 Criterios de protección de calidad de suelos en relación a metales pesados

La relevancia de la protección de suelos es reconocida mundialmente, lo cual se vio reflejado en la Cumbre de Río en 1992, en la cual los 172 países participantes firmaron por declaraciones que consideraron la protección de los suelos como algo relevante

La Unión Europea (UE), estableció como objetivo proteger los suelos contra la erosión y la contaminación en 2001, en aquella ocasión se señaló que la erosión y disminución de la fertilidad del suelo afectan la calidad de los suelos. En 2005 la UE considera como factores que influyen en la protección del suelo a: erosión, pérdida de materia orgánica, contaminación local y difusa, sellado del suelo, compactación del suelo, reducción de la biodiversidad del suelo, salinización, inundaciones y deslizamientos de tierra (Acevedo *et al.*, 2005, SAG).

El concepto de “calidad de suelo” se adoptó en los años 90’ en Estados Unidos, cuando el Comité de la Comisión de Reglamentación Nuclear (NRC), realizó un informe de conservación de suelo y agua titulado “Calidad de suelo y Agua: Una agenda para la agricultura”, además estableció cuatro estrategias para prevenir la degradación del suelo y la contaminación de las aguas, donde la “Política Nacional” busca : 1) conservar y mejorar la calidad del suelo como primer paso fundamental para mejorar el medioambiente; 2) un uso eficiente de pesticidas, del riego y del incremento de la nutrición en los sistemas agrícolas; 3) incrementar la resistencia de los sistemas agrícolas a la erosión y escorrentía; y 4) hacer un mejor uso de los campos y de las zonas de protección del paisaje (Letey *et al.*, 2003).

En general la comunidad científica internacional y las autoridades a nivel mundial han reconocido la importancia del suelo como un recurso natural esencial y han planteado la necesidad de establecer indicadores de calidad del suelo para conservar o mejorar la productividad de la tierra protegiendo al mismo tiempo la calidad ambiental, la salud humana y animal y la calidad de los alimentos.

La contaminación, es un aspecto dentro de la calidad de suelo que cada vez toma mayor importancia a nivel mundial, por lo cual se ha debido normar al respecto (tabla 3). La primera lista disponible de estándares para estimar el grado de

contaminación del suelo fue la lista de Holanda, la cual fue publicada bajo la Ley Holandesa Provisional para el Saneamiento de Suelos (Brion y Rosso, 1998).

El Gobierno de España acordó el Real Decreto Supremo 1310/1990, el cual señala el criterio de niveles máximos de metales pesados en suelos (tabla 3), acordado en la necesidad de establecer un marco normativo que permitiera compaginar la producción de los lodos de depuración y su utilización agraria (BOE, 1990), además establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados (Pérez, 2004).

Los estándares de calidad de suelo en Alemania están definidos en la Ley Federal de Protección de Suelos y la Ordenanza de Protección de Suelo (Ordenanza BBoSchG/1999), el objetivo de esta ley es proteger o restaurar las funciones del suelo en una base sustentable (tabla 3). Además para evitar el deterioro del suelo con la aplicación de biosólidos se establecieron los valores máximos de metales pesados en el suelo a través de la ordenanza de aplicación de biosólidos a tierras agrícolas (ordenanza AbfKlär V/1992).

Por otro lado la norma mexicana (NOM-004-SEMARNAT-2002) señala los criterios de niveles de metales pesados en biosólidos para el proceso de disposición de estos, lo cual conlleva sacar todo el suelo contaminado del lugar de origen y confinarlo en sectores con los permisos aprobados o realizarles tratamientos para disminuir su peligrosidad.

La Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (US EPA), establece niveles de metales en suelos, denominado Niveles de Evaluación de Suelos (SSL), esto, para evaluar si es necesario realizar la limpieza forzada del suelo (US EPA, 2002). Los límites de metales pesados en suelos se basan en la concentración total de estos, determinado por un método de digestión ácida de suelos de acuerdo al método estándar 3050B de la US EPA o el método 3051 (US EPA, 1996; US EPA, 2007). Cuando los valores exceden estas concentraciones (tabla 3), los sitios requieren de un estudio para ser recuperados.

Para el caso de Chile por iniciativa de la CONAMA entre los años 1999-2000, se avanzó en una propuesta de ley en el marco de la protección de suelos (tabla 3). La idea era legislar para proteger el suelo de las principales causas de degradación

provenientes de las prácticas silvoagropecuarias inadecuadas, de manera que el suelo mantenga todas las funciones que cumple a nivel ecosistémico (Lagos y Ruíz, 2004).

2.9.2 Análisis de riesgo

En general, se considera al Análisis de Riesgo y a los estándares de calidad ambiental tabulados como modos excluyentes para establecer valores objetivos de remediación (VOR) para sitios contaminados (Hughes, 2006).

En Chile, al igual que en la mayoría de los países en desarrollo, se inició el proceso de regulación de tóxicos. Este proceso requiere un análisis del riesgo asociado al tóxico a regular. En el análisis del riesgo se distinguen las etapas de evaluación y manejo. En la etapa de evaluación se deben caracterizar los riesgos asociados a la exposición al tóxico, que se va a regular, a través de su identificación, cuantificación a partir de la función dosis-respuesta, caracterización de la población expuesta y caracterización a través de indicadores como número de muertes en exceso, tasas de mortalidad, etc. En la etapa de manejo del riesgo se incorporan a estas variables científicas las variables técnicas y económicas orientadas a responder qué metas se quiere lograr y en qué plazos (Sancha *et al*, 1998).

Tradicionalmente, el proceso de análisis de riesgos ambientales incluye los siguientes componentes (ACS, 1998), que se ven también reflejados en la figura 6:

- La evaluación del riesgo para la salud o para los ecosistemas en términos cuantitativos
- El manejo de ese riesgo
- La comunicación de ese riesgo

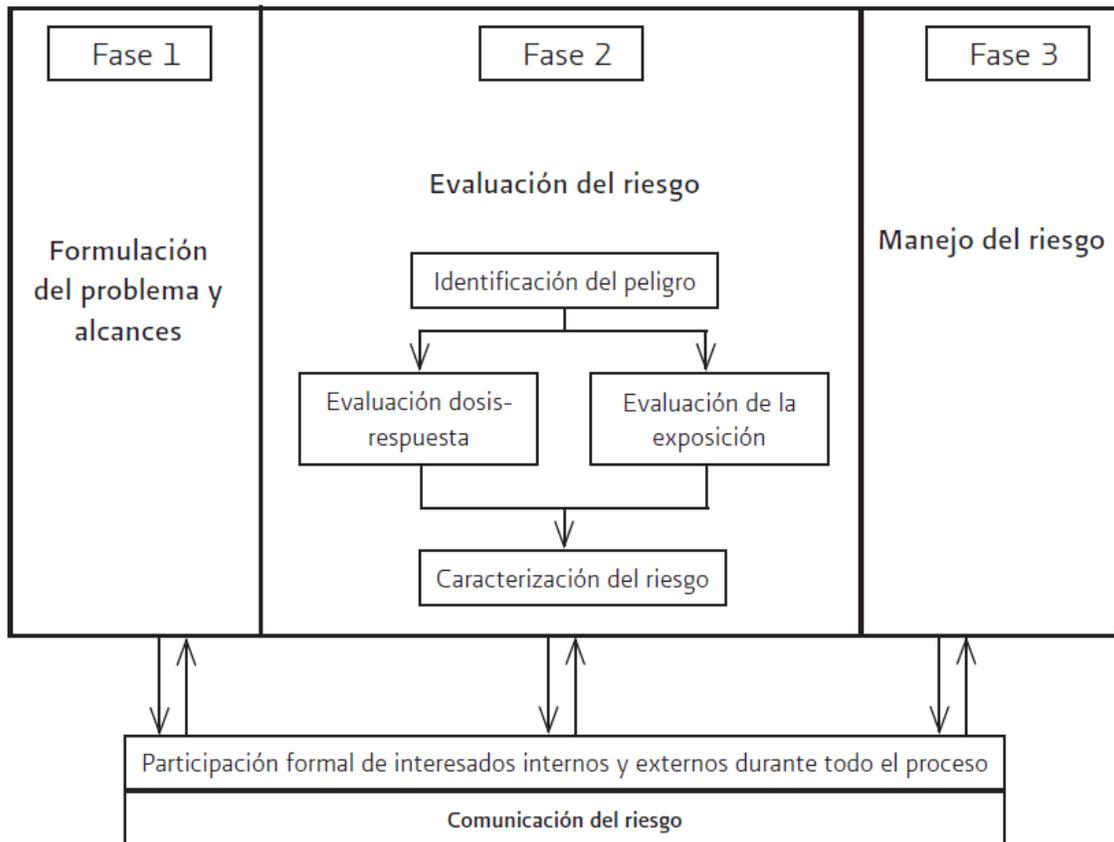


Figura 6. Procesos para el análisis de riesgos ambientales. *Fuente: Ize y Zuk (2003)*

Tabla 3. Límites máximos de concentración (mg/kg) de metales pesados en suelos establecidos en distintos países

País	Ley	Tipo de Suelo	pH	As	Cd	Cu	Cr	Co	Hg	Pb	Mo	Zn	
Alemania	<i>Protección de Suelo BBoShG/1999</i>	Arcilloso		20	1.5	60	100	-	1	100	-	200	
		Limoso		15	1	30	60	-	0.5	70	-	150	
		Arenoso		10	0.4	100	30	-	0.1	40	-	60	
				5.5-7.0	-	1.5 (1)*	60	100	-	1	100	-	100(150)*
	<i>LABO (Valores de referencia para reciclar compost)</i>	Arcilloso			3	0.3	3	20	-	0.03	15	-	15
		Limoso			10	0.3	30	50	-	0.06	50	-	90
		Arenoso		10	1	60	100	-	0.14	75	-	120	
Chile	<i>Norma lodos Nch2952c-2004</i>	Macrozona Norte**	>6.5	20	2	150	-	-	1.5	75	-	175	
		Macrozona Norte**	<6.5	12.5	1.25	100	-	-	1	50	-	120	
		Macrozona Sur**	>5	10	2	75	-	-	1	50	-	175	
UE		**		-	1-3	50-140	100-150	-	1-1.5	50-300	-	150-300	
Francia	<i>Directiva 86/278/EEC</i>	**		-	2	100	150	-	1	100	-	300	
Italia		**		-	1.5	100	-	-	1	200	-	300	
España		**		-	0.4	40	60	-	0.3	40	-	100-150	
España	<i>Real Decreto Supremo 1310/1990</i>		<7	-	1	50	-	-	1	50	-	150	
			>7	-	3	210	-	-	1.5	300	-	450	
Turquía	<i>Ley Ambiental 2878-1983</i>	**	>5	-	3	100	100	-	2	100	-	300	
Australia	<i>Norma Australian Standard AS 4454-1999</i>	**	<5	20	1	100	100	-	1	150	-	200	
US ^a		**		-	20	750	1500	-	8	150	-	1400	
US	<i>EPA (SSL)</i>			0.4	70	-	230	-	23	400	-	2360	
	<i>Regulación 503 EPA</i>	*****		41	39	1500	1200	-	17	300	18	2800	
Canadá		**	>6	14	1.6	100	20	-	0.5	60	-	220	
	<i>Norma NOM-004-SEMARNAT-2002</i>	Biosólidos***		75	85	4300	3000	-	57	840	-	7500	
México	<i>Norma NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004</i>	****		260	450	-	510	-	310	5100	-	-	
Holanda		****		29	0.8	36	100	20	0.3	85	10	140	
		*****		55	12	190	380	240	10	530	200	720	

- No normado; * Valores más bajos para suelos arenosos debido a su vulnerabilidad; ** Suelos agrícolas; *** Norma para disponer lodos y biosólidos; **** uso industrial; *****Valor de referencia; *****Valor de intervención. ***** Lodos residuales aplicados a tierra. ^a McGrath (1994). Fuente: *Elaboración propia*

2.10 Remediación de suelos

A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales no pueden descomponerse por vía biológica, física ni química, de manera que la remediación de sitios contaminados con metales o metaloides se limita a la alteración de su solubilidad, movilidad y/o toxicidad, básicamente a través de cambios en su estado de valencia, favoreciendo su inmovilización (quelación) y/o movilización (disolución). De esta manera, es posible favorecer la remoción o concentración de los metales para su posterior extracción.

Al mismo tiempo, el gran desarrollo científico y tecnológico, particularmente en el ámbito de las ciencias de la vida, que se ha dado desde los años cincuenta del siglo pasado, nos ha permitido aplicar principios científicos y de ingeniería a la transformación de materiales por acción de agentes biológicos (microorganismos, enzimas, células de animales o de plantas, principalmente) con el fin de proveer a nuestra sociedad de bienes y servicios. Actualmente nos referimos al conjunto de estos tipos de actividades humanas con el término biotecnología. (Anicet, 2010).

La gestión de suelos contaminados depende del nivel de riesgo para el ambiente, como para la salud de las personas, por lo que es necesario, en primer término, una adecuada caracterización del sitio, identificando el tipo de contaminante y determinando cuantitativamente su presencia en el ambiente.

Es por ello que para la contaminación por metales pesados a lo largo de muchos años, se han ido desarrollando técnicas, las cuales en el tiempo han sido mejoradas, reestructuradas e inclusive descartadas (tabla 4). Técnicas de aislamiento e inmovilización de contaminantes, reducción de la toxicidad y/o movilidad, separación física y extracción.

Tabla 4. Tecnologías de remediación de suelos contaminados con metales pesados

Objetivo	Técnica de remediación	Fundamentos
Aislamiento	Taponeado	Es el método más simple para evitar el esparcimiento del contaminante.
	Barreras de suelo	
Inmovilización	Solidificación/estabilización	La solidificación involucra la adición de agentes de unión al contaminante para impartir una estabilidad físico/dimensional, para la contención del contaminante y así reducir su acceso por agentes externos a través de una combinación de reacciones químicas, encapsulación y reducir el área de permeabilidad/superficie. La estabilización involucra la adición de reactivos para el suelo contaminado para producir más constituyentes químicos estables.
	Vitrificación	La movilidad de contaminantes metálicos puede ser disminuida por tratamientos con altas temperaturas del área contaminada, que resulta en la formación de material vidrioso, usualmente un óxido sólido.
	Tratamiento químico	
Reducción de la toxicidad y/o movilidad	Tratamiento químico.	Involucra reacciones de óxido-reducción que convierten químicamente compuestos tóxicos o peligrosos a compuestos menos tóxicos o no peligrosos que son más estables, menos móviles o inertes.
	Paredes de Tratamiento permeables	
	Tratamiento Biológico, bioacumulación, fitorremediación (Fitoextracción, fitoestabilización y rizofiltración), Biolixiviación y Procesos bioquímicos	La fitorremediación, también llamada remediación verde, puede ser definida como una estrategia remediación <i>in situ</i> que utiliza vegetación y microbiota asociada a ella, enmienda de suelos y técnicas de remoción agronómicas, contención o devuelve a contaminantes medioambientales inocuos.
Separación física		Busca concentrar los contaminantes sólidos por medios físicos y químicos. Las partículas finas de arcillas y sedimentos pueden separarse de arenas y gravas gruesas para concentrar los contaminantes en volúmenes menores de suelo.
Extracción	Lavado de suelos, extracción pirometalúrgica, enjuague de suelos <i>in situ</i> y tratamiento electrocinético.	El lavado de suelos es una tecnología de tratamiento de reducción del volumen de residuos basado en procesos físicos y/o químicos. Se basa principalmente en el traspaso de los contaminantes desde el suelo hacia la solución.

Fuente: elaboración propia

Existe una gran variedad de tecnologías de remediación, las cuales se pueden clasificar bajo distintos criterios (figura 7): objetivo de la remediación, lugar en que se aplica el proceso de remediación y tipo de tratamiento utilizado. Además de los criterios anteriores, también pueden clasificarse en base al grado de desarrollo técnico en el que se encuentran.

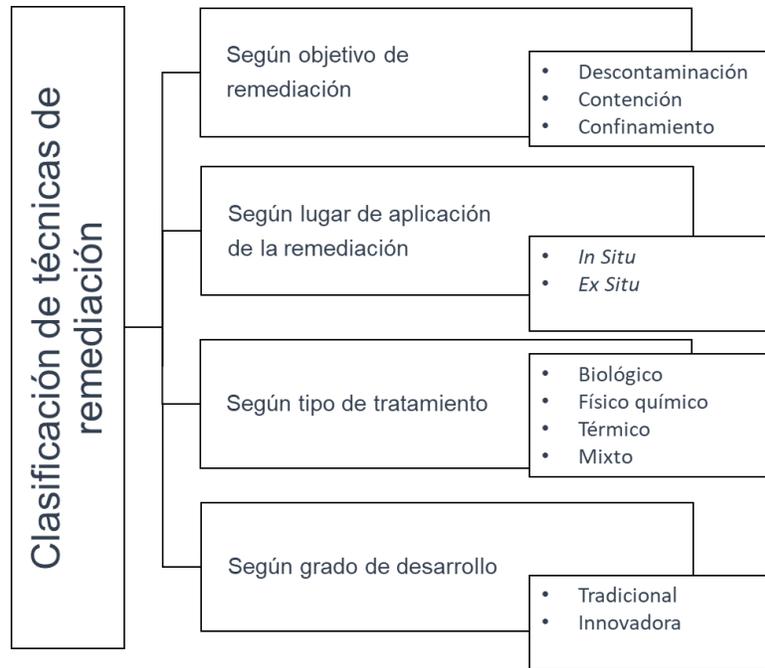


Figura 7. Clasificación de técnicas de remediación. *Fuente: Alcaíno, 2012*

La diversificación de las técnicas de remediación ha dado pie para la utilización y prueba de una cantidad importante de compuestos orgánicos e inorgánicos (tabla 5), de origen natural y/o sintético, con el fin de estandarizar métodos y encontrar las mejores opciones para recuperar suelos contaminados con metales pesados.

Tabla 5. Compuestos orgánicos e inorgánicos utilizados en remediación de suelos contaminados con metales pesados

Compuesto orgánico o Inorgánico	Uso	Metales
Xilógeno	Enmienda orgánica para inmovilización de metales	Zn, Pb, Hg
Quitosano	Enmienda orgánica para inmovilización de metales	Cd, Cr, Hg
Sales de fosfato	Enmiendas inorgánicas para inmovilización de metales	Pb, Zn, Cu, Cd
Ca-Montmorillonita	Enmiendas inorgánicas para inmovilización de metales	Zn, Pb
Bentonita	Enmiendas inorgánicas para inmovilización de metales	Pb
Cal	Enmiendas inorgánicas para inmovilización de metales	Cd, Cu, Ni, Pb, Zn
Ácido cítrico	Extracción química	Cr, Cu, Ni, Zn, Pb
Hidróxido de sodio	Precipitación de metales en soluciones ácidas	Cu, Zn, Pb
EDTA	Extracción por actividad quelante	Cd, Zn, Cu, Pb, Mn, Ca, Ni
Ácido nítrico	Extracción ácida de metales	Zn, Cu, Cd, Pb
Ácido acético	Extracción ácida de metales	Zn, Co
Zeolitas naturales	Extracción de metales por Intercambio iónico	Ni, Cu, Co, Fe, Cr
Alginato de calcio	Absorción de metales pesados, aplicable a amplios rangos de pH.	Pb, Hg
Biomasa de levadura	Adsorción de metales	Cd, Pb
Ácido sulfúrico	Extracción ácida de metales	Cu, Ni, As

Fuente: Elaboración propia

2.10.1 Tecnologías en remediación de suelos en la actualidad

2.10.1.1 Remediación fisicoquímica

En el suelo se generan procesos fisicoquímicos naturales que son el fundamento principal de las técnicas de remediación de suelos desarrolladas a lo largo del tiempo.

Uno de los procesos que ocurren naturalmente en el suelo es el intercambio catiónico, los coloides que lo componen presentan cargas negativas en la superficie de sus constituyentes (Evans, 1989). De acuerdo con el principio de electroneutralidad, las cargas negativas en la superficie de los coloides son neutralizadas por una cantidad equivalente de cationes en la solución suelo, los que pueden quedar adsorbidos (Alloway, 1995; Silva, 2004). Esta adsorción de cationes por el suelo es denominada “adsorción no específica”, que se caracteriza porque el ion es atraído electrostáticamente por las superficies cargadas de la fracción coloidal del suelo, sin que haya una dependencia de configuración electrónica con el grupo funcional de la superficie del suelo, formando complejos llamados de esfera externa (Sposito, 1989).

Por otro lado está la adsorción específica, el cual es un fenómeno de alta afinidad, involucrando mecanismos de intercambio entre el metal y el ligando de la superficie de los coloides por medio de enlaces covalentes o iónicos, prevaleciendo los enlaces covalentes. Este término ha sido utilizado para explicar la razón por la cual algunos suelos adsorben determinados cationes en concentraciones superiores a su capacidad de intercambio catiónico (Alloway, 1995; Phillips, 1999). Los metales pesados que se encuentran como aniones, As, Se, Mo, también pueden presentar adsorción específica en las superficies de los óxidos e hidróxidos hidratados.

También en el suelo ocurre el fenómeno de precipitación el cual depende del producto de solubilidad (K_{ps}) del sólido en agua. Los iones metálicos en la solución suelo pueden precipitar con un agente químico, generalmente aniones como fosfatos, carbonatos o sulfatos (Rieuwerts *et al.*, 1998). También pueden precipitar como hidróxidos al reaccionar con los iones de la solución (Basta y Tabatabai, 1992). La precipitación/disolución son procesos que, además se ven influenciados por el pH y el potencial redox del suelo (Rieuwerts *et al.*, 1998; Basta 2004).

Finalmente se encuentra la complejación de metales la cual involucra a un ión metálico en solución que está siendo rodeado por uno o más ligandos orgánicos o

inorgánicos (Rieuwerts *et al.*, 1998). La quelación ocurre cuando un ligando polidentado, generalmente una molécula orgánica grande, ocupa dos o más sitios de coordinación alrededor de un ión metálico central (Bohn *et al.*, 1979). Dentro de los ligandos complejantes orgánicos se encuentran los ácidos cítrico, oxálico y gálico, además de ácidos complejantes más estructurados, como aquellos incluidos en las fracciones húmica y fúlvica solubles (Evans, 1989). Los hidróxidos y el ión cloruro son considerados como los ligandos inorgánicos más importantes (García-Miragaya y Page, 1976; Sposito, 1989).

Muchos autores en base a estas propiedades físico-químicas del suelo, han analizado potenciales opciones para poder extraer metales con concentraciones elevadas en suelos, fue así como en el año 2002 Marchioretto *et al.*, realizó pruebas de extracción química de metales pesados desde lodos residuales utilizando ácido nítrico, clorhídrico y cítrico. Una proporción de 7g de lodo activado con 2.6 ppm de Cd, 150 ppm de Pb, entre otros, el cual se mezcló con 150 mL de agua destilada ajustada a distintos pH con cada ácido, todo de forma independiente y analizada por periodos de tiempo. Los rendimientos de extracción más relevantes se obtuvieron con ácido nítrico y clorhídrico extrayendo un 100% de plomo (Pb) con ambos en poco más de 2 horas de agitación, para el caso del ácido cítrico se obtuvo un rendimiento relevante en la extracción de cadmio (Cd), con un 60% de extracción en 1 día de agitación.

Por otro lado Dacera y Babel en 2006, utilizaron ácido cítrico como lixiviante de metales, para ello tomaron 7 g de suelo que contenían 4129 ppm de Cu, 106 ppm de Pb, 127 ppm de Ni, 1933 ppm de Zn, al cual le agregaron 140 mL de agua desionizada con variaciones de pH (2.33, 3.04 y 3.9), estas variaciones de pH se generaron con la adición de ácido cítrico. Los rendimientos obtenidos en los ensayos fueron mucho más relevantes para pH 2.33 y pH 3.04. Por ejemplo se obtuvo un 88% de extracción de cobre después de 1 día de agitación con solución a pH 2.33 y 100% de extracción de Zinc después de 2 horas de contacto. Para el caso de la solución a pH 3.04, esta fue capaz de extraer el 100% del plomo en 1 día de contacto y el 70% de níquel en 2 horas.

Gaber *et al.*, 2011, realizó ensayos de extracción de metales pesados comparando ácidos orgánicos versus inorgánicos. Para ello tomaron 7g de suelo

tamizado que contenía 802 ppm de Cu, 385 ppm de Ni, 215 ppm de Pb, 1026 ppm de Zn, y se le agregaron 150 mL de solución ácida ajustada entre pH 1 a 5 dependiendo del ácido. Los porcentajes de extracción más importantes fueron los siguientes: con ácido cítrico a pH 2.43 extracción de 86% de Cu y 88% de Zn en un día de contacto, para el caso de la solución a pH 3 se extrajo el 68% de Ni en 4 horas y 66% de Pb en 1 día de contacto; por otro lado para la utilización de ácido nítrico y clorhídrico se obtuvieron extracciones de 82% de Cu, 71% de Ni, 94% de Pb y 89% de Zn todos en 1 hora de contacto.

Por otra parte Wuana *et al.*, en 2010, utilizaron ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0,05M, junto a otros agentes quelantes para analizar la extracción de cobre (Cu), níquel (Ni), cadmio (Cd), zinc (Zn) y plomo (Pb). Para ello tomaron 1 g de suelo por cada 25 mL de extractante, agitándose a 250 rpm durante 6 horas. El contenido de metales pesados era el siguiente: 498 ppm de Cu, 437 ppm de Ni, 340 ppm de Cd, 376 ppm de Zn y 292 ppm de Pb. Los rendimientos arrojaron superioridad de poder extractante para el EDTA obteniendo rendimientos de 63% para Ni, 70% para Cu, 59% para Zn, 56% para Cd y 50% para Pb. En contraste Jiang *et al.*, en 2011 realizó algo similar pero utilizando el doble de suelo con una solución de 0.2 g/L de EDTA equivalente a 0.007M, analizando la extracción de cobre y níquel. Jiang obtuvo rendimientos del 50% app. de extracción para níquel a las 2 horas y del 27% app. para cobre, al cabo de 2 horas.

En 2011, Sun *et al.*, realizaron pruebas de extracción de metales desde suelos contaminados artificialmente pero utilizando surfactantes (SDS, CTAB y Tween 80). Ellos analizaron la extracción de cobre, zinc, plomo, cadmio y níquel, para ello propusieron distintas proporciones de solución de surfactante y mantuvieron constante la cantidad de suelo a remediar (5g), ellos tuvieron en agitación constante las soluciones durante 24 horas a 200 rpm. Las concentraciones de metales pesados añadidas al suelo fueron de 400 ppm de Cu, 500 ppm de Zn, 500 ppm de Pb, 200 ppm de Ni y 1 ppm de Cd. En sus resultados indican que no hubo diferencia al variar el volumen de la solución, y los mejores rendimientos de extracción para cada metal se obtuvieron con SDS y fueron de aproximadamente un 80% para cobre, 75% para cadmio, 55% para zinc, 52% para níquel y 50% para plomo.

En 2002 Dambies *et al.*, analizaron el tratamiento de soluciones contenedoras de arsénico (As (III) y As (V)) (5, 10 y 20 mg/L) con la utilización de perlas de quitosano en gel modificadas por molibdato. Determinaron la influencia del pH en la sorción del metal, siendo para As (V), mucho mejor a pH ácido (2-3).

En 2010 Montero *et al.*, también probaron la remoción de Arsénico (As) con perlas de quitosano a distintos pH. La solución de arsénico estaba a una concentración de 0.128 mg/L, luego del experimento los autores obtuvieron como resultado un 87.6 % de remoción a pH neutro.

Motsi *et al.*, en 2009 y 2010, utilizaron zeolita natural para la extracción de fierro II, cobre II, zinc II y manganeso II, obteniendo rendimientos de 5.77, 6.51, 6.56 y 2.8 mg/g respectivamente (mg de metal por g de zeolita), además ellos también realizaron pruebas de regeneración del adsorbente (zeolita), con la utilización de ácido sulfúrico (H₂SO₄) y también proponen el uso de NaCl, NaNO₃ y EDTA. Las concentraciones iniciales de cada metal en solución eran 400 ppm para Fe II, 20 ppm de Cu II, 20 ppm de Mn II y 120 ppm de Zn II.

2.10.1.2 Remediación biológica

Como ya se mencionaron algunos tipos de extracción físico-químicos, también cabe resaltar la existencia de métodos de extracción biológicos que igualmente se fundamentan en los conceptos mencionados anteriormente pero, se hacen un tanto más complejos, es así como del concepto de remediación pasamos al término biorremediación.

La biorremediación emplea la utilización de microorganismos con la capacidad de degradar contaminantes tóxicos o tener la habilidad de acumularlos en sus células (Demodaran *et al.*, 2011).

Diferentes mecanismos de biorremediación se conocen, incluyendo biosorción, interacciones metal-microorganismo, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y biolixiviación (Dixit *et al.*, 2015).

Dentro de la capacidad de degradar contaminantes y/o la habilidad de acumularlos se resalta bastante el concepto de bioadsorción o biosorción, el cual es un proceso que permite la captación activa o pasiva de iones metálicos, debido a la propiedad que diversas biomasas vivas o muertas poseen para enlazar y acumular este

tipo de contaminantes por diferentes mecanismos (Tejada-Tobar *et al.*, 2015). Este proceso físico-químico que incluye los fenómenos de adsorción y absorción de moléculas e iones, busca principalmente la remoción de metales pesados en aguas residuales provenientes del sector industrial, usando como sorbente diferentes materiales de origen biológico (vivo o muerto), tales como: algas, hongos, bacterias, cáscaras de frutas, productos agrícolas y algunos tipos de biopolímeros (Tejada-Tobar *et al.*, 2015).

Además se destaca un proceso muy utilizado en minería denominado biolixiviación, el cual corresponde a la solubilización de los constituyentes de un mineral por acción bacteriana. Este tipo de extracción es utilizado comercialmente en la lixiviación de minerales de sulfuros de cobre secundarios, además de ser responsable de la generación de drenaje ácido de mina (Rivera *et al.*, 2011).

Otra forma de remediación con organismos vivos corresponde a la fitoextracción, nombre dado al proceso donde la raíz de la planta capta los contaminantes metálicos desde el suelo y los traslada hacia sus tejidos por sobre el suelo. Una planta usada para fitorremediación necesita ser tolerante a los metales pesados, con un crecimiento rápido y un alto rendimiento de crecimiento de biomasa por hectárea, tienen alta habilidad acumuladora de metales en su parte foliar, tienen un abundante sistema de raíz y un alto factor de bioacumulación (Scragg, 2006; Jadia, 2008). Dos acercamientos han sido propuestos para la fitoextracción de metales, estas son, una fitoextracción natural o continua y fitoextracción potenciada químicamente (Lombi, 2001; Ghosh, 2005). En la tabla 6 se observan una serie de plantas con capacidad hiperacumuladora y acumuladora.

Entre los métodos preferidos para el tratamiento de áreas contaminadas, se prefiere en un 51% las más amigables con el medio ambiente, incluyendo la remediación microbiana (35%) y fitorremediación (16%) (EA, 2009; US EPA, 2007).

En relación al proceso de fitorremediación existe una planta arbórea llamada *Acacia caven*, el cual es un árbol nativo, de tamaño pequeño, de copa semiesférica y que puede alcanzar hasta 6 m de altura. Se desarrolla principalmente en zonas áridas y semiáridas con suelos pobres y degradados (Durán *et al.*, 2013).

Dentro de sus requerimientos ecológicos se caracteriza por ser una especie muy plástica adaptada a periodos de sequía prolongados, con muy escasa precipitación, así como también en terrenos erosionados en que su crecimiento es más lento y no alcanza grandes tamaños.

Con respecto a las condiciones climáticas, se desenvuelven bien en climas mediterráneos, su requerimiento híbrido es de 100 a 1000 milímetros anuales de lluvia (crece muy bien con 365 mm de lluvia), la temperatura media es de 13 a 17 °C, con mínimas absolutas de 7-8 °C y máximas absolutas de 35-36 °C, con una humedad de entre 63 a 100%. (Benedetti S. 2012)

En 2011 un informe creado por el CIMM (Centro de investigación Minera y Metalúrgica) catalogó al Espino como un colonizador espontáneo de depósitos de relaves, en la Región de Coquimbo con tolerancia constitutiva a cobre denominándose una especie metalófito (León-Lobos *et al.*, 2011).

Evaluaciones de laboratorio, permitieron evidenciar que de un total de 41 especies colonizadoras espontáneas de depósitos de relaves, de la IV región, evaluadas en cuanto a su grado de tolerancia a Cobre, un 42% mostró tolerancia y un 12% mostró alta tolerancia a este elemento. Algunas de estas especies mostraron ser tolerantes constitutivas a cobre, o sea, todos los individuos de la especie tienen la capacidad de tolerar altos contenidos de cobre biodisponible. Dentro de una serie de especies con tolerancia constitutiva a cobre se encuentra *Acacia caven* (Espino). Todas las especies metalófitas identificadas acumulan el cobre principalmente en sus raíces, por lo que son metalófitas excluyentes y son un potencial en procesos de fitorremediación (León-Lobos *et al.*, 2011).

Un factor bastante importante en el crecimiento vegetal es la biodisponibilidad de hierro (Fe) como también es un elemento esencial para prácticamente todos los seres vivos en los que es necesario para importantes funciones celulares como síntesis de ADN, respiración y detoxificación de radicales libres.

La disponibilidad de este elemento que se encuentra como Fe³⁺ es fundamental en el éxito o fracaso de microorganismos patógenos o simbióticos para invadir un organismo o para colonizar un ambiente determinado. Para resolver este problema, muchos organismos, que incluyen bacterias, hongos y plantas, producen pequeñas

moléculas, péptidos no ribosomales muchas de ellas, de alta afinidad por el hierro llamadas sideróforos que actúan de manera específica como agentes quelantes para secuestrar hierro en presencia de otros metales y reducirlo a Fe^{2+} , una forma mucho más soluble y aprovechable para su nutrición (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). La producción de sideróforos se ha asociado con diversas bacterias de vida libre, en especial del grupo de las *Pseudomonas* (Zdor y Anderson, 1992).

Los microorganismos del suelo entonces afectan la movilidad de los metales y la disponibilidad para la planta, debido a la acidificación, y cambios del potencial redox o mediante la producción de sideróforos quelantes de hierro que garantizan la disponibilidad de hierro, y/o la movilización de los metales (Sarabia *et al.*, 2010).

Tabla 6. Algunas plantas hiperacumuladoras y acumuladoras de metales pesados

Planta	Nombre	Metales
Dicotiledóneas	<i>Cystus ladanifer</i>	Cd, Co, Cr, Ni, Zn
	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Cd, Zn
	<i>Arabidopsis halleri</i>	Cd
	<i>Alyssum sp.</i>	Ni
	<i>Brassica junica</i>	Pb, Zn
	<i>Betula</i>	Zn
Hierbas	<i>Vetiveria zizaniodes</i>	Zn
	<i>Paspalum notatum</i>	Zn
	<i>Stenotaphrum secundatum</i>	Zn
	<i>Pennisetum glaucum</i>	Zn
Plantas Arbóreas	<i>Acacia caven</i>	Cu
	<i>Acacia saligna</i>	Cu

Fuente: Scragg, 2006

En 2011 Demodaran *et al.*, utilizaron a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, para la remoción de metales pesados (Pb^{+2} y Cd^{+2}) desde suelos contaminados, se encontró que la tolerancia de las levaduras era de 250 ppm para Pb^{+2} y 500 ppm para Cd^{+2} . Se investigaron parámetros que afectan la biosorción de metales pesados, dentro los cuales está el tiempo, concentración del metal, y concentración de biomasa. Los resultados obtenidos revelaron una biosorción del 67-82% de Pb^{+2} y 73-79% de Cd^{+2} en 30 días. Las concentraciones iniciales eran de 100 ppm de Pb^{+2} y 300 ppm de Cd^{+2} .

En 2010 Özdemir *et al.*, analizaron la bioacumulación y resistencia de Cu, Cd, Ni, Zn y Mn, por *Geobacillus toebii* y *Geobacillus thermoleovorans*. Se determinó en los ensayos que la máxima capacidad bioacumuladora se obtuvo con *Geobacillus toebii* para Zn (36496 µg/g de peso seco celular), y la mínima capacidad de bioacumulación se obtuvo de la misma cepa bacteriana para Ni (660.3 µg/g de peso seco celular). Los investigadores también notaron que en presencia de una concentración conocida de Cd (7.32 g/L), células muertas bioacumulaban mayor cantidad de este metal (46.2 mg/g) que células vivas (17.44 mg/g) en su membrana.

En 2013 Shazia *et al.*, estudiaron la bioadsorción de diferentes cepas del hongo *Aspergillus fumigatus* aislados desde suelos agrícolas contaminados con metales pesados. Con ellos se evaluó la biosorción de Cr, Cd, Pb, Ni, Cu y Zn a pH 5 constante. Los más altos rendimientos se obtuvieron para plomo (76.07%), Cu (69.6%) y Cr (40%), desde soluciones stock de 800 ppm de cada metal.

Pellón *et al.*, en 2008 evaluó la eliminación de cromo y cadmio desde aguas residuales mediante el uso de un biorreactor utilizando la microalga *Scenedesmus obliquus*, en el cual la eficiencia de remoción de Cr fue del 92.4% y 95% para Cd, esto a partir de una concentración inicial de 363 y 21.4 ppm respectivamente. En 2014, Kumar *et al.*, analizaron la capacidad de acumulación de cobre por las microalgas *Scenedesmus obliquus* y *Synechocystis sp.* PCC 6803, observando que la máxima acumulación se obtenía a pH entre 5-7. Los resultados indicaron que luego de una hora de incubación en líquido, *S. obliquus* acumula sobre los 124 µg de Cu por gramo de peso seco de la microalga, en cambio *Synechocystis sp.* PCC 6803, en 2 horas de incubación acumuló 64.9 µg de Cu por gramo de peso seco de la microalga.

En 2001 Lombi *et al.*, evaluó la hiperacumulación natural de plantas versus fitoextracción potenciada químicamente. Como hiperacumulador natural se utilizó *Thlaspi caerulescens* versus la utilización de maíz (*Zea mays*) tratado con ácido etilendiaminotetracético (EDTA). Tres cultivos distintos de la planta fueron crecidos en los suelos contaminados durante 391 días, obteniendo una acumulación de más de 8 ppm de Cd y 200 ppm de Zn, correspondiente al 47 y 7% de la concentración total presente en los suelos. Las concentraciones iniciales de metales eran de 19 ppm de Cd y 2920 ppm de Zn.

3 Hipótesis

Un suelo altamente contaminado con metales pesados de la región de Antofagasta, tratado con un proceso secuencial de remediación mixta en laboratorio, es recuperable en 12 meses de intervención.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Desarrollar una metodología para la recuperación de un suelo de Antofagasta contaminado con metales pesados provenientes de polvos de fundición

4.2 Objetivos específicos

- I. Determinar una estrategia de tamizado para el suelo contaminado con el fin de clasificar las distintas fracciones del suelo y el contaminante en ellas.
- II. Establecer un procedimiento de extracción de metales pesados con agentes químicos y comprobación de estrategias de recuperación de soluciones de lavado.
- III. Realizar fitoextracción de metales pesados residuales.
- IV. Validación de una metodología secuencial para la extracción de metales.

5 Metodología

5.1 Objetivo específico I

5.1.1 Estrategia de tamizado

Previamente se tuvo disponible muestras de suelos provenientes de sitios contaminados con polvos de fundición, desde la región de Antofagasta, para ser analizados en laboratorio.

5.1.1.1 Análisis granulométrico

Según Evanko y Dzombak (1997), las partículas finas de suelo (<63 μm) a menudo contienen la mayoría de material contaminante, ya que estos están unidos fuertemente debido a su larga y reactiva área de superficie. Es por ello que se realizó un análisis granulométrico, con el fin de caracterizar el suelo contaminado y poder definir distintas fracciones contaminadas y así clasificarlas para su posterior recuperación.

En Primera instancia se dispuso de 2 kg de suelo para ser tamizado por fracciones, para ello se contó con un tamizador secuencial denominado Geotech Sand Shaker (figura 8), para ello se utilizaron los números de tamiz 4, 10, 40, 200 según US Standard, para separar el suelo en sus fracciones de Grava, Arena gruesa, Arena media, Arena fina y Limo (figura 8). El suelo fue tamizado por tandas de 100 g, sus fracciones se masaron y luego de tamizar las 20 tandas, se promediaron los datos y se obtuvieron los porcentajes de cada fracción en el suelo lo cual entregó el dato de composición granulométrica porcentual. Posteriormente se enviaron 20 g de cada fracción a los laboratorios externos acreditados de ALS Environmental para conocer la distribución de los metales pesados en cada una de ellas, según las metodologías descritas en la tabla 7.



Figura 8. Geotech Sand Shaker y ejemplo de fracciones de tamizado.

Tabla 7. Métodos de medición de concentración de metales pesados totales en suelo

N° Método US EPA	Técnica
3050B	<i>Digestión Ácida</i>
3051	<i>Digestión Ácida</i>
6020A	<i>ICP-MASA (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente)</i>

Fuente: elaboración propia

5.1.1.2 Caracterización de parámetros del suelo

Se envió una muestra de suelo para realizarle mediciones de los siguientes parámetros: Contenido de agua, fósforo total, contenido de materia orgánica total, nitrógeno total, pH medido en agua, contenido de potasio total y conductividad.

5.1.1.2.1 Medición de pH

Para ambos métodos se comenzó con un suelo secado al aire (10 g) que fue tamizado por el tamiz No.10 (2 mm) para retirar las fracciones gruesas del suelo. El secado del suelo al aire fue necesario para poder tamizarlo y controlar la cantidad de agua presente en el momento de la medición.

Método con agua

El agua usada en este método de prueba fue ASTM Tipo III o superior. Este se preparó por ósmosis reversa.

Para la medición del pH se colocó el suelo en un recipiente de vidrio y se añadieron aproximadamente 10 ml de agua, luego se mezclaron completamente y se dejaron reposar por 1 hora. Posteriormente, se introdujo el electrodo de pH dentro de la suspensión parcialmente asentada y se midió el pH (ASTM D 4972-13).

Adicionalmente se le midió el pH a una mezcla de suelo más 100 mL de agua en una relación de 1:10.

Método con cloruro de calcio (CaCl₂)

Se preparó una solución stock de CaCl₂ 1M, para ello se disolvieron 147 g de CaCl₂ *2H₂O en agua, en un frasco volumétrico de 1 litro, y se mantuvo frío.

Para la solución de Cloruro de Calcio 0.01 M se diluyeron 0.5 ml de solución stock y se llevaron a 50 mL con agua destilada. El pH de esta solución debía estar entre 5 y 7.

Para la medición de pH se colocó el suelo en un recipiente de vidrio y se añadieron aproximadamente 10 ml de solución de CaCl₂ y se mezclaron completamente dejándose reposar por 1 hora. Posteriormente, se introdujo el electrodo de pH dentro de la suspensión parcialmente asentada y se midió el pH (ASTM D4972-13).

Adicionalmente se le midió el pH a una mezcla de suelo más 25 mL de agua en una relación de 1:2.5 la mezcla se agitó durante 5 minutos con varilla de vidrio y se dejó reposar por 2 horas, a continuación se midió pH con pH metro (INIA, 2006).

Método con cloruro de potasio (KCl)

Se preparó una solución 1M de KCl, la cual se utilizó en una relación de 1:2.5 (suelo: solución), para este caso se tomó el suelo y se mezclaron con 25 mL de KCl, la mezcla se agitó durante 5 minutos con varilla de vidrio y se dejó reposar por 2 horas, a continuación se midió pH con pH metro (INIA, 2006).

La mezcla debe estar a temperatura ambiente (15 a 25 °C) al momento de medir el pH. (Lenz, 2004).

5.1.1.2.2 Contenido de metales pesados totales

Para la caracterización de suelos se tomaron 20 g de este por triplicado y se enviaron a Life Sciences Division (ALS), para que se le realizará la medición de contenido total de metales pesados según las normas internacionales de la EPA descritas anteriormente en la tabla 7.

5.1.1.3 Caracterización microbiológica del suelo

5.1.1.3.1 Aislamiento de bacterias

Para el aislamiento previamente se preparó medio de cultivo mínimo sólido (K_2HPO_4 0.8 g/L; KH_2PO_4 0.2 g/L; $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 g/L; $CaSO_4$ 0.05 g/L; $MgSO_4$ 0.5 g/L; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L; Agar-Agar 15 g/L), el cual fue inoculado con una serie de diluciones seriadas del suelo contaminado (1:2 a 1:256). Las diluciones se prepararon a partir del tubo de crecimiento con medio líquido que contenía suelo (30 g). Luego, se dispuso de placas para inocular, se hicieron siembras homogéneas y se incubaron a 30 °C hasta obtener colonias. A partir de este crecimiento se eligieron las colonias aisladas más representativas en cuanto a tamaño y se tomaron con un asa de loop una porción de éstas para la realización de siembras por agotamiento de estrías. Este procedimiento se llevó a cabo para el máximo de colonias distintas que se observaron.

Como medio alternativo del anterior para obtener microorganismos desde el suelo contaminado se preparó agar extracto de suelo, para ello se tomaron 1000 g de suelo (agrícola) y se mezclaron con 2 L de NaOH 50 mM el cual se incubó durante toda la noche a T° ambiente, posteriormente la mezcla se filtró y centrifugó por 60 min a 18000 rpm, el sobrenadante se esterilizó a través de un filtro de membrana de 0.2 μ m, el medio agar extracto de suelo contenía 500 mL/L de extracto de suelo y 15 g/L de agar-agar, se consideró 50 mg/L de cicloheximida para evitar crecimiento de hongos (Hamaki T., *et al.*, 2005).

Utilizando como base el medio mínimo descrito anteriormente, se prepararon medios selectivos, los cuales contenían 0.5 g/L de glucosa y concentraciones específicas en partes por millón (ppm) de arsénico (As), cadmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), mercurio (Hg), molibdeno (Mo), níquel (Ni), plomo (Pb) y zinc (Zn) según la

tabla 8, concentraciones las cuales se aumentaron gradualmente hasta que los microorganismos no lograron crecer.

Tabla 8. Concentraciones iniciales en cultivos selectivos

Metal	As	Cd	Co	Cu	Hg	Mo	Ni	Pb	Zn
Concentración inicial (ppm)	25	20	25	400	5	50	35	150	200

Posteriormente estas colonias se crecieron en medio LB sólido (NaCl 10 g/L; Triptona Bacteriológica 10 g/L; Extracto de levadura 6 g/L; Agar-Agar 15 g/L) para obtener colonias más rápidamente y de mayor tamaño.

5.1.1.3.2 Morfología de colonias

La morfología celular del aislado se estudió observando las colonias puras obtenidas a partir de los aislados, mediante análisis en microscopio óptico (Leica DM1000) de muestras teñidas con una solución de contraste (tinción Gram). Para ello se fijaron cada una de las muestras en un portaobjeto limpio y se utilizó el protocolo de tinción Gram clásico (cristal violeta, 1 min; lugol, 1 min; alcohol-acetona, 30 seg. y safranina, 1 min).

5.1.1.3.3 Identificación bacteriana

Para la identificación de los aislados obtenidos a partir de las muestras de suelo, se realizó extracción de ADN utilizando el kit Ultra Clean Microbial DNA Isolation (MO BIO Laboratories Inc, Carlsbad, California)

Para los microorganismos aislados que no resultó la extracción con kit se propuso un protocolo convencional basado en el trabajo de Poutou et al., 2005. En primera instancia se inocularon 5 mL de cultivo con la bacteria de interés crecidas previamente en sus condiciones apropiadas, esto hasta que el cultivo estuviese saturado (el tiempo de saturación depende de la tasa de crecimiento). Se Centrifugaron 1.5 mL del cultivo por 2 minutos. Luego se descartó el sobrenadante, a continuación se resuspendió el pellet en 567 μ L de buffer TE por pipeteo, se añadió 30 μ L de SDS 10% y 3 μ L de proteinasa K 20 mg/mL para obtener una concentración final de 100 μ g/mL en 0.5% de SDS. Se mezclaron completamente e incubaron por 1.5 horas a 37 °C,

luego se elevó la temperatura a 65 °C para inactivar la proteinasa K y añadir 2 µL de RNasa 10 µg/mL e incubaron a 37 °C por 30 minutos. Luego de ello se añadió 100 µL de NaCl 5M y se mezclaron completamente. Continuando se agregó 80 µL de CTAB/NaCl, se mezcló completamente e incubó 10 min a 65 °C. Se añadió aproximadamente un volumen igual (0.7 a 0.8 mL) de cloroformo/alcohol isoamílico, se mezcló completamente y centrifugó 4 a 5 minutos. Se removió el sobrenadante acuoso-viscoso a un tubo nuevo, dejando la interfase. Después se añadió un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, se extrajo completamente y centrifugó por 5 minutos. Luego se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadió 0.6 volúmenes de isopropanol frío para precipitar los ácidos nucleicos. Se agitó el tubo de adelante hacia atrás hasta ver un precipitado como pelo blanco, luego se centrifugó a 14000 rpm descartar el sobrenadante y añadir 500 µL de etanol 70% frío, a continuación se centrifugó 5 minutos a temperatura ambiente, se removió el sobrenadante y se dejó secando al aire bajo campana el pellet, luego de que estuvo seco el tubo, se resuspendió el pellet en 50 µL de buffer TE.

Posteriormente, se cuantificó el ADN mediante la utilización de NanoDrop One, midiendo las concentraciones en ng/µL a longitudes de onda de 260 y 280 nm, se usó la relación de absorbancia 260/280 como criterio de pureza del ADN (>1,8 se considerará puro). La identificación genética de los aislados se realizó mediante la amplificación por PCR del gen ribosomal 16S, utilizando los partidores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'), los cuales generan un amplicón de 1460 pb aproximadamente. El programa de termociclador consto de una denaturación inicial 94 °C por 3 minutos, 30 ciclos de denaturación a 94 °C por 45 segundos, alineamiento a 55 °C por 30 segundos, extensión a 72 °C por 2 minutos y una extensión final a 72 °C por 10 minutos. Tanto las muestras de ADN de la extracción como los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE, durante 1 hora a 100 V por electroforesis vertical para verificar que el amplicón estuviese correcto (dentro del tamaño esperado). Para la visualización del gel se utilizó una solución de Gel Red al 0.005%. Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit Wizard SV Gel and PCR clean-Up System de

Promega (EE.UU.) y se enviaron a MacroGen (Corea) para ser secuenciados y posteriormente identificado mediante análisis bioinformáticos en programa DNA Baser.

5.1.1.3.4 Aislamiento de hongos

Para aislar se prepararon 2 medios de cultivo específicos, con el objetivo de favorecer el crecimiento de hongos. Se utilizó medio Kimura líquido (Peptona 5 g/L; Extracto de levadura 2 g/L; Glucosa 20 g/L; KH_2PO_4 1 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/L; pH 5) para promover crecimiento de hongos y también medio G-MEA sólido (Agar-agar 10 g/L; Extracto de malta 3.5 g/L; Glucosa 10 g/L) para aislar los hongos.

5.1.1.4 Extracción química secuencial de fases

La extracción química secuencial se realizó para conocer en qué fase y en qué proporciones se encuentra cada metal a analizar y remediar para la recuperación del suelo, este protocolo optimizado fue propuesto en 2006 por Dacera y Babel (figura 9), el cual se usó para cumplir uno de los objetivos planteados.

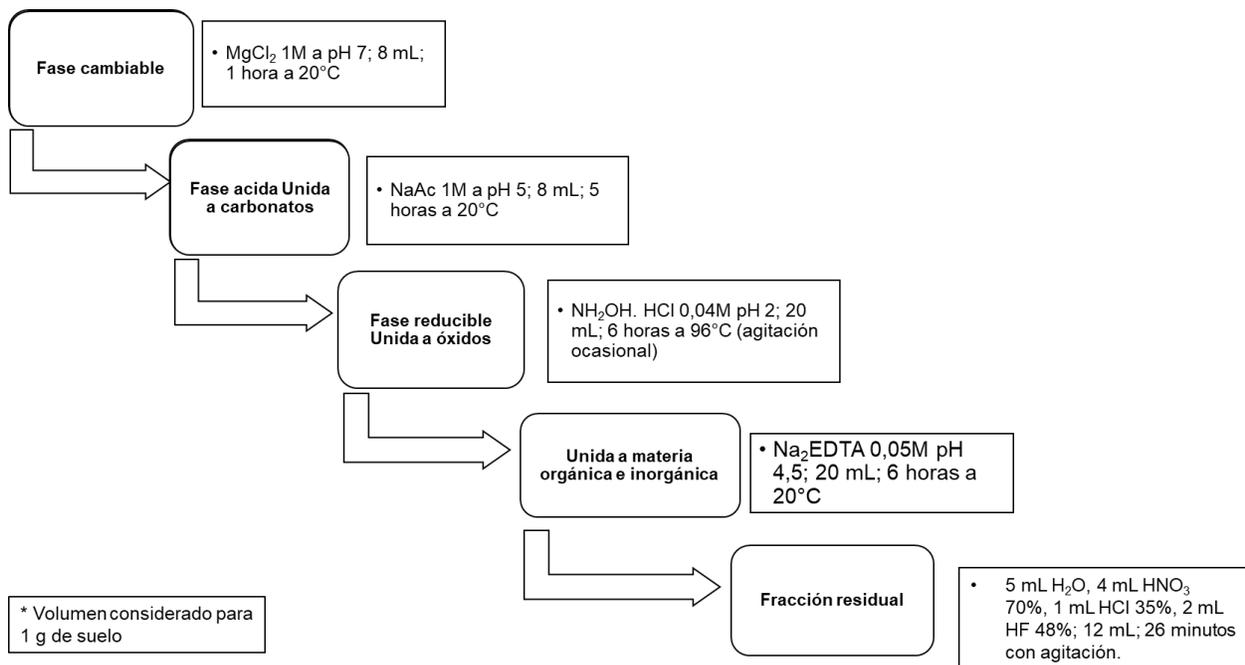


Figura 9. Extracción química secuencial de fases.

5.2 Objetivo específico II

5.2.1 Extracción de metales pesados

5.2.1.1 Extracción con agua destilada y agua potable

Para esta etapa se tenían 2 shots uno con 100 mL de agua destilada y otro con 100 mL de agua potable. A continuación se masaron 30 g de suelo contaminado previamente tamizado (tamiz de 2 mm), para cada solución de lavado, adicionalmente se masaron 30 g de suelo para tener como control negativo y así conocer los parámetros iniciales, las mezclas se agitaron de manera constante a 200 rpm por 24 horas a 25 °C. El suelo se recuperó, se tomaron 20 mL como muestra de cada solución de lavado. Las muestras se enviaron a ALS. El suelo recuperado luego de los lavados se secó a 105 °C durante 14 horas y luego se envió para su análisis.

5.2.1.2 Extracción con ChemSol A

La propuesta se basó en los trabajos de Vekken y Hamelers, 1999, Dacera y Babel 2006 y finalmente Gaber *et al.* 2011.

Se preparó una solución stock de ChemSol A 1 M, para a partir de ella preparar 0.5 L de una solución 0.1 M y además preparar 4 soluciones de agua destilada regulada a pH 1.9, 2.35, 3 y 4.

A continuación se masaron 30 g de suelo contaminado previamente tamizado (tamiz de 2 mm), para cada solución de lavado y se le agregaron 100 mL de solución ácida (ChemSol A 0.1M, y aguas con pH ajustado), adicionalmente se masaron 30 g de suelo para tener como control negativo para conocer los parámetros iniciales, las mezclas se agitaron de manera constante a 200 rpm por 24 horas a 25 °C. El suelo se recuperó y se tomaron muestras de las soluciones de lavado, tomando 20 mL de cada lavado. Las muestras se enviaron a ALS. El suelo recuperado luego de los lavados se secó a 105 °C durante 14 horas y luego se envió para su análisis.

5.2.1.3 Reducción volumen de ChemSol A con metales en rotoevaporador

Para generar el menor volumen posible de ChemSol A con presencia de metales pesados, se llevó a cabo una metodología de reducción de volumen mediante evaporación al vacío en un Rotoevaporador IKA® RV 10. Se tomaron 500 mL de la

solución ChemSol A, y se colocaron en un balón de 1000 mL a 80 °C durante 1 hora a 130 rpm, mediante un baño termostático. Las muestras de líquido inicial, del concentrado orgánico y del agua evaporada y condensada para su recuperación, se analizaron mediante ICP-MS, y se determinó la concentración de metales pesados.

5.2.1.4 Extracción con ChemSol C

Se prepararon 5 soluciones de ChemSol C a una concentración del 5% p/v para ChemSol Ca y 5% v/v para ChemSol Cb, ChemSol Cc, ChemSol Cd y ChemSol Ce, soluciones con un volumen total de 100 mL en agua destilada.

A continuación se masaron 30 g de suelo contaminado previamente tamizado (tamiz de 2 mm), para cada solución de lavado y se le agregaron 100 mL de estas, adicionalmente se masaron 30 g de suelo para tener como control negativo, las mezclas se agitaron de manera constante a 200 rpm por 24 horas a 25 °C. El suelo se recuperó, se tomaron muestras de las soluciones de lavado, tomando 20 mL en cada lavado. Las muestras serán enviadas a ALS. El suelo recuperado luego de los lavados se secó a 105 °C durante 14 horas y luego se envió para su análisis.

5.2.1.5 Extracción con ChemSol S

Se preparó una solución stock de ChemSol S 1 M, para a partir de ella preparar soluciones de 0.1, 0.25 y 0.5 M; La solución se preparó ajustando a pH 8 con NaOH 10 N.

Se masaron 30 g de suelo contaminado, previamente tamizado, y se le agregaron 100 mL de solución ChemSol S 0.1 M, además se masaron 30 g más, los cuales se lavaron con 100 mL de ChemSol S 0.25 M, y otros 30 g los cuales se lavaron con 100 mL de ChemSol S 0.5 M, estos se agitaron de manera constante a 200 rpm por 24 horas a 25 °C. El suelo se recuperó y se tomaron muestras de las soluciones de lavado tomando 20 mL en cada lavado. Las muestras se enviaron a ALS. El suelo recuperado se secó a 105 °C durante 14 horas y luego se envió para su análisis.

En resumen, cada shot con su respectiva mezcla de agente químico y suelo, se agitó en un Shaker de piso marca Tempra (modelo, 2HWY-211C), pasada las 24 horas cada muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos en frascos de 250 mL en un rotor Thermo con velocidad máxima de 5000 rpm (figura 10), luego de ello de cada

frasco se tomaron 20 mL como muestra y se guardaron en frasquitos de sellado al vacío, finalmente se enviaron a ALS.

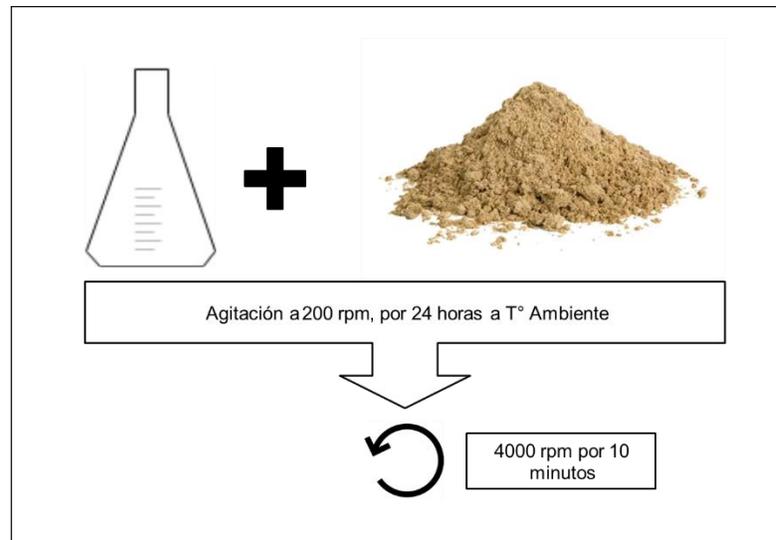


Figura 10. Proceso de lavado común para cada agente químico.

5.2.1.6 Recuperación ChemSol S

Para la recuperación del ChemSol S se realizó lo hecho por Pocięcha, 2012, protocolo en el cual la solución de lavado de suelos se alcalinizó utilizando NaOH 5 M hasta pH 11.5 para precipitar Fe y metales, luego el pH de la solución se ajustó a valores entre 1 y 2 usando HCl al 37% para precipitar el ChemSol S.

Después de agitar la solución alcalinizada y acidificada durante 2 h, Fe y ChemSol S precipitaron y se recuperaron de la solución mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 min. El ChemSol S y los metales se secaron a 60 °C por separado hasta obtener un peso constante y se guardaron; El ChemSol S reciclado, fue posteriormente lavado con una solución de ChemSol A 1 M para eliminar el remanente de metales que quedó.

5.2.1.7 Extracción con quitosano

Para este procedimiento se utilizó el protocolo de Montero *et al.*, 2010, en el cual se prepararon perlas de este biopolímero; para ello se utilizó quitosano comercial (Sigma-Aldrich, Islandia).

Se pesaron 0.8 g de quitosano, y se le agrego una solución de ácido acético al 4% (20 mL), luego se agitó y se le agregó esta solución por goteo a 100 ml de NaOH al 2.5 N, cada gota agregada se transformó en una perla. Las perlas de gel se lavaron con agua destilada midiendo en cada lavada el pH con un pHmetro Orion Star A211 hasta alcanzar un pH neutro; posteriormente se eliminó el agua colocando las perlas en la estufa a 105 °C hasta peso constante, luego se sacaron y quedaron listas para ser utilizadas en la remoción de los metales.

Se tomaron 3 volúmenes de 50 mL de ChemSol A a pH 1.9 utilizada en la extracción anterior y se les dio tratamiento con 50 mg de perlas de quitosano previamente acondicionadas. El ChemSol A previamente fue ajustado a distintos pH de 7, 5, y 3, para analizar cómo se comporta el quitosano para sacar los metales unidos al ChemSol A. Para controlar el pH se utilizaron soluciones de NaOH 2.5 N y HNO₃ al 3%, a continuación la mezcla de ChemSol A con quitosano se dejaron en agitación a 100 rpm durante una hora. Se filtraron las soluciones para separar el quitosano, y se tomaron muestras de 20 mL para ser enviadas a analizar.

5.2.1.8 Extracción con zeolita

5.2.1.8.1 Activación zeolita por NH₄Cl y HCl

Para promover una mayor retención de metales por la zeolita, esta se activó mediante un protocolo señalado por Antonio Duran Segovia, 1996, en su tesis doctoral, para la zeolita ZSM-5. Se propusieron 2 métodos de activación para evaluar la eficiencia de cada uno, el primero que se realizó fue utilizando ácido clorhídrico 0.6 N, esta disolución se puso en contacto con la zeolita en una proporción de 15 mL de solución por gramo de zeolita, esta solución se agitó durante 4 horas a 250 rpm en un Shaker de mesón, pasada las 4 horas la zeolita se lavó sucesivamente con agua desionizada, hasta que se eliminó la totalidad de cloruros generados en el proceso de activación.

Para comprobar la ausencia de cloruros en solución, se realizó una prueba química con una solución de nitrato de plata 0.5 M, esta se adicionó en gotas a una muestra del lavado de app 5 mL, al generarse un precipitado blanco indicó que aún había presencia de cloruros, por lo tanto al momento de no generarse precipitado se

pudo deducir la no presencia de cloruros. Finalmente la zeolita se secó en estufa a 110 °C por 14 horas.

El segundo método se realizó utilizando cloruro de amonio 1 M, utilizándose en una proporción de 10 mL de disolución por cada gramo de zeolita, solución la cual fue agitada por 1 hora a 80 °C, luego la zeolita se filtró y se puso en contacto nuevamente con NH₄Cl nueva y así por 3 veces más, a continuación se filtró la zeolita y se lavó con agua desionizada hasta eliminar completamente la presencia de cloruros, lo cual se comprobó por la prueba con nitrato de plata, al estar lista se secó a 110 °C por 14 horas.

5.2.1.8.2 Activación de zeolita por surfactante

Según el protocolo de Bowman *et al.*, 2001, la activación se realizó con la utilización de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA), un tensioactivo catiónico obtenido en su forma bromuro o cloruro para la modificación de la superficie de la zeolita.

Se trataron 60 g de zeolita natural con 180 mL de solución de HDTMA a una concentración de 50 mmol/L y se mezclaron en una mesa agitadora a 25 °C y 150 rpm durante 8 h. La mezcla se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos y luego se lavó 2 veces con agua desionizada. Posteriormente la zeolita se secó al aire libre durante 4 horas.

5.2.1.8.3 Extracción con zeolita natural y activada de ChemSol A

Para este procedimiento se tomaron 30 mL de cada lavado realizado con ChemSol A (solo sobrenadante) y se dispusieron en falcón de 50 mL y a ellos se les agregó 1.5 g de zeolita micronizada (figura 11), además se utilizó zeolita activada por NH₄Cl, HCl y surfactante, las mezclas se dejaron en agitación constante por 24 horas en un Shaker de mesón N-BIOTEK (modelo, NB-205), a 200 rpm y 25 °C.

Pasada las 24 horas de agitación con zeolita, cada tubo falcón se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos, de ellos se recuperaron los 20 mL de sobrenadante y se enviaron a ALS en frasquitos de sellado al vacío.

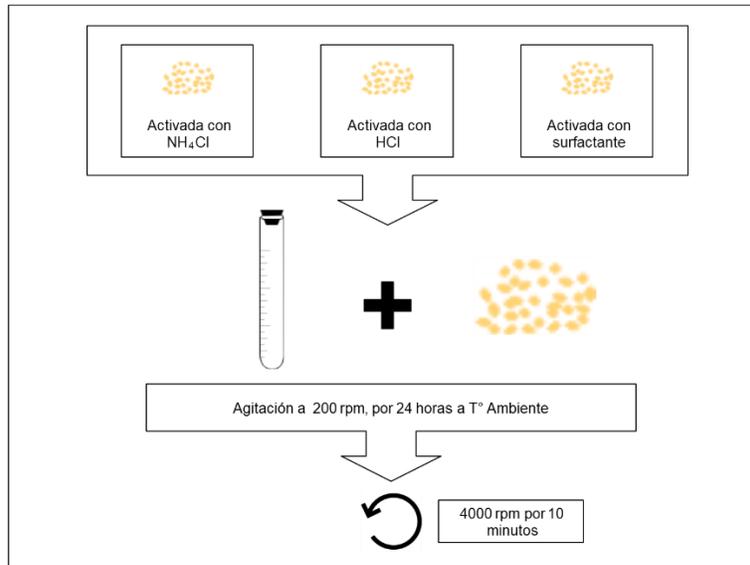


Figura 11. Extracción de metales con zeolita.

5.2.1.8.4 Recuperación de zeolita

La zeolita obtenida luego de los lavados se seccionó en 2 (0.75 g), para ser lavadas con 2 soluciones distintas NaCl y NaOH (20 mL a cada uno), y poder determinar la mejor eficiencia de recuperación de la zeolita, el lavado se realizó con agitación constante de 200 rpm por 24 horas. Luego de ello se centrifugaron los tubos falcón y el sobrenadante se envió a ALS (figura 12).

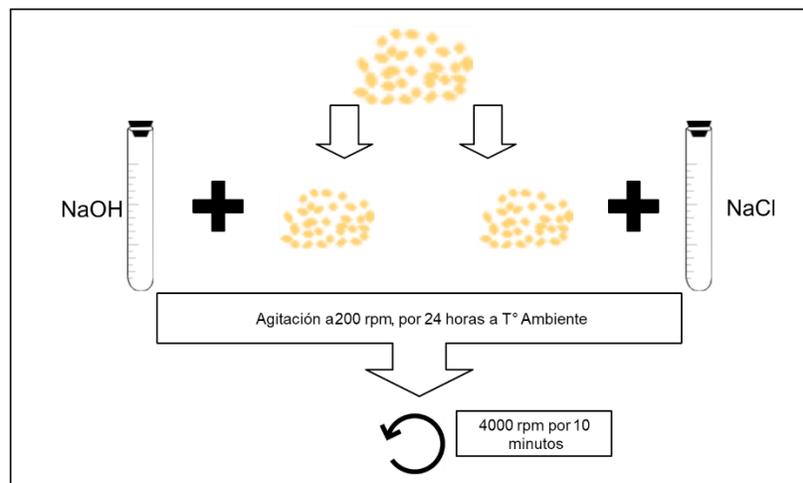


Figura 12. Recuperación de zeolita.

Se pretendió poder reutilizar la zeolita para posteriores ensayos y con los resultados obtenidos se procedió a discriminar cuál era el mejor método, o la mejor combinación de métodos para realizar la extracción de metales.

5.2.2 Curvas de equilibrio por saturación

Se realizaron curvas de equilibrio de extracción, para determinar los tiempos de saturación de cada extractante seleccionado con los mejores rendimientos, para ello se realizó el mismo proceso de extracción ya mencionado, la diferencia radica en que se tomaron muestras cada 1 hora (1-2-3-4-5-6-9-24), con el fin de determinar los tiempos en los cuales cada solución orgánica ya no es capaz de extraer más metal. Para este caso fue necesario aumentar los volúmenes de las soluciones a 1 L y suelo a 300 g (AF+L) para poder tener la suficiente muestra para cada tiempo.

Basándose en los trabajos de Veeken and Hamelers en 1999 y Vink *et al.* en 2017 la representación de las curvas se mostró en términos de concentración de metal extraída en el tiempo.

5.3 Objetivo específico III

5.3.1 Fitorremediación

Se tuvo acceso a un análisis de riesgo ambiental del suelo contaminado y de acuerdo a los resultados se determinó y evaluó una alternativa de biorremediación, dentro de la cual se definió la utilización de Espino (*Acacia caven*) para realizar un proceso de fitoextracción por acumulación de metales, adicionalmente fue necesario considerar bacterias productoras de sideróforos para favorecer el crecimiento del Espino, y para ello se evaluó esta capacidad en los aislados obtenidos en el objetivo II.

Para efecto del ensayo con Espino se realizaron 4 ensayos a escala de laboratorio con la utilización de 36 Espinos con crecimiento de 8 semanas, con un tamaño promedio de 4 cm de altura en tierra de hoja con vermiculita, los espinos son tolerantes a condiciones adversas por lo cual no depende de muchos requerimientos para su crecimiento, definidos como acumuladores de metales pesados y provistos por el profesor Bernardo González de la Universidad Adolfo Ibáñez. Se dispuso de 12 maceteros (figura 13) y en cada uno se trasplantaron 3 plantas, se realizó toma de muestras al inicio, tiempo medio y final del proceso (2.4 meses) para determinar el

contenido de metales, en suelo, raíz, hojas y tallo, en la figura 14 se muestra como es el proceso de fitoextracción a nivel de planta; para el caso de la toma de muestras de biomasa vegetal fue necesario realizar digestión ácida utilizando ácido nítrico al 63%, esto debido a la poca cantidad de muestra posible de tomar, que para términos de medición en laboratorio no era suficiente. Por las características que posee el suelo fue necesario agregar un 20% de tierra de hoja con trazas de vermiculita, para ayudar en la retención de agua y aumentar la cantidad de materia orgánica, adicionalmente para favorecer el crecimiento de las plantas arbóreas promoviendo la captación de Fe^{+2} , se adicionaran 14.12 mL de un cultivo de LBG por cada 24 kg de suelo conteniendo bacterias las cuales son productoras de sideróforos, de estos 24 kg de suelo se agregaron 2 kg por maceta; para determinar la producción de sideróforos se preparó medio CAS.



Figura 13. Representación proceso de fitorremediación.

Para preparar 1 L de **medio CAS-agar** se disolvieron 60.5 mg de CAS en 50 ml de agua y posteriormente se mezcló con 10 ml de una solución que contenía $FeCl_3 \times 6H_2O$ 1 mM disuelto en HCl 10 mM. La solución resultante se añadió lentamente y con

agitación a otra solución que contenía 72.9 mg de HDTMA disuelto en 40 ml de agua. La mezcla resultante (solución 1) se autoclavó. También se autoclavó otra solución (solución 2) que contenía 750 ml H₂O, 100 ml medio mínimo M9 (10x), 15 g de agar-agar, 30.

24 g de Pipes y NaOH para ajustar el pH a 6.8. Después de enfriar a 50 °C, se mezclaron 50 ml de la solución 1 con 450 ml de la solución 2, añadiendo a esta mezcla acetato sódico 50 mM, NH₄Cl 2 mM y 1.5 µl/mL de la solución de trazas del medio M9 (Luque, 2005).

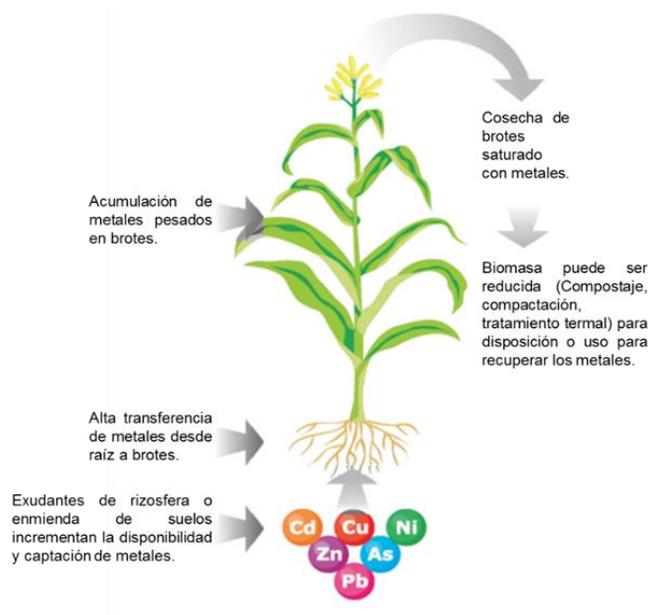


Figura 14. Proceso de fitoextracción de metales a nivel de planta. *Fuente: Singh et al., 2003*

5.4 Objetivo específico IV

5.4.1 Proceso secuencial de remediación

A partir de los datos recopilados de todos los ensayos se estandarizó un proceso secuencial para la extracción de metales, el cual involucra una estrategia de tamizado para separar arena fina y limo de las fracciones más gruesas, a continuación tratar estas 2 fracciones unidas con una solución de ChemSol A durante 3 horas a 200 rpm a temperatura ambiente, luego el suelo es separado de la solución y puesto en contacto

con la solución ChemSol S, esta se agita durante 3 horas a 200 rpm a temperatura ambiente (25 °C), a continuación el suelo es separado de la solución y es secado a 105 °C. El suelo seco es mezclado con las fracciones más gruesas previamente separadas para restituir granulométricamente el suelo. Este suelo restituido es mezclado con un 20% de tierra de hoja y se le agrega un volumen conocido de medio LBG conteniendo microorganismos productores de sideróforos, adicionalmente el suelo es humedecido con un volumen conocido de agua destilada, todo esto dependiendo de la cantidad de suelo, lo cual es necesario para realizar el proceso de fitorremediación.

Entonces por otro lado se tienen plantas arbóreas (*Acacia caven*) previamente crecidas durante 5 a 6 semanas y estas plantas son trasplantadas a los suelos tratados fisicoquímicamente iniciando así el proceso. De forma paralela se procede a la reducción del volumen de ChemSol A hasta dejarlo en un 16-20% del volumen inicial para poder disponerlo y también se procede a realizar la recuperación de ChemSol S por el protocolo descrito previamente para poder reutilizarlo en el proceso.

5.4.2 Validación a escala de laboratorio

Para la validación, se procedió a realizar la remediación de 20 kg de suelo. Para ello se realizó la metodología propuesta por lotes en el punto 5.4.1 con los detalles específicos de los protocolos individuales, la cual tuvo una duración de 2 meses y medio.

6 Resultados

6.1 Objetivo específico I

6.1.1 Estrategia de tamizado

6.1.1.1 Análisis granulométrico

A partir del proceso de tamizado realizado, se obtuvieron los promedios de los porcentajes de cada fracción definidos mostrados en la figura 15, en el cual se resalta que el mayor porcentaje corresponde a arena media, y las fracciones más finas comprenden sólo un 17 % en total.

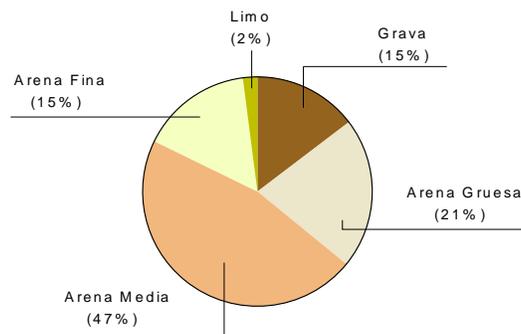


Figura 15. Composición granulométrica del suelo contaminado.

Adicionalmente, se determinó el contenido de metales pesados totales para cada fracción, los cuales están representados en las gráficas de la figura 16, donde se puede apreciar que el contenido de metales pesados se va incrementando a medida que la fracción de suelo es de carácter más fino, dentro de lo cual se destaca el hecho de que las mayores concentraciones de metales pesados se encuentran en arena fina y limo, con un 67% del contenido total, lo cual permitió seleccionar, para realizar el tratamiento, solamente esas fracciones, reduciendo considerablemente el volumen. Adicionalmente se destaca que el 93% del As, el 81% de Cu y el 92% de Pb se encuentran en estas fracciones más finas.

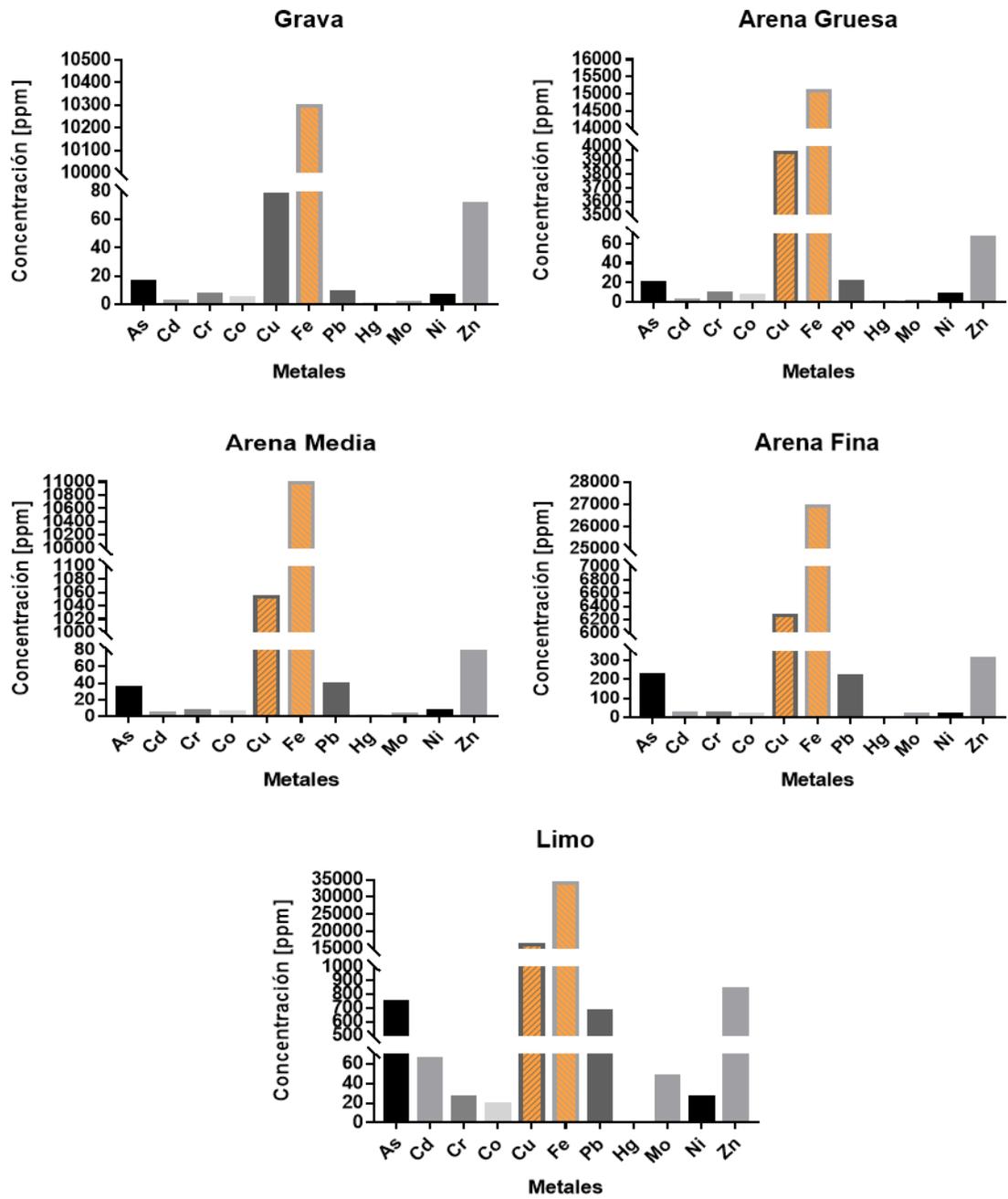


Figura 16. Contenido de metales pesados por fracción granulométrica.

6.1.1.2 Caracterización de parámetros del suelo

Para la caracterización del suelo, hubo bastantes variaciones en relación a rangos característicos para este tipo de suelos (franco arenoso), dentro de los cuales se destacan el contenido de agua, el cual está muy por debajo del rango característico que debiese ser de 90000 mg/kg comparado con el 1.65 mg/kg entregado por el laboratorio externo, otro factor muy importante en un suelo es su contenido de materia orgánica el cual arrojó un valor de 0.445% en base seca, lo cual también está por debajo del rango normal el cual es de 1.5 a 2.5% y por último destacar el contenido total de nitrógeno el cual arrojó un valor de 193 mg/kg bajo el rango de entre 500 a 3000 mg/kg que se considera como normal, los valores restantes para fósforo total y potasio están muy elevados con respecto de los rangos, datos apreciables en la tabla 9.

Tabla 9. Caracterización fisicoquímica del suelo

		Rango normal Suelo seco
Química		
Determinación de la materia seca y del contenido en agua en base a masa (mg/kg)	1.65	90000 (9%)
Fósforo Total (mg/kg base seca)	59.6	9.0 - 12.0
Materia Orgánica Total (% base seca)	0.445	1.5 - 2.5
Nitrógeno Total Kjeldahl (mg/kg base seca)	193	500 - 3000
pH H ₂ O (Unidades pH)	8.5	>8.5*
Potasio (mg/kg)	1480	96 - 135
Físico-Química		
Conductividad (dS/m)***	2.24	2 - 4**

* alcalino

**moderadamente salino

***Unidad Decisiemens por metro

6.1.1.2.1 Medición de pH

La medición del pH se realizó por diferentes métodos, de acuerdo a normativas vigentes para suelos en Chile y México, obteniendo valores un tanto más bajos en comparación con el obtenido por laboratorio externo, entre todos promedian un pH de 7.9, valores mostrados en tabla 10.

Tabla 10. Mediciones de pH del suelo

Solución	Suelo: Solución	pH	Norma	País que la implementa
Agua	1:01	7.83	ASTM D4972 – 95a	México
CaCl ₂	1:01	7.83	ASTM D4972 – 95a	México
Agua	1:10	8.42	NOM-021-RECNAT-2000	México
CaCl ₂	1:2.5	7.88	ISO 10390	Chile
KCl	1:2.5	7.54	ISO 10390	Chile

6.1.1.2.2 Contenido de metales pesados totales

De los resultados obtenidos para la muestra de suelo, los metales que exceden las normas holandesa (36 ppm para Cu, como norma más restrictiva y 55 ppm para As, 190 ppm para Cu y 530 ppm para Pb como normas menos restrictivas), alemana (0.4 ppm para As, 40 ppm para Pb y 60 ppm para Zn como las más restrictivas) y Española (450 ppm para Zn como la norma menos restrictiva) son As, Cu, Pb y Zn con valores de 142 ppm, 4753 ppm, 174 ppm y 234 ppm, para el caso del fierro este no está normado, debido a que no posee riesgos toxicológicos (gráfico 1).

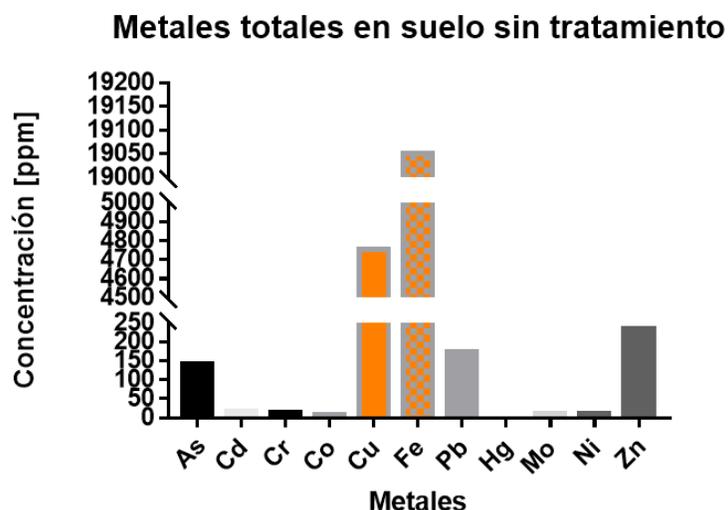


Gráfico 1. Contenido de metales pesados en suelo sin tratar.

6.1.1.3 Caracterización microbiológica del suelo

6.1.1.3.1 Aislamiento de bacterias

Se aislaron microorganismos con la capacidad de resistir y/o tolerar una serie de metales pesados de interés (As-Cd-Co-Cu-Hg-Mo-Ni-Pb-Zn) mostrados en tabla 11, los microorganismos que presentaron más dificultad de ser aislados fueron los correspondientes a cobre, plomo y cobalto.

Tabla 11. Concentraciones de metales al inicio y final del proceso de aislado de microorganismos

Metal	As	Cd	Co	Cu	Hg	Mo	Ni	Pb	Zn
Concentración inicial (ppm)	25	20	25	400	5	50	35	150	200
Concentración final (ppm)	75	100	250	700	25	300	150	300	200

6.1.1.3.2 Morfología de colonias

En las figuras 17 y 18 se muestran los análisis morfológicos realizados. En la figura 3 se muestran 6 aislados para distintos metales, primeramente se muestra un microorganismo aislado para arsénico (figura 17A) en la cual se pueden observar bacilos Gram negativos, los cuales presentan colonias circulares, color amarillo ocre, convexa con aureolas más oscuras en el centro, con borde liso, superficie un poco porosa. Luego se muestra otro microorganismo para arsénico el cual se definió como un bacilo corto Gram negativo (figura 17B), este se caracteriza por formar colonias circulares, porosas pero sin las aureolas que presenta el anterior, también es amarillo ocre, convexo y con borde liso. En la figura 17C se muestran colonias aisladas para medios con cadmio, dentro de lo cual se destaca que son cocos Gram negativos, con colonias circulares, con circunferencia más oscura en medio, color ocre, con borde liso, superficie lisa y convexa. Para el aislado en medio con cobalto (figura 17D), se observó que son Gram negativas, colonias circulares muy pequeñas, rosadas, y difíciles de caracterizar, en este caso en particular las bacterias generan cúmulos de metal por lo cual no se pudo determinar su morfología microscópica. Para el caso de la figura 17E

ocurrió algo similar que con la de cobalto, estas bacterias fueron aisladas en medio con cobre y también tienden a generar cúmulos del metal en las estrías, se presentan en color verde agua, de todas formas se pudo determinar que corresponden a bacterias Gram negativas, en placa no se aprecian colonias, pero al momento de mirar la placa al microscopio sólo se observan puntos muy pequeños. En la figura 17F, se observan bacteria aisladas en medio con mercurio, de la cual se determinó que corresponde a diplobacilos Gram negativos, se caracterizan por ser colonias rosadas pequeñas, circulares, con forma convexa y con borde liso. Para el caso del microorganismo aislado en medio selectivo con molibdeno (figura 18A) se determinó que corresponden a bacilos cortos Gram negativos, con colonias blancas, con borde irregular, presenta aureolas, forma convexa, y porosa. En la figura 18B se observan microorganismos aislados en medios con níquel, los cuales son bacilos cortos Gram negativos, sus colonias son de color crema, convexa, con borde liso, superficie porosa. Para el caso de las bacterias aisladas en medio selectivo con plomo (figura 18C y 18D), se observan colonias blancas, circulares con borde liso, convexas, de textura porosa, de las cuales se determinó que corresponden a diplobacilos Gram negativos, la única diferencia entre ambas es que la figura 18C presenta colonias mucho más grandes que la figura 18D. Finalmente en la figura 18E se muestra un microorganismo aislado en medio con zinc, el cual se determinó que corresponde a un bacilo semicurvo Gram negativo, este presenta colonias con tono ocre, circulares, con bordes liso, cóncavas.

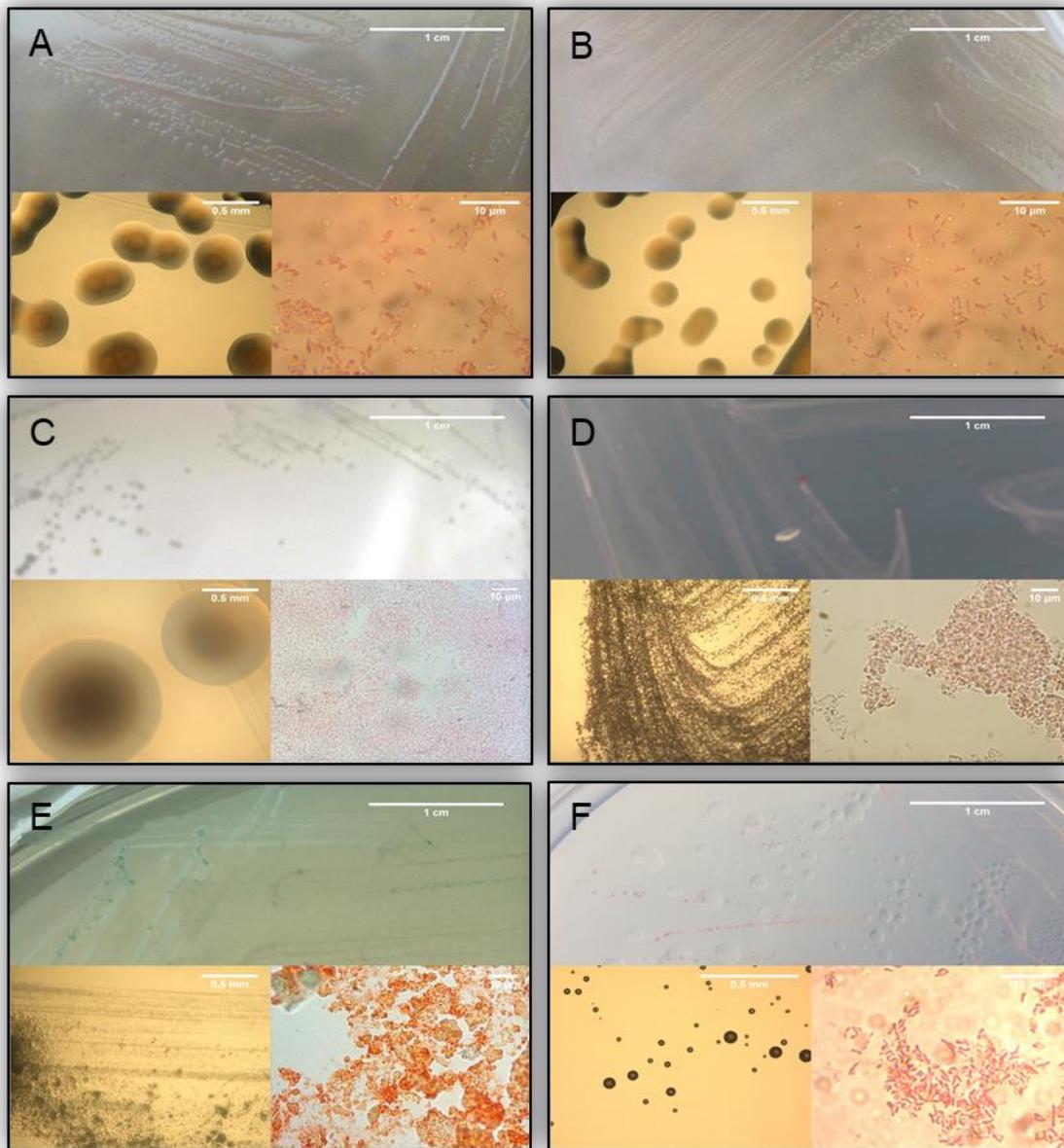


Figura 17. Caracterización morfológica de microorganismos aislados. Visualización de colonias en placa sin aumento, en microscopio óptico al 40X y de frotis teñido por tinción de Gram al 1000X. A, Bacteria As1 aislada en medio con 75 ppm de arsénico. B, Bacteria As2 aislada en medio con 75 ppm de arsénico. C, Bacteria Cd aislada en medio con 300 ppm de cadmio. D, Bacteria Co aislada en medio con 250 ppm de cobalto. E, Bacteria Cu aislada en medio con 700 ppm de cobre. F, Bacteria Hg aislada en medio con 25 ppm de mercurio.

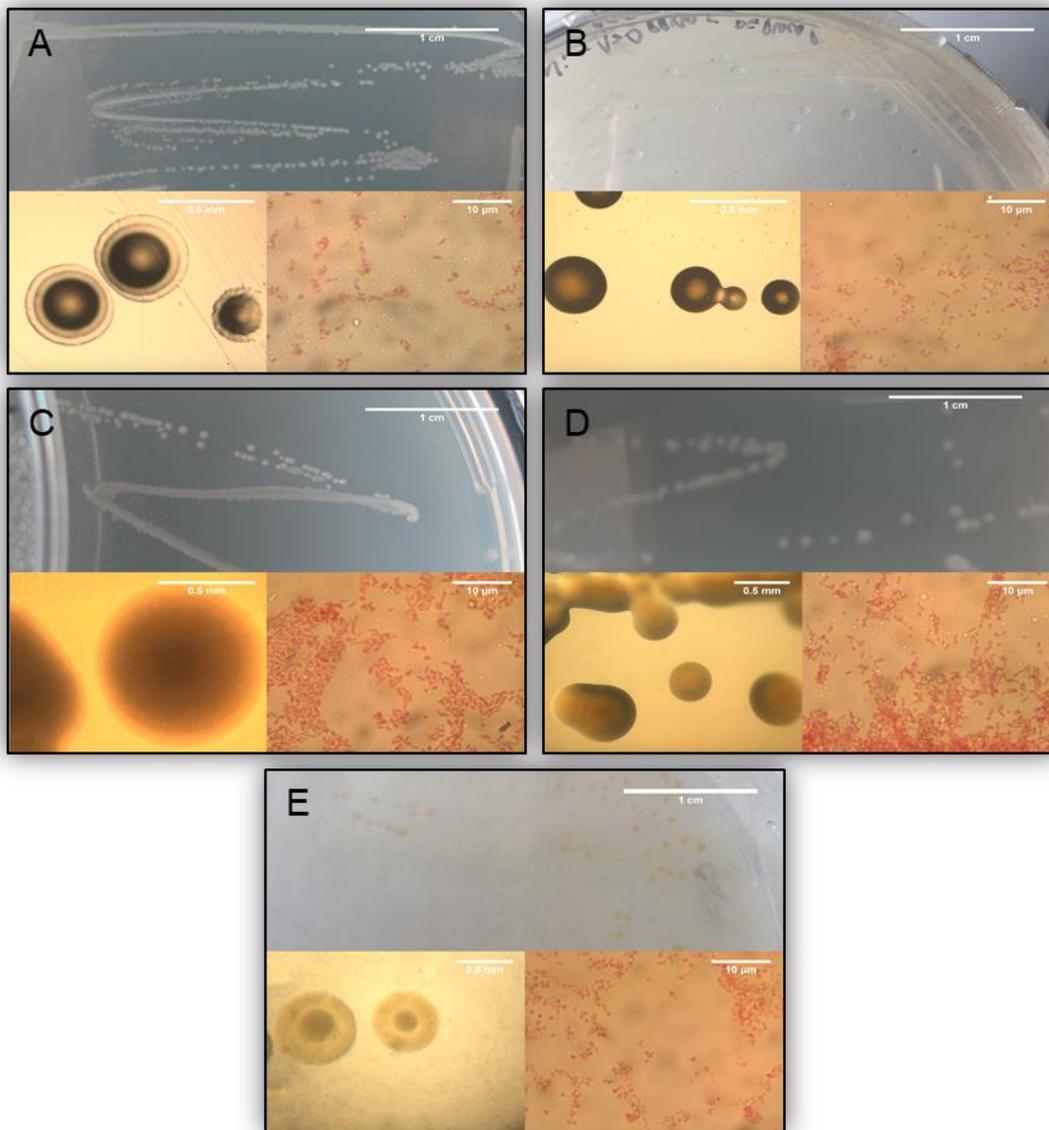


Figura 18. Caracterización morfológica de microorganismos aislados. Visualización de colonias en placa sin aumento, en microscopio óptico al 40X y de frotis teñido por tinción de Gram al 1000X. A, Bacteria Mo aislada en medio con 300 ppm de molibdeno. B, Bacteria Ni aislada en medio con 200 ppm de níquel. C, Bacteria Pb1 aislada en medio con 300 ppm de plomo. D, Bacteria Pb-1 aislada en medio con 300 ppm de plomo. E, Bacteria Zn aislada en medio con 300 ppm de zinc.

6.1.1.3.3 Identificación bacteriana

A partir de la amplificación del gen ribosomal 16S de cada microorganismo aislado, se obtuvieron las bandas esperadas alrededor de los 1500 pb, más exactamente de 1460 pb.

Luego de obtener los amplicones provenientes de la reacción de PCR, estos fueron enviados a secuenciar obteniendo los resultados mostrados en la tabla 12, cabe destacar que la mayoría de ellos corresponden a bacterias del género *Pseudomonas*.

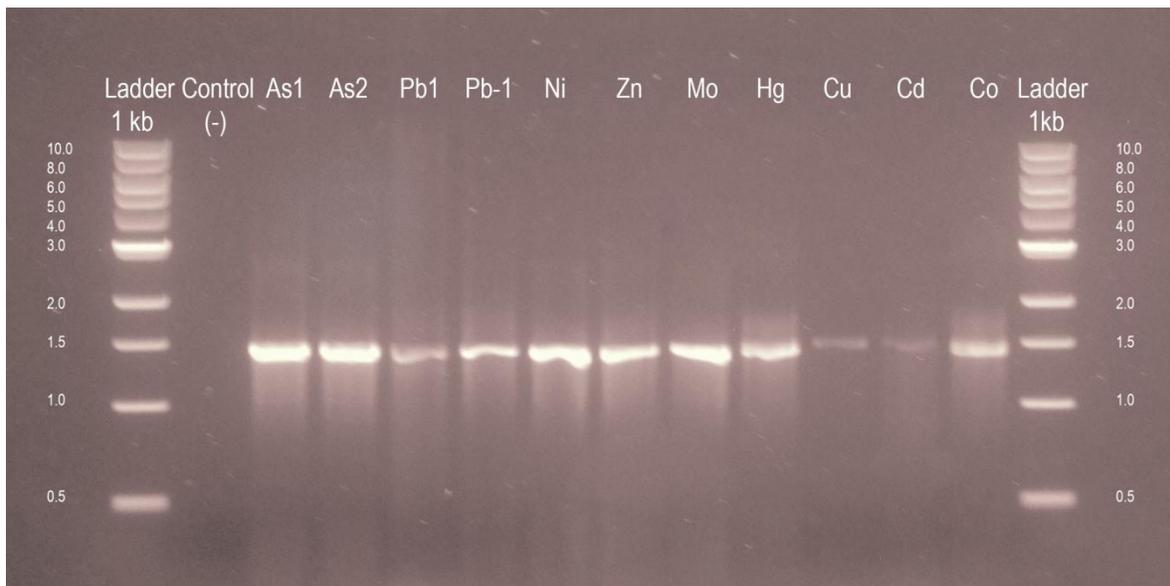


Figura 19. Gel de agarosa 1%. Amplificación gen ribosomal 16 S de bacterias aisladas desde suelo contaminado.

Tabla 12. Microorganismos identificados desde suelos contaminados con metales pesados.

Aislado	Género
As1	<i>Pseudomonas</i>
As2	<i>Pseudomonas</i>
Pb1	<i>Pseudomonas</i>
Pb-1	<i>Pseudomonas</i>
Ni	<i>Pseudomonas</i>
Zn	<i>Pseudomonas</i>
Mo	<i>Pseudomonas</i>
Hg	<i>Methylobacterium</i>
Cu	<i>Bacillus</i>
Cd	<i>Pseudomonas</i>
Co	<i>Microbacterium</i>

6.1.1.3.4 Aislamiento de hongos

A pesar de realizar varios ensayos para aislar microorganismos fúngicos, no se detectó la presencia de crecimiento.

6.1.1.4 Extracción química secuencial de fases

Del proceso de extracción química secuencial, se presentó un porcentaje importante de metales que no fueron extraídos por ninguna de las soluciones alcanzando el 46% comandados por Fe y Cu , el 39% de los metales se encuentran en la fase residual, las fases con menos contenido de metales fueron materia orgánica e inorgánica y óxidos. Se presentó un contenido destacable de metales unidos a carbonatos destacando los 1608 ppm de Cu, finalmente muy poco contenido de metales se encontraba en fase cambiante o disponible alcanzando un 0.45% del total de los metales. En términos de los metales de mayor importancia, para As su contenido está bastante distribuido entre las fases unida a carbonato, óxidos y residuales, también un porcentaje del 35% no se extrajo; para el caso de Cu se encontraba distribuido en su mayoría entre fase unida a carbonato y residual, no extrayéndose un 39% del contenido total por ningún agente químico; para el caso de Pb se distribuye entre fase unida a carbonato, óxido y residual, no extrayéndose un 18% del total en el suelo (gráfico 2).

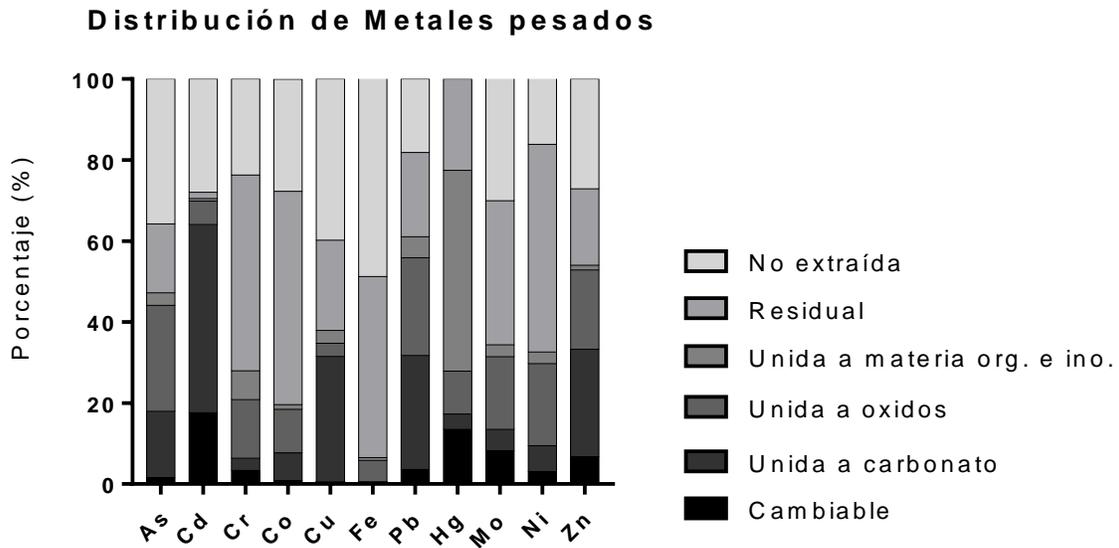


Gráfico 2. Extracción química secuencial de fases. Representación de disponibilidad de metales pesados en suelo.

6.2 Objetivo específico II

6.2.1 Extracción de metales pesados

Por los tonos de colores generados con cada solución al mezclarse con suelo se puede apreciar que estas adquieren colores en torno al azul y al verde, para el caso de las saponinas por su color café, su color tiende a aclararse luego del contacto con el suelo, lo cual se observa en la figura 20.

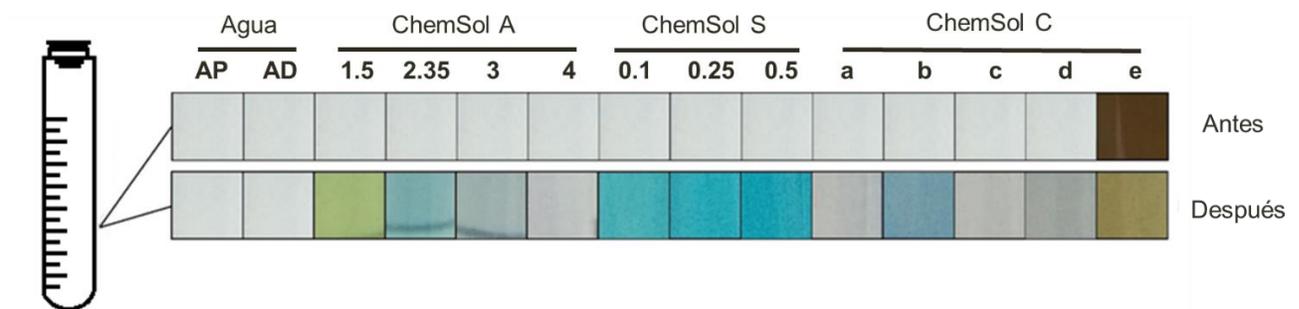


Figura 20. Representación colorimétrica de cada extracción.

6.2.1.1 Extracción con agua destilada y agua potable

Para el proceso de extracción de metales con agua potable y agua destilada, los valores no superaron el 3% de extracción comparando cada concentración de metal.

6.2.1.2 Extracción con ChemSol A

Presentó de los mejores resultados de extracción para la mayoría de los metales, destacando Cu, Cd, As y Pb con porcentajes de extracción de 28.12%, 62.5%, 33.7% y 26.67% respectivamente.

6.2.1.3 Extracción con ChemSol C

La mejor extracción de todo el barrido de metales fue de 3.63% para plomo con la utilización de ChemSol C.

6.2.1.4 Extracción con ChemSol S

Junto con ChemSol A presentó uno de los mejores resultados de extracción para la mayoría de los metales, destacando también Cu, Cd, As y Pb con porcentajes de extracción de 29.28%, 83.45%, 31.96% y 57.83% respectivamente.

6.2.1.5 Recuperación ChemSol S

Para el proceso de recuperación de ChemSol S, lo primero que se observó al momento de agregar ácido, fue un enturbamiento de la solución y a la vez un aclaramiento del color, posterior a la centrifugación se obtuvo un precipitado azul intenso mostrado en la subfigura B, lo cual correspondió a 1,6 g de metales precipitados, para el proceso siguiente de precipitación de ChemSol S, la solución se tornó aún más turbia y se generó un precipitado blanco, de lo cual se obtuvo un 94% de recuperación.

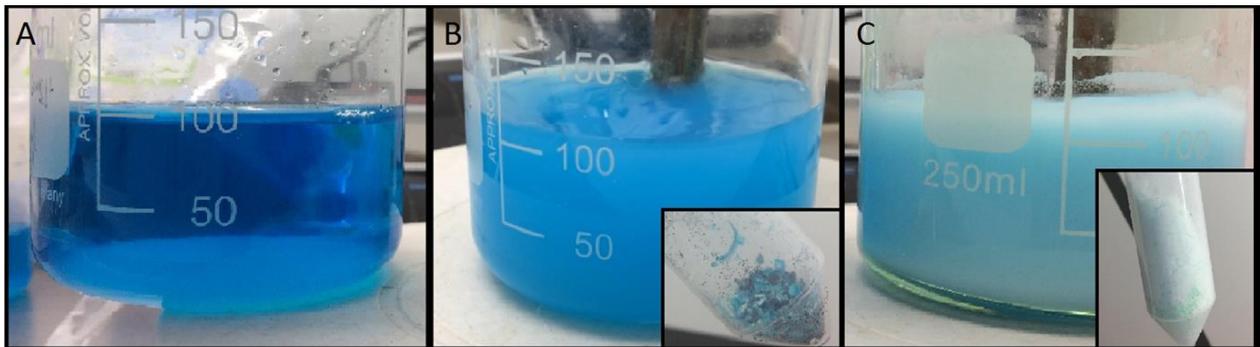


Figura 22. Precipitación ChemSol S. A. Solución sin tratar; B. Solución a pH 11.5 ($\downarrow\text{Me}^{2+}$); C. Solución a pH 1-2 ($\downarrow\text{ChemSol S}$).

6.2.1.6 Reducción volumen de ChemSol A

A partir del proceso de reducción de ChemSol A, se obtuvo un volumen de 70 ± 2 mL del compuesto concentrado a pH 1, junto con ello se obtuvo un volumen de 412 ± 10 mL de agua con pH 7 todo esto a partir de los 500 mL, se determinó una reducción de volumen de un 82 ± 2 %. Es importante destacar que el agua recuperada contiene metales en niveles trazas (tabla 13).

Tabla 13. Concentraciones de metal en ChemSol A antes y después de la reducción del volumen y concentraciones en agua

Metal	ChemSol A [ppm]	Agua recuperada [ppm]	ChemSol A concentrado [ppm]
As	99,3	0,38	709,29
Cd	15,37	0,06	109,79
Co	0,75	0,01	5,32
Cr	0,42	0,02	3,01
Cu	573	0,01	4092,86
Fe	308,9	0,49	2206,43
Mo	5,54	0,03	39,56
Ni	0,72	0,05	5,16
Pb	101,7	0,05	726,43
Zn	126,1	0,01	900,71

6.2.1.6 Extracción con quitosano

En la figura 23 se puede apreciar el proceso de preparación resumido de las perlas de quitosano, en el cual vemos en un inicio las dos soluciones (figura 9A), luego al contacto la formación de perlas de aproximadamente 4 mm de diámetro (figura 9B), y finalmente el secado para obtener perlititas de 1 mm de diámetro. (figura 9C).

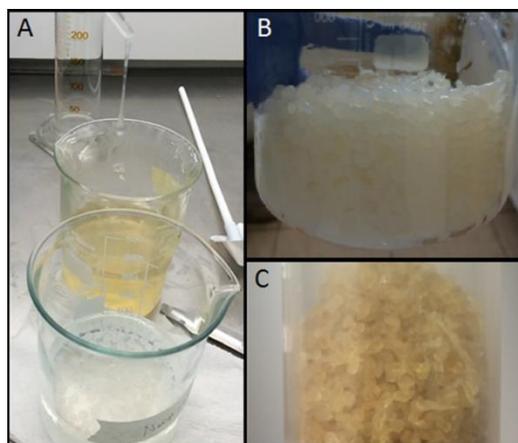


Figura 23. Preparación perlas de quitosano.

En la figura 24 se visualiza el cambio de color producido al poner en contacto las perlas de quitosano con las soluciones a pH 3 (A), pH 5 (B) y pH 7(C). Se observan

claras diferencias de intensidad de color entre las soluciones luego del tratamiento con las perlas, destacando un aclaramiento importante de la solución regulada a pH 3 frente a las otras 2.

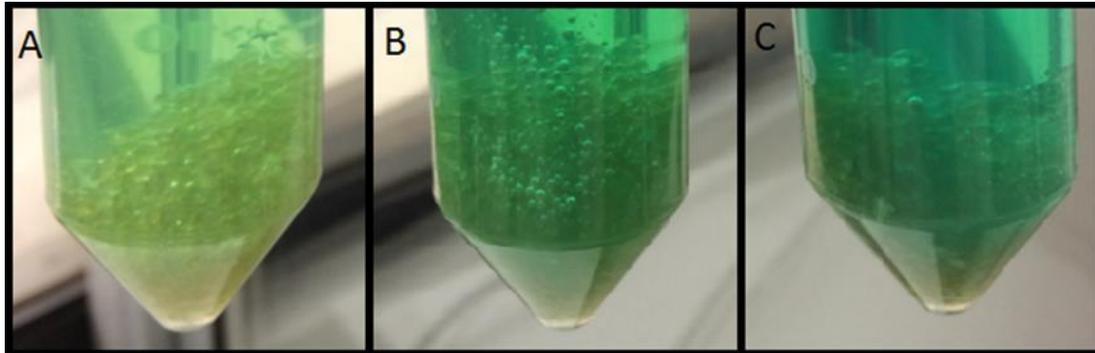


Figura 24. ChemSol A a diferentes pH con quitosano.

Los porcentajes de extracción de metales se pueden apreciar en la gráfica 3, dentro de lo cual cabe destacar la predominancia de efectividad de extracción con la solución ajustada a pH 3, se resalta también el gran porcentaje de recuperación de cobre el cual alcanzó el 89%.

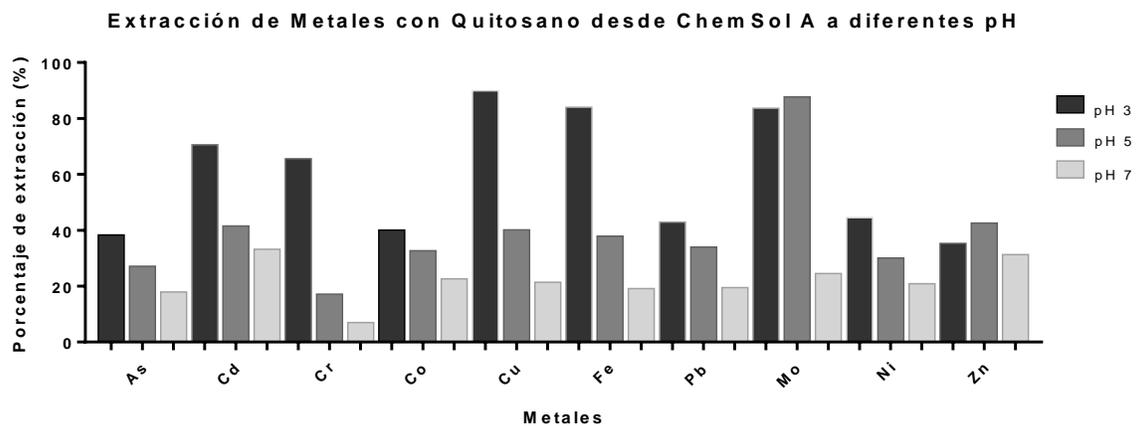


Gráfico 3. Recuperación de ChemSol A con perlas de quitosano.

6.2.1.7 Extracción con zeolita

6.2.1.7.1 Extracción con zeolita natural y activada

Los porcentajes de extracción obtenidos en este proceso en general no fueron buenos en comparación con quitosano los cuales son mostrados en la gráfica 4, adicionalmente tampoco se obtuvo diferencias colorimétricas en las recuperaciones de ChemSol A (figura 25). Cabe destacar sí, que la zeolita modificada por surfactante sobresalió por sobre el resto, logrando porcentajes muy cercanos a los obtenidos por quitosano.

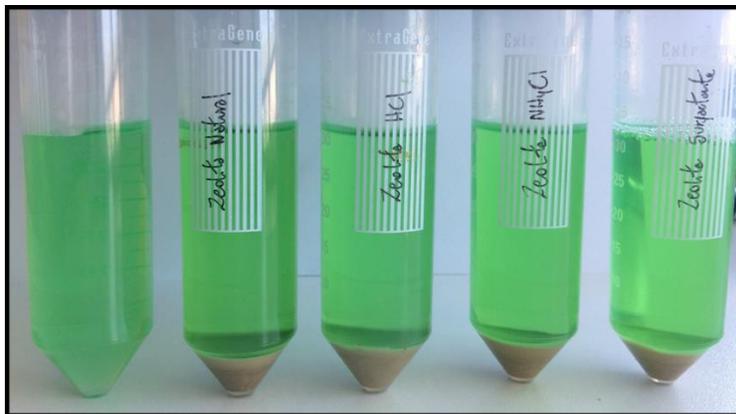


Figura 25. Representación gráfica de recuperación de ChemSol A versus un control sin tratar.

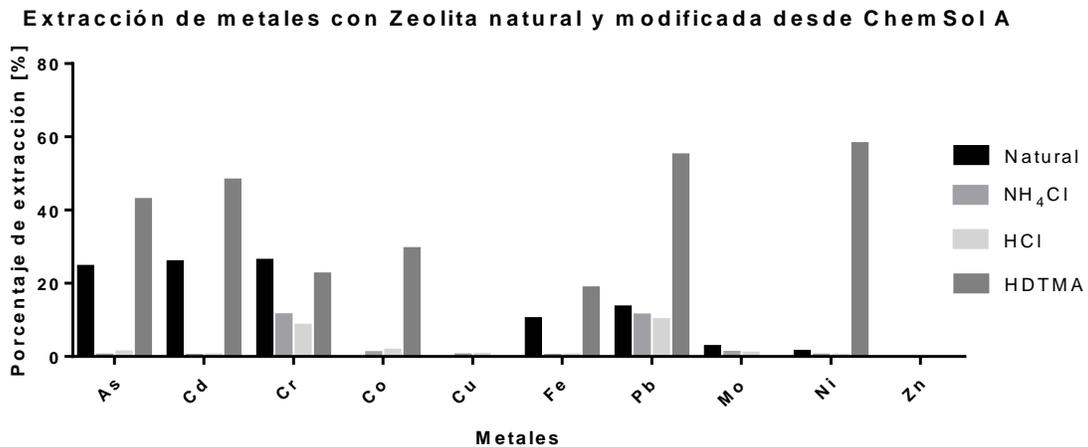


Gráfico 4. Recuperación de ChemSol A con Zeolita natural y modificada.

6.2.1.7.4 Recuperación de zeolita

Los porcentajes de recuperación obtenidos no superaron el 10% con ningún método (Datos no mostrados).

6.2.2 Curvas de equilibrio por saturación

A partir de los resultados obtenidos se eligieron como extractantes de metales a ChemSol A (pH 1,9) y ChemSol S (0,1 M), es por ello que se realizaron las curvas de equilibrio por saturación en el tiempo para ellos.

Los resultados arrojaron tiempos de saturación para ambos compuestos de 3 horas, para el caso de ChemSol A los metales determinantes fueron arsénico y cobre por ser los que poseen las variaciones más perceptibles en la gráfica 5; en cuanto a ChemSol S, el metal determinante para definir el tiempo de saturación fue el cobre, teniendo su pico a las 2 y 4 horas y un punto de inflexión a las 3 horas de agitación, mostrado en el gráfico 6.

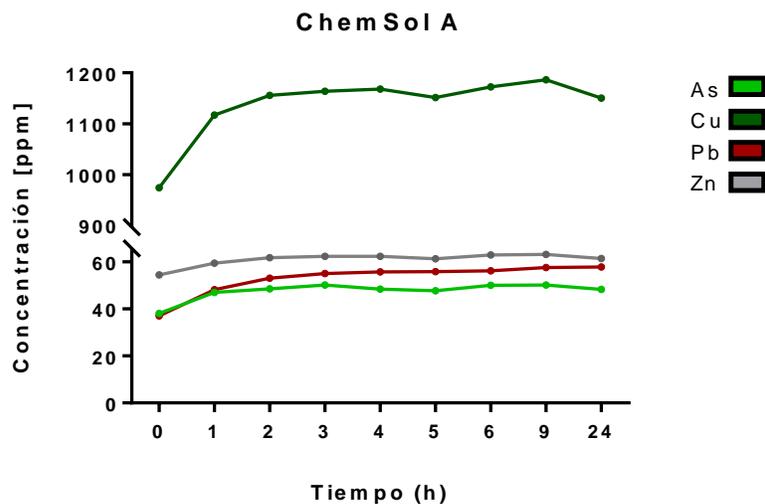


Gráfico 5. Curvas de equilibrio por saturación con ChemSol A para cada metal.

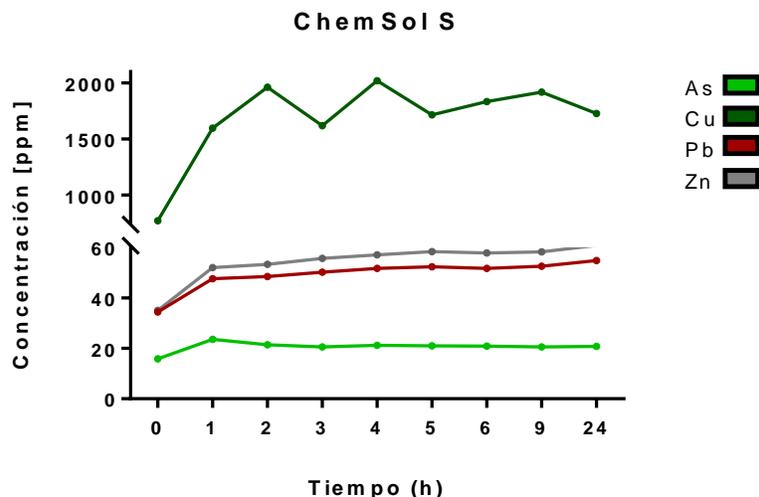


Gráfico 6. Curvas de equilibrio por saturación con ChemSol S para cada metal.

6.3 Objetivo específico III

6.3.1 Fitorremediación

Con respecto a los valores objetivo de remediación obtenidos por el análisis de riesgo se determinó que arsénico, cobre y plomo no cumplen con el valor y es necesario seguir interviniendo el suelo (tabla 14).

Tabla 14. Representación cumplimiento de Valores Objetivo de Remediación (VOR)

Metales	VOR	
	SI cumple	NO cumple
Arsenico [As]		√
Cadmio [Cd]	√	
Cromo [Cr]	√	
Cobalto [Co]	√	
Cobre [Cu]		√
Hierro [Fe]	√	
Plomo [Pb]		√
Mercurio [Hg]	√	
Molibdeno [Mo]	√	
Niquel [Ni]	√	
Zinc [Zn]	√	

En relación al análisis de producción de sideróforos por los microorganismos aislados, se obtuvo que 9 de estos producen el compuesto quelante y solo 2 no hacen, los cuales son los aislados para cobalto y cobre (figura 26).

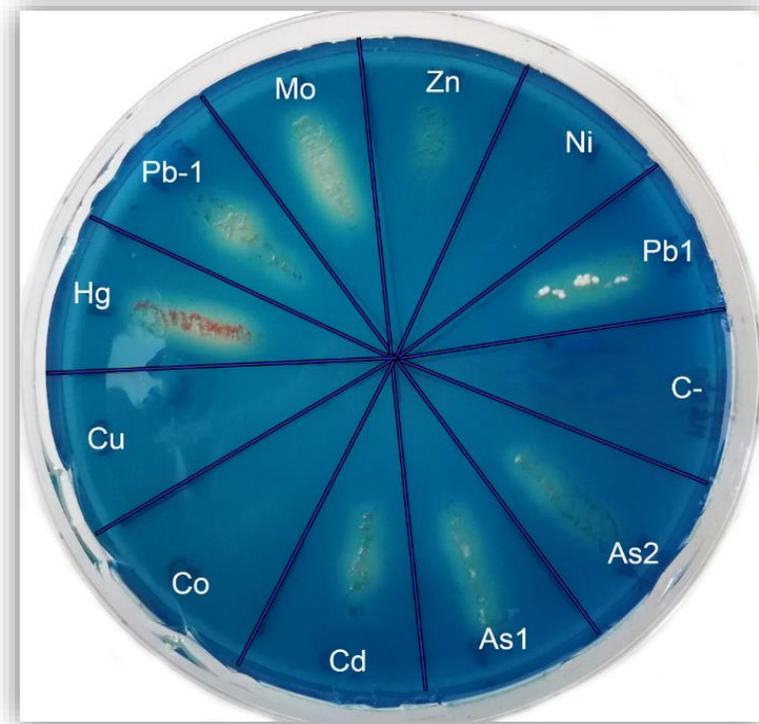


Figura 26. Bacterias productoras de sideróforos.

Se muestra en la figura 27 la realización de puesta en marcha para el proceso de fitorremediación propuesto, proceso de trasplante de las plantas arbóreas y sistema de riego.

Las plantas toleraron de muy buena forma el suelo contaminado en los 12 ensayos hasta el primer mes, luego de ello las plantas de los ensayos 3 y 4 comenzaron a decaer en su crecimiento y posteriormente una semana antes de cumplir los 2 meses perdieron todas sus hojas y se secaron, esto se muestra en la figura 28, en la cual se comparan los 4 ensayos propuestos. Es importante destacar que la presencia o no de microorganismos productores de sideróforos no provocó cambios en el crecimiento de las plantas.



Figura 27. Proceso de fitorremediación armado. Se inició con el trasplante de las plantas a las condiciones estipuladas y finalmente el mantenimiento con riego por capilaridad.



Figura 28. Crecimiento de *Acacia caven* al cabo de 72 días. A, corresponde a la condición de suelo sin tratar sin adición de microorganismos productores de sideróforos. B, corresponde a la condición de suelo sin tratar con adición de microorganismos productores de sideróforos. C, corresponde a la condición de suelo tratado sin adición de microorganismos productores de sideróforos. D, corresponde a la condición de suelo tratado con adición de microorganismos productores de sideróforos.

En la figura 29 se puede observar que la toma de muestras realizada es para una cantidad pequeña de biomasa las cuales promedian aproximadamente los 40 mg por muestra, en relación a ello es de suma importancia recalcar que la biomasa promedio de *Acacia caven* por ensayo no superó los 0.1 g de peso seco en promedio.

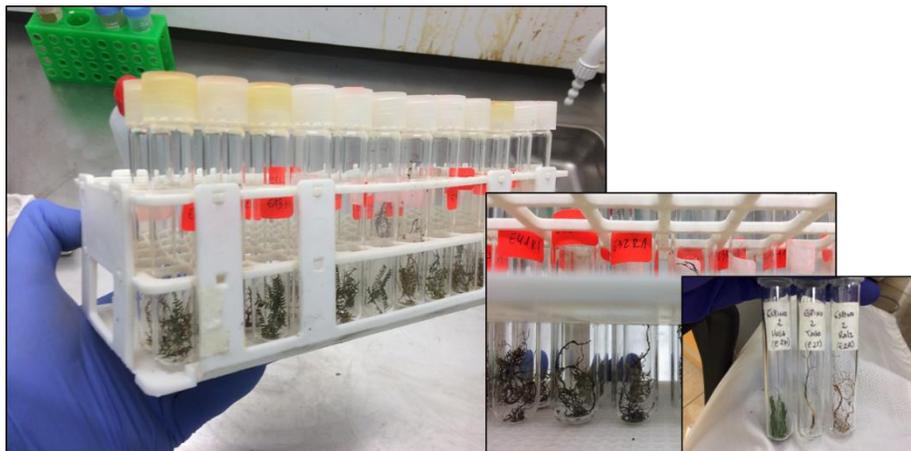


Figura 29. Representación de la toma de muestras de *Acacia caven* por cada ensayo.

Para el proceso de digestión de la biomasa vegetal con la utilización de ácido nítrico se pudo observar al cabo de 4 días un cambio en la coloración de la solución y un aclaramiento de la materia vegetal tornándose amarilla (figura 30).

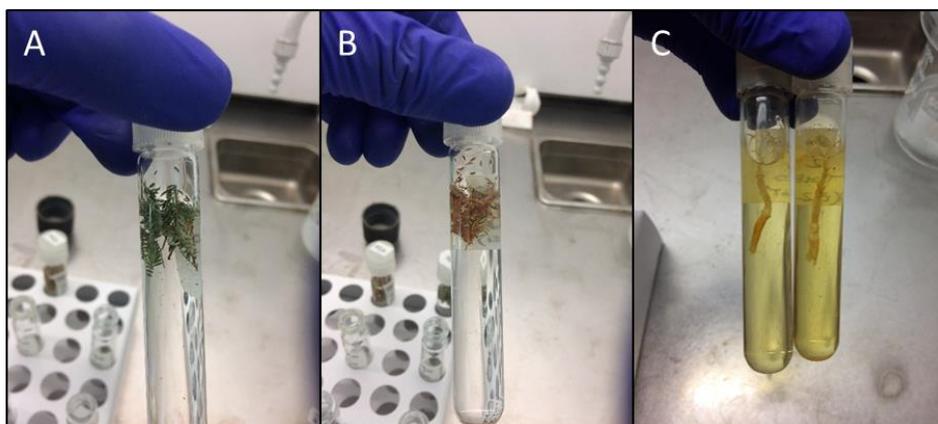


Figura 30. Proceso de digestión con ácido nítrico al 63%. A, contacto muestra con ácido en tiempo 0; B, contacto muestra con ácido a los 2 minutos; C, contacto muestra con ácido al cabo de 4 días.

En relación a los resultados arrojados por el proceso de fitorremediación es importante señalar que corresponde a un ensayo para poder observar el comportamiento de las plantas al colocarlas en contacto con el suelo contaminado. Dejando esto claro, se pudo obtener que al transcurso de 2 meses de proceso las plantas acumularon concentraciones importantes de metales, resultados los cuales se pueden observar en la figura 31 para el caso de arsénico, en la figura 32 para cobre y en la figura 33 para plomo.

De ellos se destaca que al cabo de los 2 meses existe un aumento gradual del contenido de metales principalmente en raíz, también se pudo obtener que existe translocación de metales hacia tallo y hojas, concentraciones que en general son más bajas que el contenido presentado en raíces, la mayor acumulación del metal queda en raíz (74%), luego en tallo (18%) y después en hoja (8%), es importante considerar para este efecto la baja cantidad de biomasa de las plantas.

Se resaltan las mayores acumulaciones de metal en el ensayo 3 correspondiente a suelos tratados sin la adición de microorganismos productores de sideróforos, con valores de 6800 ppm de Cu, 131 ppm de Pb y 49 ppm de As en raíz, 3760 ppm de Cu, 174 ppm de Pb y 6.5 ppm de As en tallo y finalmente 477 ppm de Cu, 28 ppm de Pb y 0.3 ppm de As en hojas.

Al llevar los resultados a porcentaje de metales extraídos desde el suelo por la planta estos no superaron el 0,02% debido a la baja biomasa vegetal utilizada en los ensayos (Datos no mostrados). Sin embargo, este resultado no es relevante en términos del diseño experimental que como se mencionó es para evaluar el comportamiento de las plantas.

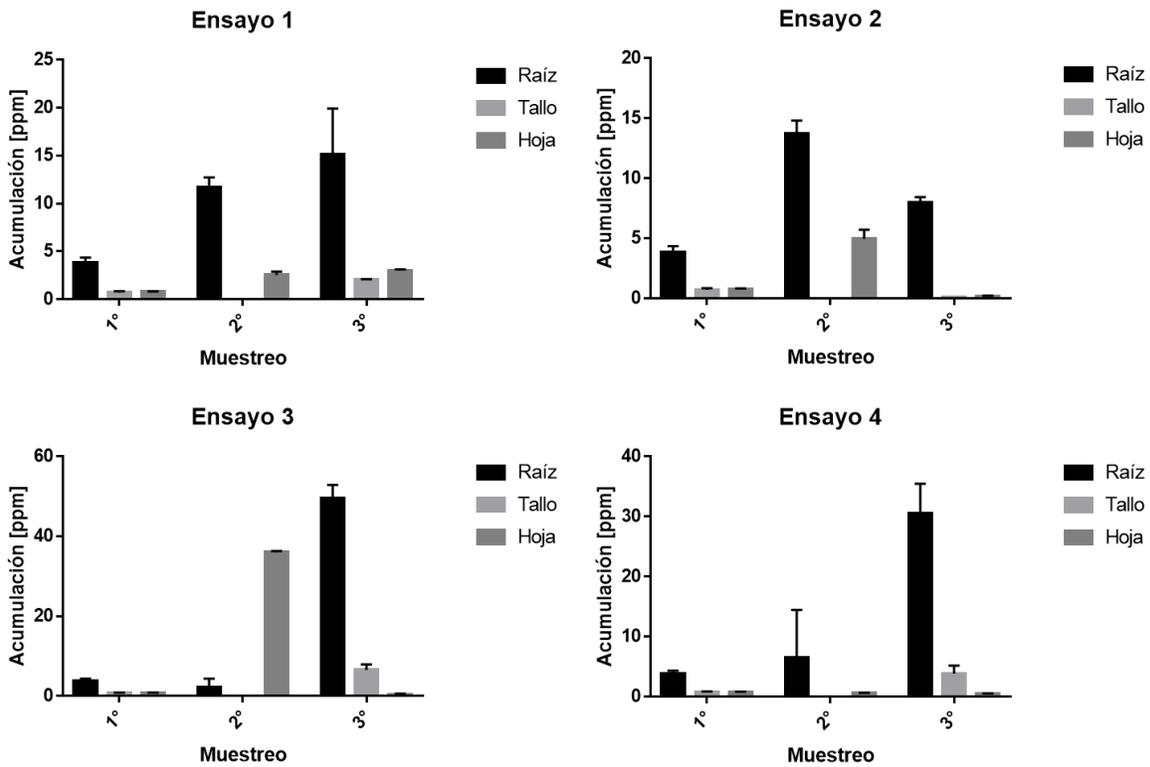


Figura 31. Acumulación de arsénico por un proceso de fitorremediación utilizando *Acacia caven*. Ensayo 1, corresponde a suelo sin tratar y sin adición de bacterias productoras de sideróforos; Ensayo 2, corresponde a suelo sin tratar con adición de bacterias; Ensayo 3, corresponde a suelo tratado por métodos fisicoquímicos y sin adición de bacterias productoras de sideróforos; Ensayo 4, corresponde a suelo tratado por métodos fisicoquímicos y con adición de bacterias.

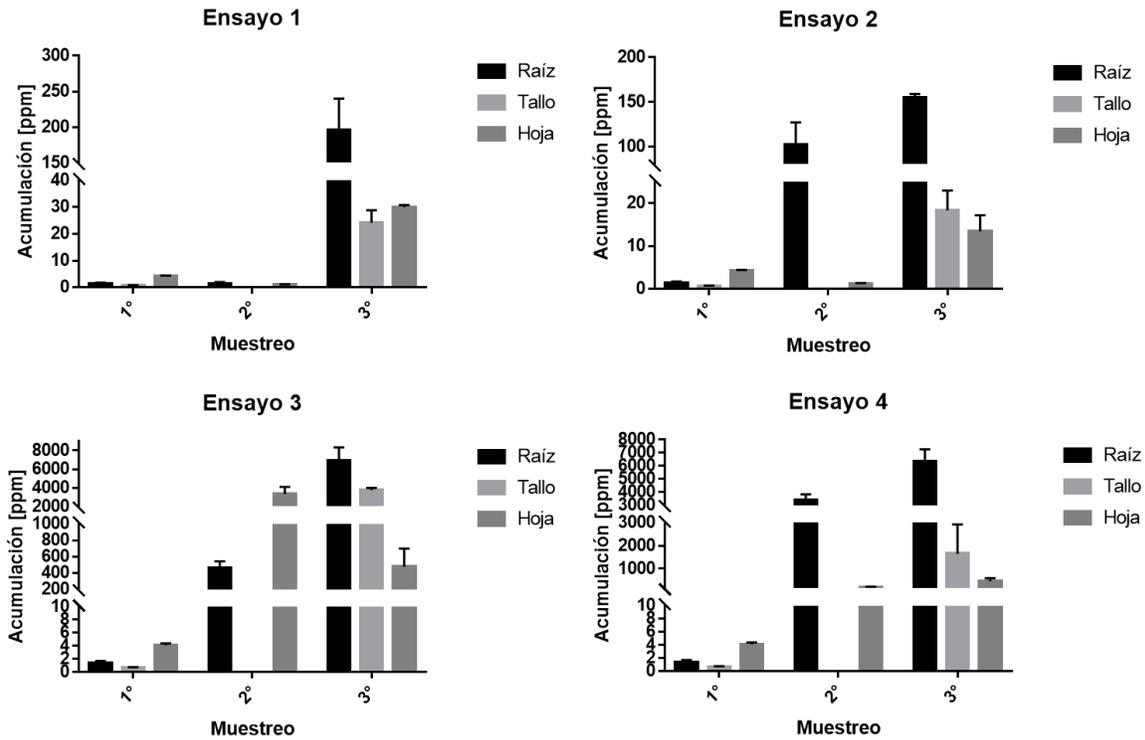


Figura 32. Acumulación de cobre por un proceso de fitorremediación utilizando *Acacia cavens*. Ensayo 1, corresponde a suelo sin tratar y sin adición de bacterias productoras de sideróforos; Ensayo 2, corresponde a suelo sin tratar con adición de bacterias; Ensayo 3, corresponde a suelo tratado por métodos fisicoquímicos y sin adición de bacterias productoras de sideróforos; Ensayo 4, corresponde a suelo tratado por métodos fisicoquímicos y con adición de bacterias.

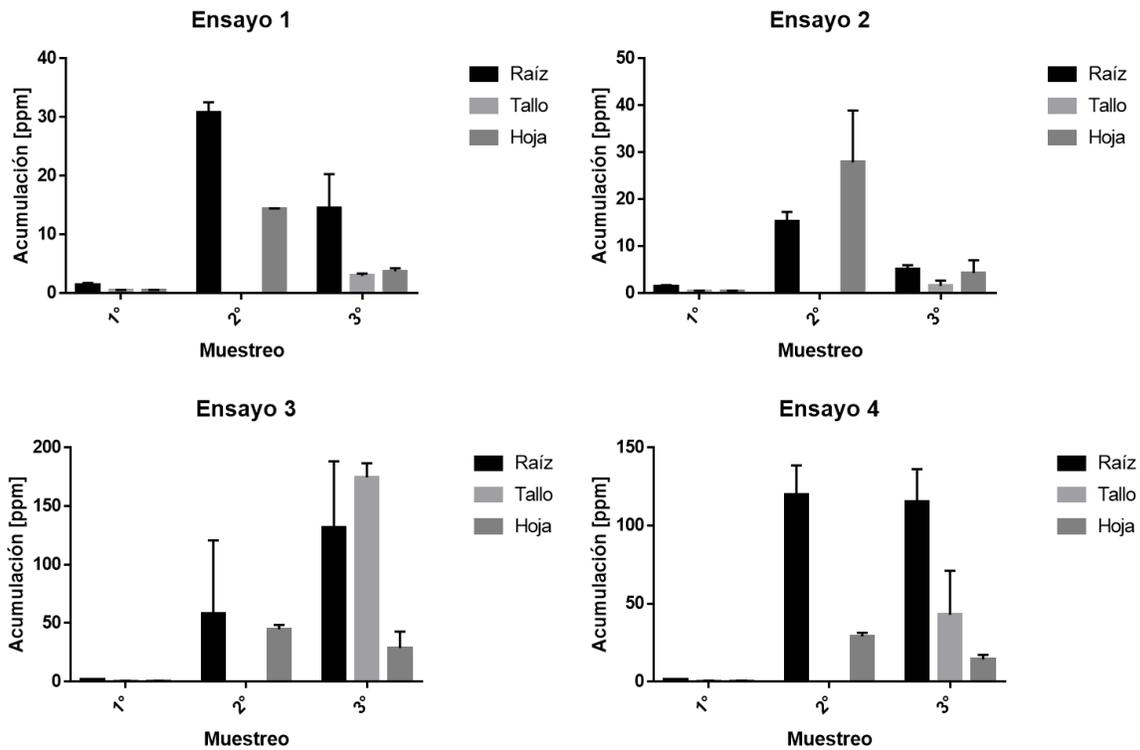


Figura 33. Acumulación de plomo por un proceso de fitorremediación utilizando *Acacia caven*. Ensayo 1, corresponde a suelo sin tratar y sin adición de bacterias productoras de sideróforos; Ensayo 2, corresponde a suelo sin tratar con adición de bacterias; Ensayo 3, corresponde a suelo tratado por métodos fisicoquímicos y sin adición de bacterias productoras de sideróforos; Ensayo 4, corresponde a suelo tratado por métodos fisicoquímicos y con adición de bacterias.

lavado de suelos tanto con ChemSol A y con ChemSol S, se perdieron 270.18 g quedando 3133 g de suelo post-tratamiento, este suelo fue inmediatamente restituido mezclándolo con las fracciones gruesas descartadas, destacando valores de metales pesados de 38.7 ppm de arsénico versus antes del tratamiento que era de 142 ppm reflejado en un 73% de remediación, así como también se destaca que el contenido de cobre bajó desde 4753 ppm a 1540 ppm traducidos a un 68% de remediación y destacando también la remediación de plomo en un 78%, demostrado por una baja desde 174 ppm a 38.8 ppm (tabla 15 y 16).

Con respecto al proceso de fitorremediación, al ser este un ensayo de evaluación preliminar no se incluyó dentro de la etapa de validación.

Tabla 15. Contenido metales pesados totales posterior a remediación fisicoquímica

Metales	Remediación [%]
As	73
Cd	74
Co	39
Cr	41
Cu	68
Fe	15
Hg	*
Mo	62
Ni	43
Pb	78
Zn	64

Tabla 16. Concentración de metales pesados. Valores obtenidos para antes y después del proceso de remediación, comparados con normas extranjeras y suelos aledaños

Metal	Normas		Concentración de metales [ppm]			
	Más restrictiva [ppm]	Menos restrictiva [ppm]	Suelo externo 1*	Suelo externo 2**	Suelo sin tratar	Suelo tratado
As	0,4 ¹	55 ³	2	6	142	37,8
Cd	0,4 ^{1,2}	12 ³	<1	<1	16,4	4,2
Co	20 ³	240 ³	54	45	9,08	5,58
Cr	30 ¹	380 ³	8	9	14,9	8,8
Cu	36 ³	190 ³	120	119	4753	1540
Fe	-	-	-	-	19050	16180
Hg	0,1 ¹	10 ³	<0,001	<0,001	0,6	-
Mo	10 ³	200 ³	2	1	10,4	4
Ni	-	-	76	76	11	6,3
Pb	40 ¹	530 ³	32	36	174	38,8
Zn	60 ¹	450 ²	61	65	234	84,7

¹ Alemania (Ley de protección de suelos BBoShG/1999) ; ² España (Real Decreto Supremo 1310/1990); ³ Holanda ; * Suelo a 5 km del foco; **Suelo a 20 km del foco.

7 Discusión

A partir del objetivo de lograr determinar una estrategia de tamizado para el suelo contaminado con el fin de clasificar las distintas fracciones del suelo y el contaminante en ellas, es fundamental mencionar que caracterizar un sitio contaminado y poder determinar todos sus parámetros es crucial al momento de enfrentar una contaminación ambiental, independientemente de qué matriz se encuentre afectada.

Bajo la premisa señalada por Evanko y Dzombak en 1997, la cual señalaba que las partículas finas de suelo menor a 63 μm de diámetro a menudo contienen la mayor cantidad de material contaminante, se corroboró tal efecto pero desde los 0,425 mm (arena fina) de diámetro hacia abajo, gracias a ello se pudo reducir considerablemente el volumen de suelo a remediar, tratando fisicoquímicamente sólo el 17% del suelo total, lo cual en términos de facilitar un proceso de remediación es un factor positivo.

Con relación a los parámetros del suelo que se midieron, estos fueron cruciales para poder determinar el posterior proceso de fitorremediación, ya que es conveniente poder manejar los valores del contenido de materia orgánica y agua, para favorecer el crecimiento de plantas arbóreas, sobre todo cuando un suelo se encuentra tan desbalanceado como el que se trabajó, lo que hace más complejo poder realizar procesos de remediación biológica.

Conocer el contenido total de metales pesados presentes en el suelo ayudó a determinar si los niveles estaban realmente por sobre las normas internacionales más estrictas existentes, para así tener un parámetro de remediación.

Dentro de la caracterización del suelo, se evaluó la presencia de microorganismos, con lo cual se encontraron 11 bacterias tolerantes al contenido de distintos metales y a concentraciones altas en comparación con los trabajos de Mena y Rafael en 2016, que lograron aislar microorganismos tolerantes a 200 ppm de Pb y Cu, además de aislar bacterias tolerantes a 150 ppm de zinc, por otro lado Pandit *et al.*, en 2013 lograron aislar bacterias que toleraron sobre los 200 ppm de Cr, Cd, Cu y Ni.

Dentro de los aislados logrados, la mayoría corresponde a *Pseudomonas* las cuales son muy comunes (Martín *et al.*, 2011) en suelo, principalmente a nivel de rizósfera debido a su capacidad de producir sideróforos y, adicionalmente, por su capacidad de producir metabolitos secundarios tales como ácido cianhídrico,

antibióticos y antifúngicos que pueden afectar directamente a otros microorganismos fitopatógenos, favoreciendo de manera indirecta el crecimiento de plantas en suelo. Por consiguiente, a pesar de que el suelo de la zona de Antofagasta es seco en algún momento debe haber existido vegetación y las comunidades microbianas presentes para ese entonces podrían haberse adaptado a los cambios climáticos, manteniéndose así las más resistentes.

Como modo de poder dilucidar en qué condiciones de movilidad y disponibilidad se encontraban los metales pesados en el suelo se realizó una extracción química secuencial de fases, experimento el cual fue propuesto y modificado por Dacera y Babel en 2006. De esto se logró determinar que muy baja cantidad de metales se encuentran disponibles por lo tanto es muy difícil que se genere algún tipo de efecto tóxico por contacto, no así si es ingerido o inhalado, independiente de ello las normativas que rigen los límites de contaminación en un suelo exigen llegar a ellos como medida de prevención y seguridad a pesar de su biodisponibilidad.

Disminuir el tamaño de muestra a remediar fue crucial en las etapas finales de la validación, ya que intervenir la menor cantidad de suelo para así no modificar de forma tan agresiva las propiedades intrínsecas de este, permite que las condiciones post remediación sean lo más cercanas posibles al suelo original, satisfaciéndose cabalmente lo propuesto para el objetivo específico I.

De la premisa de querer establecer un procedimiento de extracción de metales pesados con agentes químicos y comprobar estrategias de recuperación de soluciones de lavado.

Dentro de los primeros resultados arrojados al momento de realizar los lavados con las soluciones, fue el observar que cada una luego del contacto con el suelo adoptaba un color característico, los cuales se tornaban entre verde y azul, esto indicaría la presencia de compuestos de cobre principalmente (Beltrán, 2012), posteriormente se comprobó que la mayoría de metal extraído desde el suelo corresponde a cobre, lo cual justificaría lo anterior.

Con respecto a las extracciones se pudo apreciar que los rendimientos de extracción con ChemSol A y ChemSol S, comparados con trabajos como el de Wuana *et al.*, en 2010, el cual obtuvo rendimientos de extracción de 70% para cobre (498 ppm

iniciales) utilizando soluciones de EDTA, al cabo de 6 horas de contacto, superan su performance ya que se obtuvieron extracciones de 4000 ppm en 3 horas de contacto desde fracciones finas. Por otro lado, el trabajo de Gaber *et al.*, en 2011, el cual probó distintos tipos de ácidos a diferentes pH y concentraciones, obteniendo 86% de extracción de Cu (802 ppm) en 24 h de contacto, superó los rendimientos de extracción de Wuana, 2010, pero fueron inferiores a los de este trabajo. Por ello, ChemSol A y ChemSol S fueron seleccionados para el proceso de validación; otro punto trascendental del porqué se eligieron ambos son el pH al que esta cada uno, siendo estos de 1.9 y 8 respectivamente, lo cual para un proceso de extracción de metales es favorable debido a que dependiendo del pH al que se exponga el suelo hay más probabilidad que se liberen ciertos metales y otros no (Galán y Romero, 2008), según McBride *et al.*, en 1997 el pH del suelo sería el factor más importante que afecta la biodisponibilidad de los metales. Para poder facilitar la preparación de ChemSol A se dejó a una concentración de 0.1 M, la cual debiese quedar a pH entre 1.8 y 2, en el caso de ChemSol S se seleccionó la concentración a 0.1 M versus la 0.25 M debido a que el aumento en el porcentaje de extracción no fue lineal, aumentando en menor medida en la solución más concentrada.

En lo que se refiere a las posibles recuperaciones de cada solución de lavado elegida, en primer lugar para ChemSol A los mejores rendimientos fueron obtenidos con la utilización de perlas de quitosano, en este caso resalta bastante la extracción de un 89% de cobre desde la solución. Adicionalmente, el otro método que dio resultados interesantes fue la utilización de zeolita natural activada con HDTMA, resultado que en comparación con las otras formas de zeolita es superado con creces. Según resultados obtenidos por Bowman *et al.*, en 2000 demuestran que en el caso del plomo, la tendencia es similar a la obtenida en este trabajo y la sorción de este catión en una zeolita modificada es ligeramente mayor que en una zeolita sin modificar. El intercambio entre el surfactante y la zeolita se realiza solamente en la superficie externa del mineral; por lo tanto, la capacidad externa de intercambio catiónico de la zeolita (CEIC) determina la capacidad de intercambio de la zeolita por el surfactante (Sullivan *et al.*, 1998). Con respecto a esto se justifica que los resultados para la zeolita modificada por surfactante fuesen mejores.

También, se propuso como alternativa la reducción del volumen de ChemSol A conteniendo los metales mediante la utilización de rotavapor, para este efecto los resultados fueron muy favorables ya que se redujo en un 82% el volumen, con recuperación de agua a pH neutro. De este proceso el agua recuperada entraría nuevamente en el proceso de extracción por lotes (recircularización de agua), y la disposición del residuo de ChemSol A concentrado sería para este caso la opción más prudente a realizar.

Con relación a la recuperación de ChemSol S mediante la metodología por cambios de pH, los resultados fueron bastante buenos alcanzando un 93% de recuperación, lo cual es un punto a favor al momento de querer reincorporar soluciones o compuestos en procesos de remediación secuenciales, disminuyendo los costos del sistema.

Todo esto es fundamental de considerar ya que es necesario saber qué hacer con cada uno de los desechos generados en cada uno de los procesos, la reincorporación de materia prima a cada proceso es un factor totalmente factible y es un aspecto positivo pensando en el desarrollo de una futura tecnología, la posible reducción del volumen de ChemSol A con metales, más los metales precipitados generados de la recuperación de ChemSol S, ayudan a poder disminuir la cantidad de material a disponer y con ello poder disminuir los posibles impactos a generar en el medio ambiente.

En cuanto a las curvas de equilibrio por saturación para poder determinar el tiempo de agitación se pudo observar que la extracción en algunos casos es prácticamente instantánea y esto representado en que en los tiempos 0 ya había una concentración considerable extraída, al final metales en específico definieron la elección del tiempo de duración de contacto quedando en 3 horas, para así asegurarse de que ya no había aumento en la extracción.

Luego de la gran cantidad de pruebas realizadas y estandarizaciones hechas, se lograron determinar soluciones de lavado tales que en un proceso secuencial logran remediar el 70% aproximadamente de los contaminantes más relevantes, satisfaciéndose así lo planteado en el objetivo específico II.

Cuando se planteó el objetivo de realizar fitorremediación de metales pesados residuales, se pensaba ambiciosamente como un proceso para terminar de remediar el suelo contaminado, a lo largo del camino se logró determinar que el tiempo de realización del proceso, de un poco más de 2 meses, solo ayudaría para poder evaluar el comportamiento de las plantas en distintas condiciones y expuestas a la presencia de los metales pesados en el suelo, siendo esta un vía para poder proyectarlo como una alternativa viable.

Para el proceso de fitorremediación es valioso mencionar que para los ensayos 1 y 2 los cuales contenían suelo sin tratar se les agregó un porcentaje mayor de materia orgánica (tierra de hoja) provocando que el suelo se diluyera y los niveles de concentración de metales disminuyeran en promedio a 13 ppm de As, 188 ppm de Cu y 8 ppm de Pb.

Por otro lado es vital señalar que el contenido de tierra a colocar en las macetas no se realizó de forma independiente por cada una, sino que se mezcló todo el suelo y luego se seccionó, lo que genera variaciones en la homogeneidad del suelo y que las condiciones no sean realmente las mismas por cada maceta, y por ende provoca que los valores a caracterizar del contenido de metales sea mucho más variable, sumado a la variabilidad encontrada en los análisis de laboratorio externos, para muestras iguales los valores en ocasiones poseen diferencias mayores al 30%, ratificándose lo mencionado anteriormente acerca de las diferencias entre los suelos de cada maceta.

Enfocándose directamente en los resultados, las plantas toleraron de forma positiva los suelos contaminados hasta el mes 1, luego de ello como ya se mencionó en los resultados, las plantas de los ensayos 3 y 4 comenzaron a decaer en su crecimiento y se empezaron a secar, en relación con los resultados obtenidos en términos de concentración estas plantas contenían concentraciones muy elevadas de cobre y plomo en raíces, hojas y tallo, lo cual sin duda provocó la muerte de ellas. Según trabajos realizados con *Acacia caven* y otras especies arbóreas en depósitos de relaves mineros de la región de Coquimbo, es capaz de tolerar entre 264 a 3996 ppm de cobre, siendo catalogada como una planta metalófila, muy tolerante. Con relación a ello es considerable mencionar que las especies vegetales no sólo deben tolerar los metales presentes en altas concentraciones en los relaves, sino que también deben distribuirlos

en forma adecuada en sus tejidos. Específicamente, los metales deben ser acumulados en los tejidos subterráneos, como las raíces, sin ser translocados en forma sustancial a los tejidos aéreos, como las hojas y los tallos. O sea, deben ser plantas metalófitas excluyentes (León-Lobos et al., 2011).

Se pudo observar un aumento gradual en la acumulación de metales en raíz y tallo al cabo de los 2.4 meses de tratamiento, eso nos indica que la planta es capaz de captar los metales, acumularlos y translocarlos hacia la hoja en baja proporción, en promedio las plantas alcanzaron a acumular para los ensayos 3 y 4 sobre los 6000 ppm de cobre, que al compararlos con los ensayos 1 y 2 estos acumularon en raíz sobre los 150 ppm de cobre, concentración a la cual las plantas continuaron vivas.

Ahora dentro de las informaciones más relevantes obtenidas de este ensayo está que primero la biomasa vegetal no superó los 0.1 g de peso seco, a pesar de que se trasplantaron 3 plantas por maceta, por lo cual se deduce que la cantidad de biomasa no es la suficiente para poder realizar este tipo de experimentos, y se debe evaluar la posibilidad de utilizar plantas arbóreas de unos 40 cm de altura para obtener resultados más significativos, y también realizar estimaciones y proyecciones de cómo sería la acumulación de metales en plantas más grandes; segundo, es necesario evaluar cuál es la concentración límite que toleran las plantas ya que con base en los experimentos, estas no son capaces de sobrevivir acumulando concentraciones superiores a 6000 ppm, demostrado en la muerte de ellas al mes de exposición; tercero, con relación a las bacterias productoras de sideróforos añadidas para bioaumentar los microorganismos presentes en el suelo y favorecer la captación de los metales por las plantas y su crecimiento, este aspecto no generó variación alguna en la acumulación de metales ni en el crecimiento de ellas.

A pesar de no obtener niveles de extracción importantes comparados con la masa total de metales en el suelo, debido a lo ya expuesto, se obtuvieron altas concentraciones de acumulación en las plantas, de ello se permite proyectar la posibilidad de realizar más pruebas utilizando mayor cantidad de biomasa con el fin de seguir evaluando la capacidad acumuladora de las plantas arbóreas y así acercarse más a un posible proceso de fitorremediación, quedando abierto el objetivo específico del ensayo.

Finalmente se buscó la validación de una metodología secuencial para la extracción de metales pesados en los suelos de Antofagasta y con relación a ello se lograron tomar todos los ensayos independientes para generar la validación de una metodología experimental de remediación, se logró diseñar un proceso por lotes que involucró tanto la remediación fisicoquímica como una valiosa proyección de remediación biológica, con relación a ello para la etapa de remediación fisicoquímica se obtuvieron resultados de remediación de alrededor del 70% de los metales en promedio, lo cual para los niveles de contaminación que presentaba el suelo en un inicio, es un valioso resultado, si bien el proceso posterior de fitorremediación no fue el óptimo en términos de que la biomasa vegetal no fue la adecuada, se insiste en que se puede llevar a proyecciones en la cuales el proceso se tornaría bastante positivo y con la posibilidad de tener muy buenos resultados

Es primordial recalcar que diseñar un proceso a nivel de remediación de un suelo altamente contaminado no es menor y no existe literatura en la que se señale se haya intentado realizar algo similar. Finalmente se pudo determinar la factibilidad de realizar una metodología de remediación de este tipo satisfaciéndose así el objetivo específico IV.

8 Conclusión

Las fracciones más finas (17%), correspondientes a arena fina y limo, contienen el mayor porcentaje de As, Cu y Pb (67%).

ChemSol A a pH 1.9 y ChemSol S 0.1 M son las soluciones con la mayor capacidad de extracción de Cu (68%), As (73%) y Pb (78%).

Se puede recuperar ChemSol S para ser reincorporado al sistema, al igual que se puede reducir el volumen de ChemSol A para su disposición final con la generación de agua a ser reincorporada al proceso.

La Fitoextracción es una metodología con proyección, pero es necesario realizar más evaluaciones del comportamiento de las plantas en suelos impactados, considerando aumentar su biomasa.

Se logró la validación auspiciosa de una metodología de remediación de suelos, sentándose las bases para el desarrollo futuro de una planta móvil para pilotajes de remediación en terrenos de la industria minera.

9 Referencias

- Acevedo E. et al., 2005.** Informe, "Criterios de calidad de suelos agrícolas". Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), Págs., 174-175.
- Acosta J., 2007.** Módulo: Contaminación atmosférica, características, origen y efectos.
- Alcaíno G. 2012.** Análisis y comparación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. Tesis Universidad de Chile. Facultad de ciencias físicas y matemáticas. Departamento de ingeniería química y biotecnología. Pág.20
- Aguado-Santacruz et al., 2012.** Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 35. Pág 9.
- Alloway, B. J. 1995.** The origin of heavy metals in soils. En: Heavy Metals in Soils. Ed. Alloway B. J. Blackie Academic and Professional Publ. New York. Pág. 368
- American Chemical Society 1998.** Understanding Risk Analysis. Internet Edition.
- Anicet R. Blanch, 2010.** Biotecnología ambiental. Aplicaciones biotecnológicas en la mejora del medio ambiente. Monográfico, Universidad de Barcelona. Pág. 183.
- ASTM D4972-13. 2013.** Standard Test Method for pH of Soils, ASTM International, West Conshohocken, PA.
- ATSDR, 1999.** Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for mercury. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- ATSDR, 2004.** Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Cobalt (Draft for Public Comment). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- ATSDR, 2007.** Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Division of Toxicology and Human Health Sciences. "ToxFAQs™ sobre el plomo".
- ATSDR, 2008.** Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Cadmium (Draft for Public Comment). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

- ATSDR, 2008.** Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Chromium. (Draft for Public Comment). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Barceló L. D., 2008.** Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Fundación Nueva Cultura del Agua, Convenio Universidad de Sevilla-Ministerio de Medio Ambiente. Pág. 1.
- Basta N.T. and Tobatabai, M.A., 1992.** Effect of cropping systems on adsorption of metals by soils: II. Effect of pH. *Soil Science*, 153: 195-204.
- Basta N.T. 2004.** Heavy metal and trace element chemistry in residual-treated soil: Implications on metal bioavailability and sustainable land application. In: Sustainable land application Conference, January, Florida; University of Florida, Págs. 4-8.
- Beltrán R., 2012.** Sorprendentemente verdes: el cobre y sus pigmentos. *Revista química PUCP*, Vol 26, n°1-2. Pág. 15.
- Benedetti S. 2012.** Monografía del Espino *Acacia caven* (Mol.) Mol. Programa de Investigación de Productos Forestales no Madereros. Ministerio de agricultura. Pág. 16.
- BOE, 1990.** Real Decreto Supremo 1310/1990. Disposiciones generales. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. N° 262, Págs. 32339-32340.
- Bolognesi C., 2003.** Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 543, Págs 251-272.
- Bowman, R.S.; Sullivan E.J. y Li, Z., 2000.** Uptake of cations, anions and nonpolar organic molecules by surfactant modified clinoptilolite-rich tuff. In: *Natural Zeolites for the Third Millenium*. Colella, C. y Mumpton, F.A. (Ed.); De Frede Editore, Napoli, Italy; 287-297.
- Bowman R.S., Li Z., Roy S.J., Burt T., Johnson T.L., Johnson R.L., in: Smith J.A., Burns S. (Eds.), 2001.** Physical and Chemical Remediation of Contaminated Aquifers, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Págs. 161.
- Brion, J. y Rosso, M., 1998.** Impacto de los Sitios Contaminados. Argentina. www.ingenieroambiental.com

- Dacera D.M. y Babel S., 2006.** Use of acid for heavy metals extraction from contaminated sewage sludge for land application. *Water Science and Technology*. Vol 54. Págs. 130-133.
- Dambies L. et al., 2002.** Treatment of arsenic-containing solutions using chitosan derivatives: uptake mechanism and sorption performances. Francia. *Revista Water Research*. Págs. 3700-3707
- Dias R., 2011.** Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en clima frío y templado. Ensayo y evaluación de distintas estrategias. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata.
- Demodaran et al., 2011.** Bioremediation of soil by removing heavy metals using *Saccharomyces cerevisiae*. 2nd International Conference on Environmental Science and Technology. IPCBEE vol.6. Págs. 22-26.
- DSHS, 2012.** Texas Department of State Health Services, "Lo que usted debe saber del Molibdeno", Environmental and Injury Epidemiology & Toxicology Group.
- Durán et al., 2013.** Evaluación de la aplicación de biosólidos sobre un sustrato arcilloso y su efecto sobre la respuesta morfo-fisiológica de plantas de *Acacia caven* bajo condiciones controladas de vivero. *Revista SIMIENTE*. Vol. 83., Pág. 74.
- EA (Environmental Agency), 2009.** Reporting the Evidence: Dealing with Contaminated Land in England and Wales. A Review of Progress from 2000–2007 with Part 2A of the Environmental Protection Act. Available online: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/313964/geho0109bpha-e-e.pdf (acceso el 14 de marzo 2016).
- Elliot, H.A. and G.A. Shields. 1988.** Comparative evaluation of residual and total metal analysis in polluted soil. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, Págs. 1907-1917.
- Essien O.E., John I.A. 2010.** "Impact of crude-oil spillage pollution and chemical remediation on agricultural soil". *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 14, Págs. 147-154.
- Evanko C. y Dzombak D., 1997.** Remediation of Metals-Contaminated Soils and Groundwater. Technology Evaluation Report. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center, Pág 27.
- Evans, L.J. 1989.** Chemistry of metal retention by soils. *Environmental Science and Technology*, 23, Págs. 1046–1056.

- Faisal M. y Hasnain S., 2004.** Microbia conversion of Cr(vi) into Cr(iii) in industrial effluent. African J. Biotechnol.[online]. Págs. 610-617. Available from internet: <http://www.academicjournals.org/AJB.ISSN1684-5315>.
- Ferrer A. y Cabral R. 1993.** Collective poisoning caused by pesticides: mechanism of production, mechanism of prevention. Rev. Environ. Toxicol. 5, Págs. 161-201.
- Gaber S.E. et al., 2011.** Extraction of certain heavy metals from sewage sludge using different types of acids. Biokemistri, Vol 23. Págs. 41-48
- Galán E. y Romero A., 2008.** Contaminación de suelos por metales pesados. Departamento de cristalografía, mineralogía y química agrícola. Facultad de química. Universidad de Sevilla. Pág. 51.
- Garcia-Miragaya, J. and A.L. Page. 1976.** Influence of ionic strength and inorganic complex formation on the sorption of trace amounts of Cd by montmorillonite. Soil Science Society of America Journal, 40: 658-663.
- Giller, K., E. Witter, and S.P. Mcgrath. 1998.** Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soil: A review. Soil Biol. Biochem. Págs. 564–572.
- Ghosh M. and Singh S. P. 2005.** “A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts,” Applied Ecology and Environmental Research, vol.3, no.1, Págs. 1–18.
- Hamaki et al., 2005.** Isolation of novel Bacteria and Actinomycetes using Soil-Extract Agar Medium. Pág. 485,486.
- Hillel, D. 1998.** Environmental Soil Physics. Academic Press, San Diego, EUA
- INIA, 2006.** Métodos de análisis recomendados para los suelos de Chile. Método 3.1. Pág 17
- Irarrázabal R. et al., 2011.** Subsecretario del medio ambiente, Informe del Estado del Medio Ambiente, Segunda Edición, Santiago de Chile, Noviembre de 2012, Capítulo 2, Contaminación de suelos.
- Izdebska-Mucha D., Trzciński J., 2008.** “Effects of petroleum pollution on clay soil microstructure”. Geologija, 50, Págs. S68–S74.

- Ize I. y Zuk M., 2003.** Conceptos básicos de análisis de riesgos ambientales. Introducción al análisis de riesgos ambientales. Instituto Nacional de ecología (INE), México. Pág, 25.
- Jadia C. D. and Fulekar M. H. 2008.** “Phytotoxicity and remediation of heavy metals by fibrous root grass (sorghum),”*ISRN Ecology Journal of Applied Biosciences*, vol. 10, no. 1, Págs. 491–499.
- Jiang W. et al., 2011.** Removal of Heavy Metal from Contaminated Soil with Chelating Agents. *Open Journal of Soil Science*. Págs. 70-76
- Kang S, Lee J, Kima K. 2007.** Biosorption of Cr(III) and Cr(VI) onto the cell surface of *pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Eng J*. Págs. 54–58.
- Kumar R. et al., 2014.** Accumulation of Cu by Microalgae *Scenedesmus obliquus* and *Synechocystis* sp. PCC 6803. *IOSR Journal of Environmental Science*. Págs. 64-68.
- Lacroix, A. y F. Balduchi, 1995.** “Le traitement des nitrates de l’eau potable. Bilan économique et perspectives”, en *Techniques Sciences Méthodes*, núm. 12, París, Association Scientifique et Technique pour l’Eau et l’Environnement., Págs. 923-929.
- Lagos, M. y Ruíz, G. 2004.** Por qué una Ley de Protección de suelo?. SAG, Departamento de Protección de los Recursos Naturales Renovables – DEPROREN. Vol. I. N° 5.
- Lassat M. 2001.** The uses of plants for removal of toxic metal from contaminated soil. USEPA
- Lenz, O., 2004.** Influencia de la fábrica de las arcillas volcánicas de la ciudad de Xalapa en su comportamiento geotécnico. Universidad Politécnica de Madrid. Pág. 86.
- León-Lobos et al., 2011.** Fitoestabilización de Depósitos de Relaves en Chile Guía N° 3: Flora y Vegetación Asociadas a Relaves Mineros Abandonados. Pág.13 y 53.
- Letey J, et al., 2003.** Deficiencies in the soil quality concept and its application. *Journal of Soil and Water Conservation*, Págs. 180-187.
- Lombi E., Zhao F. J., Dunham S. J., and McGrath S. P. 2001.** “Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically

enhanced phytoextraction,” *Journal of Environmental Quality*, vol. 30, no. 6, Págs. 1919–1926.

Luque, 2005. Metabolismo del cianuro y del cianato en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. Aplicaciones biotecnológicas. Capítulo II: Materiales y Métodos. Pág. 80.

Ma, L.Q. and G. Rao. 1997. Chemical fractionation of cadmium, copper, nickel, and zinc in contaminated soils. *J. Environ. Qual.*, Págs. 259-264.

Maldonado F. et al., 2007. Las Ilustraciones de los ciclos biogeoquímicos del carbono y nitrógeno en los textos de secundaria. *Revista Eureka*. Págs. 442-460.

Mansour S., 2004. Pesticide exposure-Egyptian scene. *Toxicology* 198, Págs. 91-115.

Marchioretto et al., 2002. Heavy metals extraction from anaerobically digested sludge. *Water science and Technology*, Vol 46. Págs. 1-8.

Martín et al., 2011. Colonización de la Rizosfera por *Pseudomonas*. Departamento de biología. Facultad de ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. Pág. 7.

Material Safety Data Sheet - Molybdenum Powder. CERAC, Inc. 23 de febrero de 1994.

Material Safety Data Sheet - Molybdenum. The Rembar Company, Inc. 19 de septiembre de 2000. Consultado el 14 de noviembre de 2015.

McBride M., et al, 1997. Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *European Journal of Soil Science*. Págs. 337-346.

Mena y Rafael, 2016. Biorremediación de metales pesados con aislados microbianos procedentes de pasivos ambientales mineros y aguas del río HUALCAYOC-CAJAMARCA. Tesis para optar al título de licenciado en biología, microbiología y parasitología. Perú. Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo. Págs. 17-19.

Montero J. A. et al, 2010. Utilización de quitosana para la remoción de arsénico (As) del agua. *Superficies y Vacío* 23(S) Págs. 136-139.

Motsi T. et al., 2009. Adsorption of heavy metals from acid mine drainage by natural zeolite. *International Journal Mineral Processing*. Págs. 42-48

Motsi T., 2010. Remediation of acid mine drainage using natural zeolite. Tesis doctoral. The University of Birmingham. Págs. 53-59.

Muelas A., 2010. Manual de mecánica del suelo y cimentaciones. UNED. Pág. 5.

- Navarro A, Ramos K, Campos K, Maldonado H. 2006.** Elucidación del efecto del pH en la adsorción de metales pesados mediante biopolímeros naturales: cationes divalentes y superficies activas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Volumen 7(2). Págs. 113 -126
- Navarro-Aviño J.P., Aguilar A.I., López-Moya J.R., 2007.** Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*. Págs. 10-25.
- NIOSH Documentation for ILDHs Molybdenum.** National Institute for Occupational Safety and Health. 16 de agosto de 1994. Consultado el 14 de noviembre de 2015.
- OMS, 1990.** Plaguicidas. Informe Técnico No. 12. Organización Mundial de la Salud. Ginebra.
- Ortiz E. et al., 2005.** Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Contribución a la Educación y la Protección del Medio Ambiente*. Pág. 51-60
- Oyarzún et al., 2011.** “Minería sostenible: principios y prácticas”. Ediciones GEMM. Págs. 70 y 295.
- Özdemir S. et al., 2010.** “Cd, Cu, Ni, Mn and Zn resistance and bioaccumulation by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii* subsp. *Decanicus* and *Geobacillus thermoleovorans* subsp. *Stromboliensis*”. *World J Microbiol Biotechnol*. Págs. 155-163.
- Pagnanelli, F., Moscardini, E., Giuliano, V., Toro, L. 2004.** Sequential extraction of heavy metals in river sediments of an abandoned pyrite mining area: pollution detection and affinity series. *Environmental Pollution*, 132, pp. 189-201.
- Pandit R.J., et al., 2013.** Isolation, characterization and molecular identification of heavy metal resistant bacteria from industrial effluents, Amala-khadi- Ankleshwar, Gujarat. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCES* Volume 3, No 5. Pág. 1692.
- Pellón A. et al., 2008.** “Eliminación de cromo (III) y cadmio (II) mediante el uso de un bio-reactor utilizando *Scenedesmus obliquus* inmovilizado”. *Ingeniería hidráulica en México*. Págs. 139-150.

- Pen-Mouratov S., Shukurov N., Steinberger Y. 2008.** “Influence of industrial heavy metal pollution on soil free-living nematode population”. *Environmental Pollution*. Págs. 172-183.
- Pérez G., 2005.** Tesis Doctoral, “DISPONIBILIDAD DE METALES TÓXICOS EN SITIOS CONTAMINADOS, Aplicaciones y limitaciones de la fraccionación en la determinación de gradientes de polución”. Universitat Autònoma de Barcelona. Pág. 23.
- Pino G, de Mesquita L, Torem M, 2006.** Biosorption of heavy metals by powder of green coconut shell. *Sep Sci Technol*. Pág. 3141–3153.
- Pociecha M., 2012.** Novel EDTA and process water recycling method after soil washing of multi-metal contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*. Pág. 273–279
- Pointing, S. B. 2001. Feasibility of bioremediation by white rot fungi. *Appl. Microbiol Biotechnol*. Págs. 20-33.
- Poutou et al., 2005.** Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. Pág. 63-65.
- Pulgar M., 2009.** Minería y Medio ambiente.
- Rao et al., 2008.** “A Review of the Different Methods Applied in Environmental Geochemistry For Single and Sequential Extraction of Trace Elements in Soils and Related Materials”. *Water Air Soil Pollut*. Págs. 291-333
- Reichaman M.S. 2002.** The responses of plants to metals toxicity: A review focusing on copper, manganese and zinc. Australian Minerals and Energy Environment Foundation 54p.
- Rieuwerts J.S., Thonton I., Farago M.E and Ashmore M.R. 1998.** Factors influencing metals bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 10(2): 6175
- Rivera R. E., 2011.** Estudio de Biolixiviación de un mineral de sulfuros de cobre de baja ley con bacterias Tio- y Ferro-oxidantes en condiciones termófilas. Universidad Autónoma de México. *Revista de la Ingeniería*. Págs. 65-73
- Ros A., 2013.** Polvos de fundición de cobre [Datos bibliográficos].

- Sancha A. M., O’Ryan R., Marchetti., Ferreccio C. 1998.** Análisis de riesgo en la regulación ambiental de tóxicos: caso del arsénico en Chile. XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Lima.
- Sarabia *et al.*, 2010.** Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. Pág 67.
- Schmidt W., 2004.** Informe Técnico. Suelos contaminados con hidrocarburos: la biorremediación como una solución ecológicamente compatible, Alemania.
- Scragg A. 2006.** Environmental Biotechnology, Oxford University Press, Oxford, UK, 2nd edition.
- Serna A., 2010.** Lixiviación alcalina de polvos de hornos eléctricos. Universidad de Sonora. División de Ingeniería.
- Servicio Nacional de Geología y Minería (SERNAGEOMIN), 2011.** Base de datos con faenas mineras activas y abandonadas a octubre de 2011.
- Shazia I. *et al.*, 2013.** Bioremediation of Heavy Metals Using Isolates of Filamentous Fungus *Aspergillus fumigatus* Collected from Polluted Soil of Kasur, Pakistan. International Research Journal of Biological Sciences. Vol. 2(12), Págs 66-73.
- Shiowatana J. *et al.*, 2001.** Fractionation of Arsenic in Soil by a Continuous-Flow Sequential Extraction Method. Journal Environmental Quality, Vol 30, Pág. 1940-1949.
- Shulz B., 2003.** Introducción a la metalurgia. Departamento de ingeniería metalúrgica. Universidad de Santiago de Chile, Facultad de Ingeniería.
- Sims, J.T., and J.S. Kline. 1991.** Chemical fractionation and plant uptake of heavy metals in soils amended with co-composted sewage sludge. J. Environ. Qual. Págs. 387-395.
- Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja R. y Jain, R.K. 2003.** Phytoremediation: An Overview of Metallic Ion Decontamination From Soil. Applied Microbiology and Biotechnology. Págs. 405-412.
- Singh R. *et al.*, 2011.** “Heavy metals and living systems: An overview”. Indian Journal of Pharmacology. Págs. 246-253.
- Sposito, G. 1989.** The chemistry of soils. New York: Oxford University. Pág. 277.

- Sun H. et al., 2011.** Study on Surfactants Remediation in Heavy Metals Contaminated Soils. China University of Geosciences. Págs. 1862-1865.
- Tejada-Tovar C., Villabona-Ortiz A. y Garcés-Jaraba L., 2015.** “Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico”, *Tecnología*, vol. 18, no. 34, Págs. 109-123.
- US EPA (Environmental Protection Agency). 1993.** Standards for the Use or Disposal of Sewage Sludge (40 Code of Federal Regulations Part 503). Washington, D.C., U.S. Environmental Protection Agency.
- US EPA. 1996.** Method 3050B. Acid digestion of sediments, sludges, and soils. http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/online/3_series.htm
- US EPA. 2002.** Supplemental guidance for developing soil screening levels for superfund sites. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, D.C. <http://www.epa.gov/superfund/health/conmedia/soil/index.htm>
- USEPA. 2007.** Method 3051A. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oil. http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/online/3_series.htm.
- US EPA, 2007.** Treatment Technologies for Site Cleanup: Annual Status Report; United States Environmental Protection Agency (EPA): Washington, DC, USA.
- US EPA, 2010.** Arsenic in drinking water. <http://water.epa.gov/lawsregs/rulesregs/sdwa/arsenic/index.cfm>.
- Veeken A. y Hamelers H., 1999.** Removal of heavy metals from sewage sludge by extraction with organic acids. Department of Agricultural, Environmental and Systems Technology, Wageningen, The Netherlands. Págs. 129-136.
- Vink et al., 2017.** When soils become sediments: Large-Scale storage of soils in sandpits and lakes and the impact of reduction kinetics on heavy metals and arsenic release to groundwater. Pág 150.
- Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. 2003.** Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. World Resources Institute, Water withdrawals: percent used for agricultural purposes. Págs. 95-110.

- Wuana R.A. et al., 2010.** Removal of heavy metals from a contaminated soil using organic chelating acids. *Journal Environmental Science and Technology*. Págs. 485-496.
- Wuana R.A. and Okieimen F.E., 2011.** Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology*. Pág. 9-10.
- Yacomelo M.J., 2014.** Riesgo toxicológico en personas expuestas, a suelos y vegetales, con posibles concentraciones de metales pesados, en el sur del atlántico. Tesis Universidad Nacional de Colombia. Pág. 27, 34.
- Yagnentkovsky, 2011.** “Aplicación de técnicas de biorremediación para el tratamiento de residuos industriales con alto contenido de metales pesados”. Tesis Doctoral. Pág 2.
- Zdor, R.E. y A.J. Anderson. 1992.** Influence of root colonising bacteria on the defence responses of bean. *Plant Soil* 140: 99-107.