UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales Instituto de Agroindustria



"DINÁMICA DE SELENIO EN EL SISTEMA SUELO-PLANTA: EVALUACIÓN DE UN SISTEMA PRATENSE MODELO"

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

PAULA ANDREA CARTES INDO

TEMUCO – CHILE 2005

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales Instituto de Agroindustria



"DINÁMICA DE SELENIO EN EL SISTEMA SUELO-PLANTA: EVALUACIÓN DE UN SISTEMA PRATENSE MODELO"

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES

PAULA ANDREA CARTES INDO

TEMUCO – CHILE 2005

"DINÁMICA DE SELENIO EN EL SISTEMA SUELO-PLANTA: EVALUACIÓN DE UN SISTEMA PRATENSE MODELO"

Esta Tesis fue realizada bajo la supervisión de la Directora de Tesis, Dra. MARÍA DE LA LUZ MORA GIL, del Departamento de Ciencias Químicas y ha sido aprobada por los miembros de la comisión examinadora.

PAULA ANDREA CARTES INDO

DIRECTOR PROGRAMA DE POSTGRADO EN CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES	Dra. MARÍA DE LA LUZ MORA G		
	Dr. FERNANDO BORIE B.		
DIRECCIÓN DE POSTGRADO UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA	Dra. MARÍA CRISTINA DIEZ J.		
	Dra. CAROLINA SHENE D.		
	Dr. GERARDO GALINDO G.		
	Dr. FRANCISCO MATUS B.		



AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial a mi hija Javiera, por su paciencia, comprensión y compañía durante este largo camino.

Quisiera agradecer en forma muy especial a mi Directora de Tesis, Dra. María de la Luz Mora, por haberme dado la oportunidad realizar mi tesis doctoral junto a ella y haber contribuido de manera significativa a mi formación profesional y científica.

Al cuerpo docente del Programa de Postgrado en Ciencias de Recursos Naturales, que me entregó las herramientas necesarias para mi formación como Doctor, y en especial a la Dra. Carolina Shene que me acompañó en el desarrollo experimental de la última etapa de mi tesis e hizo muy grata mi estadía en su Laboratorio.

Al Dr. Jim Barrow de Australia que, junto a su constancia y dedicación, realizó un valioso aporte en la primera etapa de esta investigación. A la Dra. Helinä Hartikainen y su equipo de trabajo por recibirme en la Universidad de Helsinki y enseñarme las técnicas analíticas necesarias para llevar a feliz término la parte experimental de mi tesis doctoral.

No puedo dejar de agradecer al personal científico, técnico y administrativo del Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas de la Universidad de La Frontera, en forma particular a la Dra. Alejandra Jara, Dra. Yoshie Motomura, Sra. Noelia Sepúlveda, Sra. Brígida Sobarzo, Sra. Tatiana Floody, Sra. Victoria Campos, Sra. Fresia Cantero y Sra. Lorena Leal que siempre creyeron en mí y me apoyaron en los momentos difíciles.

Al Proyecto FONDECYT 1020934 por el financiamiento otorgado para el desarrollo de esta investigación y al Proyecto de la Fundación Andes 13755 C-28 por brindarme los recursos económicos para poder realizar mi pasantía de investigación en la Universidad de Helsinki, Finlandia, durante el año 2003. Finalmente, deseo agradecer a la Universidad de La Frontera por haberme otorgado las becas de arancel y mantención durante los años de mi formación en el Programa de Doctorado en Ciencias de Recursos Naturales.

RESUMEN

El selenio (Se) es un micronutriente esencial para la salud animal a bajas concentraciones, aunque puede ser tóxico a elevadas concentraciones. A pesar de que se piensa que las plantas superiores no requieren Se y que tienen una baja tolerancia a éste, hay indicaciones crecientes de que el Se actúa como un antioxidante a través de la actividad glutatión peroxidasa (GSH-Px). Además, se ha reportado que dosis crecientes de aplicación de Se mejoran su incorporación relativa hacia proteínas en las plantas.

El objetivo general de esta investigación fue estudiar el comportamiento de incorporación del Se desde el suelo a la planta bajo condiciones controladas, evaluando los principales factores que inciden en la disponibilidad del Se en el suelo y en su acumulación y asimilación un sistema pratense modelo, así como determinar el efecto del Se sobre el sistema antioxidativo de las plantas y, con ello, sobre la calidad del forraje en función de los requerimientos nutricionales del ganado.

Se evaluó la adsorción de Se en sistemas simples y binarios. De acuerdo a los resultados, la adsorción de selenito (SeO₃⁻² y HSeO₃⁻) fue más alta que la de seleniato (SeO₄⁻²), debido a la mayor afinidad del selenito por las superficies reactivas del suelo. Los modelos matemáticos de Langmuir y Freundlich indicaron que la capacidad de adsorción y la afinidad de los aniones por las superficies del suelo fue en orden decreciente: fosfato > selenito > sulfato > seleniato. Además, se observó una mayor adsorción de selenito que de seleniato como consecuencia de cambios en el pH y de la presencia de aniones competitivos (fosfato y sulfato) en solución.

En un primer experimento de invernadero se demostró que la concentración de Se foliar de *Lolium perenne* aumentó con la aplicación de selenito y seleniato al suelo. Sin embargo, la más alta concentración de Se foliar fue obtenida en las plantas tratadas con seleniato. Para ambas fuentes de Se, hubo una significativa correlación positiva entre la concentración de Se foliar y la actividad GSH-Px y la dependencia de Se de esta actividad enzimática estuvo especialmente relacionada con la forma química de Se aplicada más que con la concentración de Se en los tejidos vegetales. Además, a bajos niveles de concentración de Se foliar diminuyó

la peroxidación lipídica, alcanzando el nivel más bajo a aproximadamente 20 mg Se kg⁻¹ de materia seca y luego aumentó progresivamente sobre este nivel. Así, el Se actuó como antioxidante a baja concentración de Se foliar, mientras que concentraciones mayores a 20 mg Se kg⁻¹ de materia seca tuvieron un efecto prooxidante en los tejidos vegetales.

En un segundo experimento de invernadero, se evaluó la influencia del nivel de suministro de azufre (S) sobre la concentración de Se foliar de *Lolium perenne* y sobre el sistema antioxidativo de las plantas tratadas con selenito. Además, se investigó el efecto de la aplicación de S sobre la distribución del Se en el follaje. Los resultados indicaron que la concentración de Se foliar disminuyó a medida que aumentó dosis de aplicación de S al suelo. Además, disminuyó la actividad GSH-Px y hubo un incremento en la peroxidación lipídica por efecto de dosis crecientes de aplicación de S. Finalmente, un análisis de fraccionamiento del Se en el follaje indicó que el Se fue localizado principalmente en la fracción de Se-orgánico. La contribución relativa del Se a las fracciones de proteína soluble y aminoácidos libres disminuyó en respuesta a la aplicación de S al suelo. La disminución en actividad GSH-Px, en aporte de Se a la fracción de proteína soluble y la atenuación de algunas bandas de proteínas en un análisis de electroforesis SDS-PAGE sugieren una reducción de la capacidad antioxidante del Se como consecuencia del nivel de suministro de S a las plantas.

SUMMARY

Selenium (Se) is an essential micronutrient at low concentrations for animal nutrition, although it can be toxic in high concentrations. Even though higher plants are thought not to require Se and to have a low tolerance to it, there are increasing indications that Se acts an antioxidant through the glutathione peroxidase activity (GSH-Px). Also, it has been reported that increasing rates of Se application enhance its relative incorporation into proteins in plants.

The general objective of this research was to study the Se incorporation behavior from soil to the plant, by evaluating the main factors that affect both the Se availability in Andisols and the uptake and assimilation of Se in a model of pasture system, as well as to determine the effect of Se on the antioxidative system of the plants, and then, on the forage quality as function of the Se requirements of the cattle.

The sorption of Se in the soil was evaluated in both single and binary systems. According to the results, the adsorption of selenite (SeO_3^{-2} y $HSeO_3^{-}$) is higher than selenate (SeO_4^{-2}), because the highest selenite affinity by the soil reactive surfaces. The mathematical models of Langmuir and Freundlich indicated that the ability for sorption and the anion affinity to the soil surfaces were in decreased order: phosphate > selenite > sulfate > selenate. Furthermore, a higher adsorption of selenite than selenate was observed as consequence of both the changes in pH and the presence of competitive anions (phosphate and sulfate) in solution.

In a first greenhouse experiment it was demonstrated that Se concentration in shoots of *Lolium perenne* increased with the application of both selenite and selenate to the soil. However, the highest shoot Se concentrations were obtained in selenate-treated plants. For both Se sources, there was a significant positive correlation between the shoot Se concentration and the GSH-Px activity, and the Se-dependence of this enzymatic activity was related especially with the chemical form of applied Se rather than the Se concentration in plant tissues. Furthermore, the lipid peroxidation decreased at low levels of shoot Se concentration, reaching the lowest level at approximately 20 mg Se kg⁻¹ DW and then increased steadily above this level. Thus, Se

acted as an antioxidant at low shoot concentrations, meanwhile concentrations above 20 mg Se kg⁻¹ DW had a prooxidant effect in the vegetal tissues.

In a second greenhouse experiment, the influence of sulfur (S) supply levels on both the Se concentration in the shoots of *Lolium perenne* and the antioxidative system in plants supplied with selenite was evaluated. Furthermore, the Se distribution in the shoots as affected by the S application to the soil was investigated. The results indicated that the shoot Se concentration decreased as the rate of S application was increased. Additionally, the GSH-Px activity was decreased and the lipid peroxidation was raised by effect of increasing rates of S application. Finally, a Se fractionation analysis in the shoots indicated that Se was mainly allocated into the Se-organic fraction. The relative contribution of Se to both the protein soluble and the aminoacid fractions decreased as response to the S application to the soil. The decrease in the GSH-Px activity, the Se incorporation into the soluble protein fraction, and the attenuation of some bands of proteins in an electrophoresis SDS-PAGE analysis suggest a reduction in the antioxidative ability of Se as consequence of the S supply level to the plants.

ÍNDICE GENERAL

1 INTRODUCCION	1
1.1 Antecedentes Generales	1
1.2 Hipótesis de Trabajo	7
1.3 Objetivo General	8
1.4 Objetivos Específicos	8
2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	9
2.1 Nivel de selenio en los suelos y plantas de diferentes regiones del mundo	9
2.2 Formas químicas de selenio en el suelo y factores que afectan su disponibilidad	12
2.3 Absorción y metabolismo del selenio en las plantas	20
2.3.1 Efecto de la especie en la acumulación de Se en los tejidos vegetales	20
2.3.2 Mecanismos de absorción y factores que afectan la acumulación,	
translocación y asimilación de selenito y seleniato en especies vegetales	21
2.3.3 Selenio: Un micronutriente esencial para las plantas	26
3 MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 Estudios de la adsorción de selenio en el suelo en sistemas simples y binarios	29
3.1.1 Caracterización físico-química del suelo	29
3.1.1.1 Análisis químico del suelo en estudio	29
3.1.1.2 Determinación de la carga protónica del suelo	31
3.1.1.3 Titulaciones potenciométricas en presencia de selenito y	
seleniato	31
3.1.2 Cinética de reacción del Se en el suelo	32
3.1.3 Adsorción de Se en el suelo y adsorción de P y S en sistemas simples	32
3.1.3.1 Isotermas de adsorción de Se en función del pH del suelo	33
3.1.3.2 Estudios de adsorción de Se, P y S en sistemas simples	33
3.1.4 Estudios de competencia en sistemas binarios	35
3.1.5 Ajuste de los valores de adsorción a ecuaciones multicomponentes tipo	
Freundlich en los sistemas binarios selenito/fosfato	36

3.2 Selección de un cultivar de <i>Lolium perenne</i> para los estudios del sistema suelo-	
planta	38
3.2.1 Determinación de la concentración de Se foliar por espectrofotometría de	
absorción atómica con horno de grafito (EAA-HG)	39
3.2.2 Análisis estadístico	40
3.3 Evaluación de la dinámica de acumulación del selenio y su rol antioxidante en	
Lolium perenne según la fuente y dosis de Se aplicada. Estudio de invernadero	40
3.3.1 Producción de materia seca y análisis químicos y bioquímicos en tejidos	
vegetales	40
3.3.1.1 Determinación de la actividad GSH-Px	41
3.3.1.2 Determinación de la peroxidación lipídica	42
3.3.2 Determinación de la concentración de Se disponible en el suelo	43
3.3.3 Análisis estadístico	43
3.4 Estudio preliminar de la tecnología de aplicación del Se bajo condiciones de	
invernadero	44
3.5 Evaluación de la dinámica de incorporación del selenio y su rol antioxidante en	
Lolium perenne a distintos niveles de aplicación de azufre al suelo. Estudio de	
invernadero	45
3.5.1 Producción de materia seca y análisis químicos y bioquímicos en tejidos	
vegetales	45
3.5.1.1 Análisis de Se, P, S y N foliar	46
3.5.1.2 Determinación de la actividad GSH-Px	46
3.5.1.3 Determinación de la peroxidación lipídica	47
3.5.1.4 Fraccionamiento del Se en los tejidos vegetales	47
3.5.1.5 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida – dodecil	
sulfato de sodio (SDS-PAGE)	49
3.5.2 Análisis estadístico	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
4.1 Caracterización físico-química del suelo	51
4.1.1 Composición química y carga neta del suelo	51

4.1.2 Efecto del selenio adsorbido sobre la carga del suelo	53
4.1.3 Cinética de reacción de selenito y seleniato en el suelo	55
4.1.4 Efecto del pH sobre la adsorción de selenito y seleniato en el suelo	57
4.1.5 Estudio de la adsorción de selenito, seleniato, fosfato y sulfato en sistemas	
simples	60
4.1.6 Estudios de competencia selenito/fosfato	64
4.1.6.1 Estudio de la adsorción de selenito y fosfato en el suelo a través	
de las ecuaciones de Freundlich y Sibbesen	64
4.1.6.2 Estudio de la competencia selenito/fosfato a través de ecuaciones	
multicomponentes tipo Freundlich	67
4.1.7 Estudios de competencia seleniato/sulfato	71
4.2 Efecto de la fuente y dosis de selenio sobre la dinámica de acumulación del	
selenio y su actividad antioxidante en Lolium perenne	74
4.2.1 Selección de un cultivar de Lolium perenne para estudios de invernadero	74
4.2.2 Concentración de Se foliar y producción de materia seca	75
4.2.3. Actividad GSH-Px y peroxidación lipídica	79
4.2.4 Se disponible en el suelo y relación suelo-planta	84
4.2.5 Estudio preliminar de la tecnología de aplicación del Se bajo condiciones	
de invernadero	88
4.3 Efecto del selenio sobre la capacidad antioxidante y distribución del selenio en	
Lolium perenne bajo distintos niveles de aplicación de azufre al suelo	91
4.3.1 Producción de materia seca y concentración mineral en el follaje	92
4.3.2 Actividad antioxidante del selenio	95
4.3.3 Distribución del Se en distintas fracciones en los tejidos vegetales	97
4.4 Proyecciones del estudio	102
5 CONCLUSIONES	104
6 REFERENCIAS	106

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Modelo de dos etapas para el rol del Se en la prevención del cáncer.	3
2	Diagrama pH-pE para la especiación del Se en sistemas acuosos a concentración de Se de 1 mmol m^3 . En el diagrama, la zona achurada corresponde a los valores de pH y pE encontrados habitualmente en los suelos. $pE = Eh * 59,16^{-1}$, siendo Eh el potencial de electrodo expresado en mVolts.	14
3	Vía propuesta para la asimilación del Se en las plantas. La localización subcelular de las reacciones a paritr de SMT no ha sido confirmada. Los compuestos escritos en cursiva no han sido aún identificados. La flecha punteada indica la reacción sugerida, pero existe carencia de antecedentes que respalden esta información. Cisteína sulfóxido liasa (CS liasa) ha sido identificada sólo en los géneros <i>Allium y Brassica</i> .	23
4	Esquema general del fraccionamiento del Se en tejidos vegetales.	48
5	Curvas de titulación potenciométrica de un Andisol de la Serie Vilcún a distintas concentraciones de KCl y temperatura de 25°C.	52
6	Curvas de titulación potenciométrica del suelo en presencia y ausencia de (a) Selenito de sodio y (b) Seleniato de sodio, utilizando KCl 0,1 M como electrolito de soporte.	54
7	Cinética de reacción de (a) selenito y (b) seleniato en el suelo modelada a través de la ecuación de Elovich a una concentración de Se de 5 mM, pH 5,0 y 25°C, utilizando KCl 0,1 M como electrolito de soporte.	56
8	Efecto del pH sobre la adsorción de selenito y seleniato en el suelo a una concentración inicial de Se de 2 mM, 25°C y KCl 0,1 M.	58

9	Disminución relativa de la adsorción de selenito y seleniato en el suelo. Entre pH 4,0 y 8,0, 2mM de Se (selenito o seleniato), 25°C y KCl 0,1 M.	59
10	Isotermas de adsorción de selenito, seleniato, fosfato y sulfato a pH 5,0 , concentración aniónica entre 0 y 5 mM, 25°C y KCl 0,1 M. Ajuste al modelo de Freundlich.	61
11	Comparación de los valores experimentales y modelados de la adsorción de selenito en el suelo a través de las ecuaciones de Freundlich y Sibbesen. Valores expresados en escala logarítmica.	64
12	Adsorción de selenito en sistemas simples ajustada a un factor de afinidad relativa neta de adsorción de fosfato. Valores expresados en escala logarítmica.	66
13	Adsorción de selenito en los sistemas simples y binarios ajustada a un factor de afinidad relativa neta de adsorción de fosfato. Valores expresados en escala logarítmica.	67
14	Valores experimentales y modelados de la adsorción de (a) selenito y (b) fosfato en el suelo a través de una ecuación multicomponente tipo Freundlich de 8 parámetros.	68
15	Descripción de la adsorción de seleniato a través de la ecuación de Sibbesen a concentración de sulfato de (a) 0,5 mM, (b) 1,0 mM y (c) 2 mM. La adsorción de seleniato (eje y) fue graficada en escala logarítmica con la finalidad de destacar el efecto del sulfato a bajas razones molares seleniato/sulfato en solución.	72
16	Valores experimentales de la adsorción de sulfato en los sistemas binarios seleniato/sulfato.	73
17	Concentración de Se foliar (mg kg ⁻¹) en <i>Lolium perenne</i> cv. Aries al aplicar (a) selenito de sodio y (b) seleniato de sodio en dosis entre 0 y 10 mg Se kg ⁻¹ de suelo.	76

- Producción de materia seca de *Lolium perenne* cv. Aries y síntomas de seleniosis asociados al aplicar 10 mg Se kg⁻¹ de suelo. (a) plantas tratadas con selenito y (b) plantas tratadas con seleniato.
- Correlación de Pearson entre la producción de materia seca (g maceta⁻¹) y 79 concentración de Se foliar (mg kg⁻¹) en las plantas de *Lolium perenne* cv.

 Aries tratadas con selenito y seleniato. La concentración de Se foliar (eje x) fue graficada en escala logarítmica con la finalidad de diferenciar las respuestas al selenito y al seleniato de sodio.
- Actividad GSH-Px (nmol mg⁻¹ proteína min⁻¹) en el follaje de *Lolium* 80 *perenne* cv. Aries a tasas de aplicación de Se entre 0 y 10 mg Se kg⁻¹ suelo. (a) selenito de sodio y (b) seleniato de sodio.
- Correlación de Pearson entre la concentración de Se foliar (mg kg⁻¹) y la 83 actividad GSH-Px (nmol mg⁻¹ proteína min⁻¹) en plantas tratadas con (a) selenito de sodio y (b) seleniato de sodio.
- Relación entre la peroxidación lipídica (TBARS) y la concentración de Se foliar en plantas tratadas con selenito de sodio y seleniato de sodio.
- Se disponible en el suelo (µg kg⁻¹ suelo) al aplicar (a) selenito de sodio y 86 (b) seleniato de sodio en dosis entre 0 y 10 mg Se kg⁻¹ de suelo.
- Correlación de Pearson entre el Se disponible en el suelo (µg kg⁻¹ suelo) y la concentración de Se foliar (mg kg⁻¹) en plantas tratadas con selenito y seleniato de sodio.
- Efecto del método de aplicación de Se sobre la concentración de Se foliar en *Lolium perenne* cv. Aries, utilizando como fuentes de Se (a) selenito de sodio y (b) seleniato de sodio.
- 26 Efecto del Se sobre el sistema antioxidativo y distribución del Se en 92 *Lolium perenne* bajo distintos niveles de aplicación de S al suelo.

- Actividad GSH-Px (nmol mg⁻¹ proteína min⁻¹) en *Lolium perenne* cv. 96

 Aries a distintos niveles de aplicación de S y niveles constantes de aplicación de P (400 mg kg⁻¹) y Se (2 mg kg⁻¹) al suelo. Valores promedio de 3 repeticiones ± DE.
- Peroxidación lipídica (nmol MDA g⁻¹ PV) en *Lolium perenne* cv. Aries a g6 distintos niveles de aplicación de S y niveles constantes de aplicación de P (400 mg kg⁻¹) y Se (2 mg kg⁻¹) al suelo. Valores promedio de 3 repeticiones ± DE.
- Concentración de Se (mg kg⁻¹) en diferentes fracciones de *Lolium perenne* 97 a distintos niveles de S y niveles constantes de aplicación de P y Se al suelo. Promedio de 3 repeticiones ± DE.
- Distribución relativa de las fracciones de Se orgánico e inorgánico en *Lolium perenne* cv. Aries a distintos niveles de aplicación de S y niveles constantes de aplicación de P (400 mg kg⁻¹) y Se (2 mg kg⁻¹) al suelo. Valores promedio de 3 repeticiones ± DE.
- Distribución de la fracción de Se-orgánico soluble en *Lolium perenne* cv. 99

 Aries a distintos niveles de aplicación de S y niveles constantes de aplicación de P (400 mg kg⁻¹) y Se (2 mg kg⁻¹) al suelo. Valores promedio de 3 repeticiones ± DE.
- 32 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE de *Lolium perenne* cv. Aries a 101 distintos niveles de aplicación de S y niveles constantes de aplicación de P (400 mg kg⁻¹) y Se (2 mg kg⁻¹) al suelo.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Página
1	Concentración de Se total y Se disponible en suelos de distintas regiones del mundo.	10
2	Concentración de Se en especies forrajeras de diferentes regiones del mundo.	11
3	Análisis químico de un Andisol de la Serie Vilcún de la IX Región.	30
4	Análisis de disolución selectiva y estimación de diferentes formas de Al y Fe activas de un Andisol de la Serie Vilcún de la IX Región.	31
5	Constantes estimadas por los modelos matemáticos de Langmuir y Freundlich para la adsorción de fosfato, selenito, sulfato y seleniato en el suelo a una concentración aniónica inicial entre 0 y 5 mM, pH 5,0, 25°C y KCl 0,1 M.	63
6	Estimación de parámetros a través de la ecuación multicomponente tipo Freundlich de 8 parámetros (Modelo 3) para el sistema binario selenito/fosfato.	70
7	Concentración de Se de seis cultivares de <i>Lolium perenne</i> provenientes de la Estación Experimental Las Encinas perteneciente a la Universidad de La Frontera-Temuco.	74
8	Efecto de la peletización de semillas y de la aplicación de soluciones de selenito y seleniato de sodio sobre la producción de materia seca (g maceta ⁻¹) en <i>Lolium perenne</i> cv. Aries bajo condiciones de invernadero.	88
9	Producción de materia seca foliar y concentración mineral de Se, S, P y N en <i>Lolium perenne</i> cv. Aries a distintas dosis de aplicación de S y niveles constantes de aplicación de P (400 mg kg ⁻¹) y Se (2 mg kg ⁻¹) al suelo.	93

- Propiedades químicas del suelo Vilcún posterior al ensayo de invernadero a 94 distintas dosis de aplicación de S y niveles constantes de aplicación de P (400 mg kg⁻¹) y Se (2 mg kg⁻¹) al suelo.
- Relación entre la concentración de Se en diferentes fracciones en *Lolium* 100 *perenne* cv. Aries a distintos niveles de aplicación de S y niveles constantes de aplicación de P (400 mg kg⁻¹) y Se (2 mg kg⁻¹) al suelo.

1 INTRODUCCION

1.1 Antecedentes Generales

El selenio (Se) es un microelemento importante en los agroecosistemas debido a que es un nutriente esencial para la salud animal y humana, pero que sin embargo es tóxico a altas concentraciones. Su característica de micronutriente implica que el rango de concentración entre requerimiento y toxicidad es bastante estrecho. Al respecto, los requerimientos nutricionales de los animales varían entre 0,1 y 0,3 mg kg⁻¹ de materia seca (NRC, 1983; 2000), mientras que dietas con concentraciones entre 2 y 5 mg kg⁻¹ causan toxicidad en el ganado (Wilber, 1980; Wu et al., 1996).

En 1973 se identificó glutatión peroxidasa (GSH-Px; Ec 1.11.1.9) como la primera metaloenzima Se-dependiente importante para los animales. Esta enzima cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno en presencia de glutatión reducido y, por lo tanto, inhibe la propagación del daño celular producido por especies de radicales libres durante el metabolismo o frente a un estrés oxidativo en los tejidos animales (Flohé et al., 1973). Además, en la última década se han identificado otras Se-enzimas esenciales para los animales; éstas incluyen iodotironina deiodinasas Tipo I, II y III (Berry et al., 1991; Ramauge et al., 1996; Pallud et al., 1997), tioredoxina reductasa y varias selenioproteínas (Gladyshev et al., 1998; Birringer et al., 2002).

Niveles de Se deficientes en la dieta del ganado generan una disminución de la actividad GSH-Px y, con ello, una serie de patologías asociadas a su déficit nutricional, tales como la enfermedad del músculo blanco, miopatía cardíaca, retención de placenta, infertilidad, abortos, partos prematuros, debilidad o muerte neonatal, ovarios quísticos, retardo en la concepción, tasas de fertilización bajas, diarrea, inmunodeficiencia, degeneración testicular y mastitis (Maas, 1983; Corah e Ives, 1991; Ceballos y Wittwer, 1996).

La deficiencia de Se es comúnmente controlada a través de sumisnistros orales o inyectables, suplementación de la dieta y aplicación de fertilizantes al suelo. Desde el punto de vista del sistema suelo-planta, el contenido de Se en cultivos y forrajes establecidos en suelos ácidos Se-deficientes puede incrementarse a través de la adición de Se al suelo bajo la forma de selenito o seleniato (Yläranta, 1983a,b,c). Al respecto, Whelan y Barrow (1994) demostraron que fertilizantes en base a Se de entrega lenta son adecuados para áreas que sustentan pasturas permanentes y Whelan et al. (1994a,b) encontraron incrementos significativos en el peso vivo y producción de lana al aplicar Se-fertilizante a pasturas pastoreadas por ovinos.

El requerimiento exacto de Se para la dieta de bovinos no está claramente establecido ya que depende de la forma química del elemento, las concentraciones sanguínea y tisular preexistentes, la especie animal, el antagonismo con otros minerales y las variaciones genéticas entre individuos de la misma especie y aún raza, factores que afectan la absorción, transporte, distribución y excreción del Se como fue revisado por Wittwer (2002).

En el caso de los seres humanos, los niveles dietarios más aceptados correponden a 55 y 70 µg Se día⁻¹ para mujeres y hombres adultos, respectivamente. Birringer et al. (2002) revisaron la bioquímica del Se y las implicancias médicas de un suministro deficiente. En este contexto, se ha determinado que el Se presenta un efecto anticarcinogénico más activo en dosis supranutricionales (200 µg Se día⁻¹) y entre las hipótesis que actualmente se discuten acerca del rol protector del Se desctacan: (i) alteración del metabolismo carcinogénico, (ii) mejoramiento de la respuesta inmune, (iii) inhibición específica de enzimas, (iv) interferencia en la proliferación y regulaciones del ciclo celular, (v) inhibición de la angiogénesis, (v) inducción de apoptosis y (vii) toxicidad. Según los autores, el efecto apoptósico se debe a la autooxidación del H₂Se en presencia de GSH lo que genera producción de superóxido. Las especies de Se que presentan un potencial de generar la producción de radicales libres son metanoseleniol, selenito, dióxido de Se, Se-cistina, Se-cistamina, ácido metanoselénico y varios diselenuros sintéticos. Por su parte, las especies de Se que presentan un efecto anticarcinogénico más activo son seleniato, Se-metionina, Se-metilseleniocisteína, y trifenilselenonio. Chauhan (2003) resumió el rol del Se en la salud humana en un modelo de dos etapas (Figura 1) basado en 5 hipótesis postuladas acerca del efecto quimioprotector del

Se contra el cáncer, destacando que la quimioprevención ocurre en el rango de dosis supranutricional, debido a que en este rango el nivel de compuestos de selenol catalíticamente activos y su ciclo redox producen estrés oxidativo e inducen la apoptosis en las células cancerígenas más sensibles. Según el autor, la quimioprevención ocurriría por una sensibilidad diferencial entre las células cancerígenas y las células normales para generar compuestos de selenol que inducen la apoptosis.

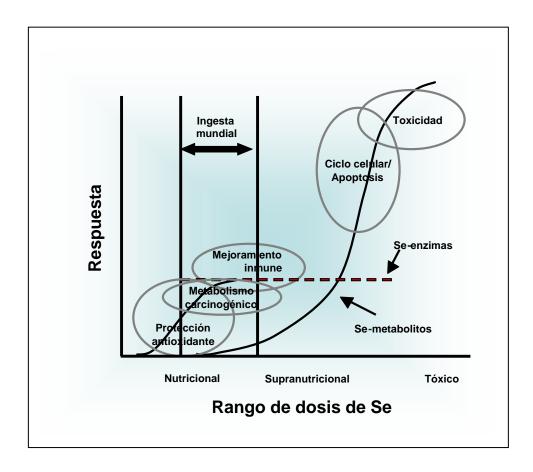


Figura 1. Modelo de dos etapas para el rol del Se en la prevención del cáncer. **Adoptado de:** Chauhan (2003).

La cantidad de Se del suelo que se encuentra potencialmente disponible para las plantas podría ser el principal factor limitante que afecta su movilidad en la cadena trófica, por lo cual resulta de gran relevancia estudiar el comportamiento de adsorción de selenito (SeO₃⁻² y HSeO₃⁻) y seleniato (SeO₄⁻²) en el suelo, los cuales constituyen las formas de Se inorgánico que son solubles en agua y móviles en los suelos. El seleniato es la especie de Se predominante en

ambientes alcalinos y oxidantes y constituye la forma de Se potencialmente más disponible para las plantas debido a que se adsorbe débilmente a las superficies minerales del suelo, mientras que el selenito es la especie de Se predominante en suelos ácidos y neutros y es escasamente móvil debido a su alto grado de adsorción en las superficies minerales y en la materia orgánica del suelo. Las diferencias en el comportamiento de adsorción de selenito y seleniato se deben a que los mecanismos que regulan la adsorción de ambos aniones son diferentes, postulándose que el selenito se une de manera específica a la superficie a través del mecanismo de intercambio de ligandos (Hayes et al., 1987; Neal et al., 1987b; Sposito et al., 1988; Zhang y Sparks, 1990a; Su y Suarez, 2000) y que el seleniato se adsorbe a través de mecanismos electrostráticos formando complejos de esfera externa (Hayes et al., 1987; Zhang y Sparks, 1990a).

El comportamiento de adsorción del Se en el suelo depende no sólo de su concentración y especiación, sino que también del pH, contenido de arcilla, óxidos de hierro, materia orgánica y la presencia de aniones competitivos en solución, los cuales afectan directamente su absorción y biodisponibilidad (Gissel-Nielsen, 2002; Neal, 1990). Con respecto a la extensión de los efectos de competencia, se ha determinado que el fosfato presenta un comportamiento de adsorción similar al selenito, disminuyendo significativamente la adsorción de selenito al formar complejos de esfera interna sobre los sitios reactivos del suelo y reducir el potencial eléctrico de la superficie (Barrow, 1992; Goh y Lim, 2004) y que el sulfato compite con el seleniato por los sitios de adsorción del suelo, debido a que ambos aniones forman complejos de esfera externa con los minerales del suelo (Goh y Lim, 2004). Por lo tanto, resulta de particular importancia para los aniones selenito y seleniato el estudio del efecto de competencia ejercido por los aniones fosfato y sulfato, más aún en el caso de los Andisoles, cuya condición natural de acidez, constitución mineralógica, contenido de materia orgánica y carga variable otorgan características propias a la interfase superficie-solución, lo que en definitiva regula la disponibilidad de macro y micronutrientes para las plantas.

Desde el punto de vista de la nutrición vegetal, el rol del Se como nutriente esencial es un hecho de controversia. Terry et al. (2000) revisaron el conocimiento acerca de las respuestas bioquímicas y fisiológicas de las plantas superiores al Se y concluyeron que no existen Se-

proteínas esenciales claramente identificadas por análisis de secuencia de proteínas o DNA en las plantas. No obstante, Hatfield et al. (1992) caracterizaron un Se-cisteil-tRNA que contiene el anticodón de UGA en Beta vulgaris y Sabeh et al. (1993) purificaron una proteína tetramérica con actividad GSH-Px desde Aloe vera. Otros estudios también confirman la presencia de proteínas que contienen Se-cisteína y la presencia de la maquinaria de síntesis de Se-cisteína en Chlamydomonas reinhardtii (Fu et al., 2002; Novoselov et al., 2002; Rao et al., 2003). Además, estudios desarrollados en Finlandia sobre Lactuca sativa y Lolium perenne han demostrado que aunque el Se es tóxico a elevadas concentraciones, puede ejercer efectos benéficos para las plantas a bajas concentraciones. Así, existen evidencias crecientes que indican que el Se ejerce un rol como antioxidante en las plantas superiores a través de un incremento en la actividad GSH-Px y una disminución de la peroxidación lipídica (Hartikainen y Xue, 1999; Hartikainen et al., 2000; Pennanen et al., 2002; Xue y Hartikainen, 2000; Xue et al., 2001) y un incremento en la utilización del Se en la síntesis proteica al suministrar Se a las plantas en dosis crecientes (Hartikainen et al., 1997; Hartikainen, 2002). Este hecho podría tener particular relevancia en el caso de los sistemas pratenses del Sur de Chile, cuya persistencia y calidad podrían incrementarse significativamente al contar con un nivel adecuado de Se disponible en el suelo.

La mayoría de las investigaciones relacionadas con la absorción y distribución del Se en los tejidos vegetales se ha centrado en el estudio de la forma química de Se. Desafortunadamente, existen muy pocos reportes acerca del antagonismo de los aniones selenito y sulfato sobre la absorción y distribución del Se en fracciones orgánicas e inorgánicas en las plantas y el efecto del azufre (S) sobre la capacidad antioxidante del Se no ha sido aún reportado.

En Chile, la deficiencia de Se ha sido descrita en rebaños lecheros afectando principalmente a vaquillas a pastoreo entre la VIII y X Región (Laporte et al., 1997; Ceballos et al., 1998). Araneda et al. (2001) y Wittwer et al. (2002), en estudios basados en el consumo de forraje de praderas naturalizadas en 12 predios lecheros, concluyeron que en la IX Región existen forrajes que presentan bajas concentraciones de Se para ser empleados en la alimentación de bovinos de lechería y cuyo consumo se asocia a una baja actividad sanguínea de GSH-Px, indicando deficiencias metabólicas de Se en los animales. A su vez, de acuerdo a la base de

datos del Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas de la Universidad de La Frontera los suelos de la IX y X Región de Chile presentan niveles deficitarios de Se, con un rango de concentración entre 0,02 y 0,18 mg Se kg⁻¹ de suelo.

Por lo tanto, el rol del Se como antioxidante en las plantas sugiere que la adición de Se al suelo puede mejorar la calidad del forraje, a través de una disminución de la senescencia y un aumento de la persistencia de las pasturas deficientes en Se. Además, si la aplicación de dosis crecientes de S al suelo afectan la dinámica de incorporación del Se en el follaje de las plantas, se puede esperar un efecto del S sobre la asimilación del Se hacia formas orgánicas e inorgánicas y, con ello, sobre la capacidad del Se como antioxidante en los tejidos vegetales.

Paralelamente, si se consigue mejorar la calidad del forraje a través de un aporte adecuado de Se a las plantas y de un manejo de la relación Se-S en el suelo, se estaría suministrando al animal una importante cantidad del Se requerido bajo formas orgánicas, las cuales presentan una mejor y más eficiente asimilación en comparación a las formas de Se inorgánico en los tejidos animales (Ceballos y Wittwer, 1996; NRC, 1983; 2000; Ortman y Pehrson, 1999; Pehrson et al., 1999; Gunter et al., 2003) incidiendo finalmente en la relación costo-beneficio de los sistemas pecuarios cuya alimentación base es la pradera.

1.2 Hipótesis de Trabajo

Considerando la mineralogía característica de los Andisoles, su carga variable y condición natural de acidez, se espera que el anión selenito sea menos disponible para las plantas que el anión seleniato a iguales tasas de aplicación, debido a que se adsorberá más fuertemente por su mayor afinidad por las superficies coloidales. Además, si se considera que en términos de adsorción, el selenito se comporta como el fosfato y que el seleniato presenta un comportamiento análogo al sulfato, se espera que la disponibilidad de selenito y seleniato dependa en gran medida del efecto competitivo ejercido por los aniones fosfato y sulfato, respectivamente, por los sitios de adsorción del suelo.

La dinámica de acumulación del Se en las plantas estará en estrecha relación con la dosis y forma química de Se suministrada, esperándose una menor concentración de Se en las plantas tratadas con selenito en relación a las plantas tratadas con seleniato. Se espera, además, que el comportamiento de incorporación del Se a los tejidos vegetales (acumulación y asimilación) esté relacionado con la disponibilidad de Se relativa a la concentración de S en el suelo.

La actividad GSH-Px podrá utilizarse como una medida indirecta de la esencialidad del Se para las plantas. Se espera un incremento de dicha actividad enzimática al aumentar la dosis de aplicación de Se y, con ello, un retardo en la senescencia de las plantas y un incremento en la calidad del forraje. Además, el nivel de aplicación de S al suelo, al incidir en la captación y asimilación del Se en los tejidos vegetales, estará directamente relacionado con el crecimiento y la calidad del forraje.

1.3 Objetivo General

El objetivo general de esta investigación fue estudiar el comportamiento de incorporación del Se desde el suelo a la planta bajo condiciones controladas, evaluando los principales factores que inciden en la disponibilidad del Se en el suelo y en su acumulación y asimilación un sistema pratense modelo, así como determinar el efecto del Se sobre el sistema antioxidativo de las plantas y, con ello, sobre la calidad del forraje en función de los requerimientos nutricionales del ganado.

1.4 Objetivos Específicos

Seleccionar un Andisol de reacción moderadamente ácida y niveles medios de P y S y evaluar el potencial de acumulación de Se en distintos cultivares de *Lolium perenne* para el estudio de la dinámica de incorporación del Se en un sistema pratense modelo.

Evaluar el efecto de la fuente de Se (selenito y seleniato) sobre la adsorción en el suelo, en función del pH a fuerza iónica y temperatura constantes.

Determinar el efecto competitivo que ejerce el fosfato sobre la adsorción de selenito y el efecto del sulfato sobre la adsorción de seleniato en el suelo a pH, fuerza iónica y temperatura constantes.

Evaluar el efecto de la fuente de Se (selenito y seleniato) y de la dosis de aplicación sobre la concentración de Se foliar en *Lolium perenne* y su incidencia en la actividad GSH-Px de las plantas.

Determinar el efecto de la aplicación de Se sobre la capacidad de acumulación de Se foliar, actividad GSH-Px y peroxidación lipídica bajo distintos niveles de aplicación de S al suelo.

Estudiar el efecto de la aplicación de Se sobre la acumulación de fracciones orgánicas e inorgánicas de Se en los tejidos vegetales a distintos niveles de aplicación de S al suelo.

2 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Nivel de selenio en los suelos y plantas de diferentes regiones del mundo

La concentración de selenio (Se) en los suelos y cultivos varía considerablemente debido a diferencias en el material parental de los suelos, condiciones climáticas y vegetación. En la mayoría de los suelos existen concentraciones de Se total entre 0,1 y 2,0 mg kg⁻¹, con un promedio de 0,2 a 0,3 mg kg⁻¹ (Fishbein, 1991; Dungan y Frankenberger, 1999) mientras que se han reportado concentraciones de Se total superiores a 1200 mg kg⁻¹ y contenidos de Se soluble en agua de 38 mg kg⁻¹ en suelos seleníferos (Lakin, 1972).

En el Tabla 1 se presentan las concentraciones de Se reportadas para suelos de diferentes zonas del mundo. En Chile, estudios desarrollados para 12 predios de la zona Sur mostraron que el contenido de Se de los suelos varió entre menos de 0,01 y 1,5 mg kg⁻¹ (Araneda et al., 2001) y de acuerdo a la base de datos del Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas de la Universidad de la Frontera, el contenido de Se fluctúa entre 0,02 y 0,18 mg kg⁻¹ en los suelos localizados en la IX y X Región de Chile.

Debido a que el contenido de Se total no es un buen indicador del contenido de Se disponible en el suelo, el contenido de Se en el forraje es considerado como el mejor indicador del nivel de Se en una región determinada. En la Tabla 2 se presentan las concentraciones de Se reportadas para distintas especies forrajeras en diferentes regiones del mundo.

Tabla 1. Concentración de Se total y Se disponible en suelos de distintas regiones del mundo.

Región	Concentración de Se (mg kg ⁻¹)	Referencia
Templada (rango)	0,01 – 4,0	a
Templada (rango común)	0,1-2,0	a
UK	0,02-2,0	a
USA	< 0,1 - 80	a,b
China	0,18 - 0,31	c
Dinamarca	0.14 - 0.52	d
Finlandia		
Suelos minerales	0.05 - 0.63	e
Suelos organogénicos	0,21 - 1,28	
India	2,5 – 69,5	d
Nueva Zelandia	0,12-0,37	d
Taiwan	0.03 - 0.23	f
Taiwan	0,53 - 0,65	g
Chile (IX y X Región)	0.02 - 0.18	h
Chile (IX Región)	< 0,01 – 1,5	i
Chile (V Región)	0,15-0,40	j

Adaptado de: ^aWhitehead (2000), ^bBerrow y Ure (1989), ^cWang et al. (2003), ^dGupta y Gupta (2000), ^eYläranta (1985), ^fHuang et al. (1987), ^gWang y Chen (2003), ^hLaboratorio de Análisis de Suelos y Plantas – Universidad de La Frontera (2005), ⁱAraneda et al. (2001), ^jDe Gregori et al. (2000).

Tabla 2. Concentración de Se en especies forrajeras de diferentes regiones del mundo.

Región	Especie	Se (mg kg ⁻¹)	Referencia
USA	Gramíneas	0,01 – 0,50	a
Finlandia	Mezclas de gramíneas	0,007 - 0,028	a
Escocia	Gramíneas, ensilaje y heno	0,041	a
UK	Gramíneas	0,013 – 0,230	a
Nueva Zelandia	Ballica – Trébol	0,005 - 0,07	a
Alberta (Canadá)	Gramínea – Leguminosa	0,002 - 2,0	a
Dinamarca	Pasturas mixtas	0,005 - 0,280	a
Finlandia	Pasturas de gramíneas Ensilaje de gramíneas Heno de gramíneas	0.01 - 1.38 0.01 - 0.96 0.009 - 0.70	b
Chile (IX y X Región)	Ballica perenne – Trébol blanco	0.01 - 0.05	c
Chile (IX Región)	Pradera naturalizada	< 0,01 - 0,08	d
Chile (V Región)	Alfalfa	0,10 – 0,37	e

Adaptado de: ^aWhitehead (2000), ^b Yläranta (1990a), ^cLaboratorio de Análisis de Suelos y Plantas – Universidad de La Frontera (2005), ^dWittwer et al. (2002), ^eDe Gregori et al. (2000).

Las concentraciones de Se en especies forrajeras generalmente varía entre 0,05 y 1,0 mg kg⁻¹, aunque en áreas asociadas con deficiencia de Se en animales la concentración puede llegar a ser inferior a 0,02 mg kg⁻¹ (Fishbein, 1991). Se han reportado concentraciones de Se tóxicas en cultivos de la región centro-oeste de USA y Canadá, en Venezuela, India y China, y las áreas con deficiencia de Se corresponden a las zonas costeras del este y oeste de Norteamérica, Venezuela, Australia, Nueva Zelandia y China. Además, se han encontrado niveles tóxicos de Se en cultivos de ciertas áreas de Gales e Irlanda en el norte de Europa; sin embargo, en

general la concentración de Se en plantas de esta región es adecuada o deficiente para la nutrición animal y humana (Gissel-Nielsen et al., 1984).

En Chile, las deficiencias de Se se concentran en la zona sur del país. Según Wittwer et al. (2002) la concentración de Se en praderas de 12 predios de la IX Región fluctuó entre menos de 0,01 y 0,08 mg kg⁻¹, con un 83% de las muestras de forraje presentando valores considerados deficientes (< 0,05 mg kg⁻¹) según los estándares de referencia empleados en Nueva Zelandia. Además, según la base de datos del Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas de la Universidad de la Frontera la concentración de Se de las praderas de la IX y X Región fluctúa entre 0,01 y 0,05 mg kg⁻¹ de materia seca.

2.2 Formas químicas de selenio en el suelo y factores que afectan su disponibilidad

En el medio ambiente, existen 4 estados de oxidación del Se (-2, 0, +4 y +6) formando una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos que difieren considerablemente en cuanto a su comportamiento.

En el suelo existen formas de Se orgánico e inorgánico y su concentración y forma química está estrechamente relacionada con el pH, potencial redox, solubilidad e interacciones biológicas (Neal et al., 1987a; Neal, 1990; Losi y Frankenberger, 1997).

La disponibilidad de Se a partir del Se orgánico se encuentra regulada por transformaciones químicas y biológicas. Las transformaciones biológicas corresponden a las reacciones biogeoquímicas que incluyen procesos de mineralización/ inmovilización, oxidación/ reducción y biometilación/demetilación microbiana (Bolan et al., 2005).

En el suelo, el Se en la forma de selenito (Se⁺⁴) y seleniato (Se⁺⁶) es reducido microbiológicamente a Se elemental (Se₀) bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas por mecanismos asimilatorios y desasimilatorios. La biometilación es considerada uno de los principales procesos en la volatilización del Se en suelos y sedimentos (Zhang et al., 1999) y representa un mecanismo potencial en la remoción del Se desde ambientes contaminados a

través de la formación de compuestos volátiles, siendo el dimetilselenuro (DMSe) el principal metabolito emitido hacia la atmósfera (Losi y Frankenberger, 1997).

En un estudio utilizando lisímetros, Dungan et al. (2000) estudiaron la volatilización del Se desde suelos tratados con selenito marcado (Se⁷⁵), recuperando el 84,5% del Se adicionado a los 135 días. En este experimento 59% y 34% del Se permaneció en los primeros 5 y 10 cm de profundidad, respectivamente, mientras que 2,7% del Se fue volatilizado.

El transporte y la transformación del DMSe en el suelo depende del contenido de humedad del suelo (Zhang et al., 1999). Los autores encontraron que las pérdidas de DMSe por volatilización fueron entre 87 y 96%, 20 y 88% y 4,3 y 16,8% en un experimento en columnas con suelo seco, suelo húmedo y suelo anegado, respectivamente.

Zhang y Frankenberger (1999) obtuvieron resultados similares al trabajar en un suelo seco y en un suelo saturado de agua, encontrando además que la aplicación de enmiendas orgánicas incrementó la producción y volatilización de DMSe. Por su parte, Stork et al. (1999) evaluaron el efecto de la aplicación de enmiendas orgánicas al suelo sobre la tasa de volatilización en 6 suelos en un estudio de 8 semanas, encontrando que zeína y L-metinonina incrementaron significativamente la volatilización del Se, con un máximo de volatilización de 43% del total de Se aplicado.

El selenito (SeO₃-² y HSeO₃-) y el seleniato (SeO₄-²) son las especies estables bajo las condiciones de pH y potencial redox que son encontrados en la mayoría de los suelos, mientras que el Se elemental y los selenuros metálicos son estables bajo condiciones fuertemente reductoras (Neal et al., 1987a). Lim y Goh (2005) realizaron un estudio batch sobre la especiación del Se en la fracción fina de un suelo ácido (< 150 μm) por un período de 220 días y encontraron que cuando se aplicó selenito de sodio el 86% del Se adicionado permaneció como Se(IV), mientras que al aplicar seleniato de sodio el 90% del Se permaneció bajo la forma de Se(VI).

En la Figura 2 se presenta un diagrama de la especiación del Se en sistema acuoso a concentración de Se de 1 mmol m⁻³ (78,96 µg L⁻¹) en función del pH y el potencial redox.

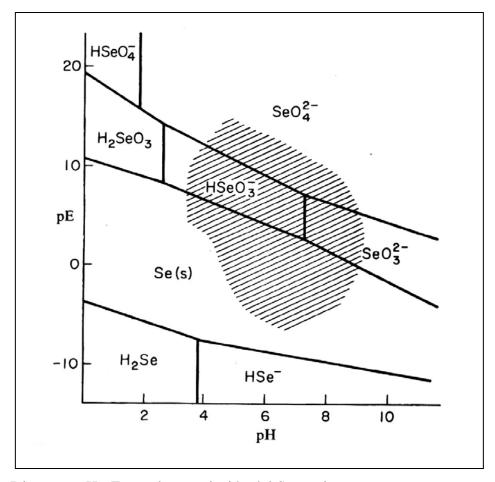


Figura 2. Diagrama pH-pE para la especiación del Se en sistemas acuosos a concentración de Se de 1 mmol m³. En el diagrama, la zona achurada corresponde a los valores de pH y pE encontrados habitualmente en los suelos. $pE = Eh * 59,16^{-1}$, siendo Eh el potencial de electrodo expresado en mVolts. **Adoptado de:** Neal et al., 1987a.

La movilidad del Se en los suelos se encuentra controlada principalmente por procesos geoquímicos de adsorción y desorción, oxidación y reducción, precipitación y complejación con otros minerales. Por lo tanto, su disponibilidad en el suelo depende del pH, de su forma química e interacción con las superficies minerales y de la presencia de aniones que compiten por los sitios de adsorción (Balistrieri y Chao, 1987; Neal et al., 1987a; Zhang y Sparks, 1990a,b; Barrow, 1992; Barrow, 1999; Su y Suarez, 2000).

Barrow y Whelan (1989a) indican que la adsorción de Se en el suelo disminuye al aumentar el pH, existiendo una disminución más marcada en el rango de pH 4 a 6 para el seleniato en comparación al selenito, debido a que la química en solución de ambos aniones difiere apreciablemente: (i) el seleniato es derivado del ácido selénico que es un ácido fuerte cuyo pK₂ es 1,7 y, por lo tanto, presenta baja afinidad por los metales que forman parte de los óxidos de la superficie del suelo y (ii) el selenito presenta un valor de pK₁ de 2,75 y pK₂ de 8,5, por lo cual el ión SeO₃⁻² es derivado de un ácido débil HSeO₃⁻ y presenta una alta afinidad por los iones metálicos de la superficie de los óxidos. Además, a valores de pH superiores a 4, el seleniato se encuentra totalmente disociado y al estar localizado en un plano de adsorción más alejado de la superficie en comparación al selenito, el efecto sobre la adsorción del cambio de potencial eléctrico por efecto del pH es, por lo tanto, pequeño.

Neal et al. (1987a) encontraron que la adsorción de selenito en el suelo disminuyó progresivamente en el rango de pH 4 a 6 en 5 suelos aluviales y que la adsorción a pH superior a 6 fue inferior a 25%, indicando que un incremento en la carga positiva de la superficie induce a un mayor intercambio de grupos hidroxilos y, por lo tanto, a una mayor adsorción de selenito a valores de pH más bajos. Además, a valores de pH menores a 6 se registraron diferencias en porcentaje de adsorción entre los suelos evaluados, lo cual estuvo en directa relación con las cantidades de Fe, Al y Mn solubilizadas desde el suelo.

Desde el punto de vista de la nutrición vegetal, el selenito y el seleniato son biodisponibles, mientras que el Se elemental y los selenuros metálicos son generalmente insolubles en el suelo. El seleniato es la especie más disponible para el crecimiento vegetal en ambientes alcalinos y oxidantes como aquellos encontrados en los suelos seleníferos semiáridos bien aireados. En estos suelos, el seleniato es muy disponible y puede producir toxicidad en las plantas y/o vegetación tóxica para el ganado (Rosenfeld y Beath, 1964). Por otra parte, el selenito es la forma de Se predominante en suelos ácidos y neutros y es escasamente móvil debido a su alto grado de adsorción en las superficies minerales y en la materia orgánica del suelo (Pezzarossa y Petruzzelli, 2001).

Ahlrich y Hossner (1987) evaluaron el comportamiento de adsorción- lixiviación de selenito y de seleniato en un estudio de lisímetros a pH entre 2 y 9, en el cual las columnas de suelo fueron lavadas con soluciones de CaCl₂ 0,01 M. En este experimento, el selenito fue completamente adsorbido en el primer cm de suelo mientras que el seleniato fue lixiviado en todo el rango de valores de pH evaluado. Yläranta (1991) encontró resultados similares al realizar un experimento en columnas con suelo arcilloso, arenoso y turba, observando que entre 0 y 2% del selenito adicionado fue lixiviado a través de 20 primeros cm de suelo, mientras que en el caso del seleniato los porcentajes de lixiviación fluctuaron entre 11,9 y 75,4%.

La concentración de Se en solución se encuentra gobernada principalmente por el complejo de adsorción del selenito con los óxidos de hierro (Balistrieri y Chao, 1987; Su y Suarez, 2000) y se ha determinado que el selenito puede estar adsorbido sobre óxidos de aluminio (Rajan, 1979), alofán (Rajan y Watkinson, 1976) y materia orgánica (Yläranta, 1985; Wang y Chen, 2003).

Nakamaru et al. (2005), estudiaron la adsorción de selenito en 7 Órdenes de suelo y determinaron que en Andisoles entre 80 y 88% del Se fue adsorbido en las fracciones de aluminio (Al) y hierro (Fe) activas del suelo. En este estudio, la proporción de Se ligada a Al y Fe fue, respectivamente, directa e inversamente proporcional al coeficiente de distribución del Se en los suelos, determinándose que la movilidad y disponibilidad del Se estuvo estrechamente relacionada con el contenido de Al activo del suelo.

Lim y Goh (2005) reportaron que la adsorción de Se en la fracción fina de un suelo ácido tratado con selenito y seleniato fue, respectivamente, 61% y 46% en relación a la cantidad de Se incialmente adicionada (25 mmol kg⁻¹). A partir de un análisis de fraccionamiento secuencial se determinó en el caso del seleniato un 60% del Se permaneció en el suelo como Se intercambiable, mientras que para el selenito sólo un 30% de la concentración inicialmente adicionada correspondió a Se intercambiable y un 60% bajo formas moderada a fuertemente adsorbidas y ligadas a la fracción residual del suelo.

Wan y Chen (2003) evaluaron las formas y distribución del Se en distintas fracciones de suelos de las principales zonas agrícolas de Taiwán, encontrando que entre un 30 y 50% del Se del suelo se encuentra ligado a los óxidos de Fe y Al y concluyeron que los óxidos y la materia orgánica asociados especialmente a la fracción de arcilla juegan un rol significativo en la adsorción de Se.

En cuanto a los mecanismos que regulan la adsorción de Se, Zhang y Sparks (1990a) realizaron un estudio cinético de la adsorción de selenito y seleniato en goetita y determinaron que el seleniato se adsorbe a través de mecanismos electrostáticos acompañado de una reacción simultánea de protonación de la superficie. A diferencia del seleniato, la adsorción de selenito generó dos tipos de complejos, XHSeO₃⁻, y XSeO₃⁻, a través del mecanismo de intercambio de ligandos. En este estudio se propuso que el proceso de adsorción de selenito consta de dos etapas: (i) la formación de complejos de esfera externa a través de atracción electrostática y (ii) la sustitución de grupos hidroxilo desde la superficie protonada con liberación de H₂O, formando un complejo de esfera interna.

Hayes et al. (1987) concluyeron que el seleniato forma un complejo débilmente ligado de esfera externa y que el selenito se une de manera específica a la superficie, formando un complejo fuertemente ligado de esfera interna. En este estudio, el selenito se adsorbió a la superficie de goetita formando complejos bidentados con dos átomos de Fe y el seleniato fue retenido en el sistema a través de su esfera de hidratación. Estos resultados se corroboran al analizar un estudio de Hingston et al. (1974) basado en la reversibilidad de la adsorción de selenito y seleniato sobre goetita y gibsita: Sólo una pequeña cantidad del selenito adsorbido sobre goetita pudo ser desorbido, mientras que la adsorción de seleniato sobre gibsita fue fácilmente reversible cuando se lavó con una solución de NaCl 0,1 M a pH constante. Sin embargo, Su y Suarez (2000) en un estudio de la adsorción de Se en óxidos de Fe amorfos y goetita encontraron que la adsorción de selenito y seleniato no fue reversible y que ambos aniones disminuyeron el punto de carga cero de los óxidos estudiados, sugiriendo la formación de complejos de esfera interna de ambos aniones a través de la formación de complejos bidentados. No obstante, los autores postularon que el selenito forma complejos más fuertes con la superficie que el seleniato, debido a que un incremento de la fuerza iónica no tuvo

efecto en la adsorción de selenito pero disminuyó la adsorción de seleniato.

Pardo y Guadalix (1994) observaron que la adsorción de selenito en dos suelos alofánicos generó la liberación de OH⁻, sulfato y silicato a la solución y un incremento en la adsorción de Na⁺, por efecto de un aumento en la carga negativa de la superficie. Rajan y Watkinson (1976) obtuvieron resultados similares al estudiar la adsorción de selenito y fosfato sobre un alofán natural. En este experimento, la adsorción de fosfato y selenito liberó a la solución sulfato, silicato y grupos OH-. Sin embargo, fosfato desplazó 3 veces más OH₂⁺ haciendo a la superficie menos positiva. Además, a las concentraciones estudiadas, la adsorción de selenito alcanzó un máximo mientras que el fosfato continuó reaccionando con la superficie, presumiblemente por un mecanismo adicional de adsorción de fosfato sobre alofán a través del desplazamiento del Si estructural de la arcilla y disrupción de polímeros de aluminio.

Se debe considerar que la movilidad, biodisponibilidad y toxicidad del Se en los suelos es afectada por la presencia de aniones competitivos en solución. En términos de competencia, la extensión de los efectos de interacción entre diversos aniones en la adsorción depende de su concentración relativa y afinidad de adsorción (Balistrieri y Chao, 1987, Sposito, 1989; Dynes y Huang, 1997, Wijnja y Schulthess, 2000, 2002).

Balistrieri y Chao (1987) realizaron un estudio de los factores que regulan la adsorción de Se sobre goetita, observando que a igual valor de pH, la adsorción de seleniato sobre goetita fue mucho más baja que la adsorción de selenito y que la secuencia de competencia con el selenito en sistemas binarios fue la siguiente: fosfato > silicato > citrato > molibdato > bicarbonato > carbonato > oxalato > fluoruro > sulfato.

Con respecto a los efectos competitivos generados por ácidos orgánicos de bajo peso molecular, Dynes y Huang (1997) reportaron que, sobre un óxido de Al amorfo a rayos x, la competitividad de los ácidos orgánicos sobre la adsorción de selenito aumentó al incrementar la concentración de ácidos en solución y que el grado de competencia por los sitios de adsorción fue más alto en las primeras 3 horas de reacción. Los resultados indicaron que la capacidad de los ácidos orgánicos para inhibir la adsorción de selenito fue en orden

decreciente: oxálico > málico > cítrico > tartárico > succínico > glicólico > aspártico > salicílico > p-hidroxibenzoico > glicina \approx fórmico \approx acético.

Wijnja y Schulthess (2002) encontraron que el carbonato promueve la adsorción de seleniato a valores de pH entre 6 y 8, con un mayor efecto a pH 6,9 y a concentración de carbonato de 0,2 mM en solución, postulando que el carbonato promueve la adsorción de seleniato al generar un mayor número de sitios para la adsorción de seleniato por efecto de los grupos superficiales protonados que coexisten con carbonato. Sin embargo, a concentraciones mayores, el carbonato compite efectivamente con el seleniato disminuyendo su adsorción sobre goetita. En este experimento, el acetato también fue capaz de promover la adsorción de seleniato en el rango de pH 6,2 a 7,2, mientras que el sulfato disminuyó significativamente la adsorción de seleniato a valores de pH inferiores a 6,5.

Neal et al. (1987b) estudiaron los efectos de la composición de la solución de suelo sobre la adsorción de selenito en el rango de pH 4 a 9 y reportaron que un incremento en la concentración de cloruro o sulfato no afectó la cantidad de selenito adsorbida en dos suelos aluviales, mientras que la adición de cantidades equimolares de selenito y fosfato al suelo generó una disminución de la adsorción de selenito del orden de 50%. Este comportamiento fue atribuido a que el selenito, al igual que el fosfato, se adsorbe específicamente en la superficie de los suelos a través del mecanismo de intercambio de ligandos.

Barrow (1992) realizó un estudio de la adsorción de selenito y fosfato en el suelo y determinó que el fosfato fue un competidor más fuerte que el selenito, con una ventaja competitiva que aumentó en el tiempo, utilizando tiempos de reacción entre 15 minutos y 30 días. La aplicación de un modelo mecanístico permitió determinar que los mecanismos involucrados en la competencia estuvieron principalmente relacionados con los cambios en el potencial eléctrico de la superficie más que con el número de sitios disponibles para la adsorción. Así, la continua difusión intraparticular del fosfato disminuyó el potencial eléctrico de la superficie, reduciendo la concentración de selenito en la superficie y su velocidad de difusión intraparticular.

Los resultados obtenidos por Goh y Lim (2004) indican que el sulfato compite con el seleniato por los sitios de adsorción en el suelo, debido a que ambos aniones forman complejos de esfera externa con los minerales del suelo, y que la adsorción de selenito no es afectada por cambios en la concentración de sulfato en solución. Por otra parte, este estudio indicó que la adsorción de selenito dismunuyó significativamente al incrementar la concentración de fosfato en solución, sugiriendo que el fosfato podría asociarse con grupos funcionales de las superficies minerales del suelo como los óxidos de hierro, formando complejos de esfera interna y reduciendo el potencial de la superficie y, con ello, inhibiendo la adsorción de Se.

Wu et al (2002) evaluaron la adsorción competitiva en los sistemas binarios molibdatoselenito y molibdato-seleniato sobre un óxido de aluminio (γ -Al₂O₃) y encontraron que al aumentar la concentración de selenito y seleniato hubo una disminución de la adsorción de molibdato, sugiriendo que un incremento en la concentración de anión competitivo aumenta su posibilidad de ocupar los sitios activos sobre la superficie de los óxidos. En este experimento, los valores del coeficiente de competitividad derivados de una ecuación multicomponente tipo Freundlich indicaron que el efecto competitivo de los aniones selenito y seleniato sobre la adsorción de molibdato fue pequeño, existiendo un mayor efecto de competencia por parte del molibdato en la adsorción de ambos aniones sobre γ -Al₂O₃.

2.3 Absorción y metabolismo del selenio en las plantas

2.3.1 Efecto de la especie en la acumulación de Se en los tejidos vegetales

Las plantas difieren en su capacidad de acumular el Se en sus tejidos. Rosenfeld y Beath (1964) clasificaron las especies vegetales en tres grupos en base a su capacidad para acumular el Se cuando crecen en suelos que contienen un nivel de Se elevado:

(i) Indicadoras de Se primarias o Acumuladoras de Se, que corresponden a aquellas plantas capaces de acumular hasta varios miles de mg Se kg⁻¹ de materia seca. A este grupo pertenecen especies de los géneros *Astragalus*, *Stanleya*, *Morinda*, *Oonopsis* y *Happlopapus*.

(ii) Indicadoras de Se secundarias o Absorbentes de Se que son especies que cuando crecen en suelos que presentan un contenido medio o bajo de Se son capaces de absorber hasta 1000 mg Se kg⁻¹. En este grupo existen especies de los géneros *Aster*, *Astragalus*, *Atriplex*, *Brassica*, *Castilleja*, *Comandra*, *Grayia*, *Grindelia*, *Gutierrezia* y *Machaeranthera*.

Las plantas indicadoras primarias y secundarias tienen un uso potencial en la fitorremediación de Se, debido a que son capaces de metabolizar el Se hacia formas metiladas como el dimetil selenuro y el dimetil diselenuro (Terry y Zayed, 1998, Terry et al., 2000, Bañuelos et al., 2005) y volatilizarlo hacia la atmósfera desde suelos y aguas.

(iii) No acumuladoras que son aquellas plantas que generalmente no toman más allá de 25 mg Se kg⁻¹. En este último grupo se incluyen los granos, forrajes y muchas malezas, cuyas especies no acumulan más de 100 mg Se kg⁻¹ cuando crecen en suelos seleníferos (Brown y Shrift, 1982) y que contienen concentraciones de Se que varían generalmente entre 0,01 y 1,0 mg kg⁻¹ cuando crecen sobre suelos no seleníferos (Marschner, 1995).

Se debe considerar que existen notables diferencias en la capacidad de acumular el Se entre distintas especies forrajeras bajo condiciones de baja disponibilidad en el suelo. Por ejemplo, Davies y Watkinson (1966) notaron que después de la adición de selenito al suelo, *Agrostis tenuis* tomó 2 a 7 veces más Se *que Trifolium repens* y NRC (1983) señala que alfalfa acumuló más Se que trébol rosado, timothy o bromo en suelos con niveles de Se moderadamente bajos.

2.3.2 Mecanismos de absorción y factores que afectan la acumulación, translocación y asimilación de selenito y seleniato en especies vegetales

La absorción de Se llevada a cabo por las plantas depende de la especie vegetal, tipo de suelo, fertilización, condiciones climáticas, naturaleza de los compuestos de Se disponible (Gissel-Nielsen et al., 1984) y la presencia de otros iones en solución (Mikkelsen et al., 1988). Además, el Se es metabolizado en las plantas por la vía de asimilación del S y su distribución y asimilación depende de la forma química y concentración de Se suministrada a las raíces y de la naturaleza y concentración de otros compuestos en solución (Terry et al., 2000).

Ellis y Salt (2003) revisaron los estudios existentes acerca de las vías propuestas para la incorporación y asimilación del Se en los tejidos vegetales, lo cual se sintetiza en la Figura 3. La asimilación del Se en las plantas superiores se inicia con la activación del seleniato por la enzima ATP sulfurilasa para formar adenosin fosfoseleniato (APSe) en el cloroplasto. En presencia de glutatión (GSH), APSe es reducido a selenito a través de la enzima adenosin 5'-fosfosulfato reductasa (APS reductasa) y luego, reducido a selenuro por glutatión (GSH). Análogamente, cuando el selenito es tomado por las plantas, reacciona con glutatión a través de una reacción no enzimática para formar selenuro.

Posteriormente, ocurriría la síntesis de Se-cisteína a partir de O-acetil serina (OAS) y selenuro catalizada por la enzima cisteína sintasa. Se postula que Se-metionina se sintetiza a partir de Se-cisteína en una reacción catalizada por la enzima metionina-sintasa.

Luego, Se-metionina puede ser metilada y convertida a dimetilselenuro (DMSe) y volatilizada. El primer paso en la biosíntesis del DMSe es la metilación de Se-metionina para formar Semetilmetionina (SeMM) en el citoplama, catalizada por la enzima metionina metil transferasa. Se piensa que la conversión de SeMM a DMSe es llevada a cabo por la enzima Semetilmetionina hidrolasa, la cual normalmente convierte S-metilmetionina a dimetilsulfuro. Alternativamente, el DMSe puede ser producido por la conversión de SeMM a dimetil-Sepropionato (DMSeP) en el cloroplasto y luego a DMSe. Existen otros compuestos de Se orgánico como metil-Se-cisteína (MSeC) que se encuentran en especies de los géneros *Brassica*, *Allium* y *Astragalus* y se ha sugerido que MSeC se produce a partir de la metilación de Se-cisteína por la enzima Se-metiltransferasa (SMT), para posteriormente convertirse en dimetildiselenuro (DMDSe) y volatilizarse.

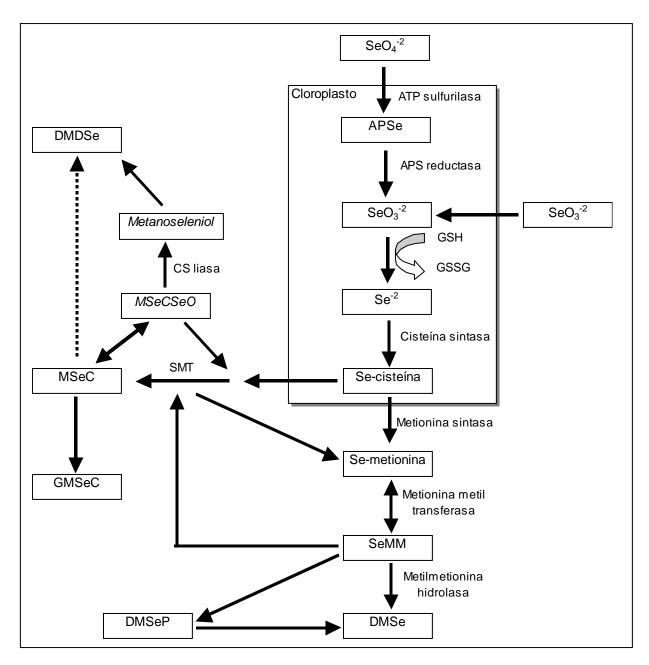


Figura 3. Vía propuesta para la asimilación del Se en las plantas. La localización subcelular de las reacciones a paritr de SMT no ha sido confirmada. Los compuestos escritos en cursiva no han sido aún identificados. La flecha punteada indica la reacción sugerida, pero existe carencia de antecedentes que respalden esta información. Cisteína sulfóxido liasa (CS liasa) ha sido identificada sólo en los géneros *Allium* y *Brassica*. **Adaptado de:** Ellis y Salt (2003).

Diferencias en cuanto a la absorción y movimiento del Se debidas a la variación en la especie química de Se suministrada se atribuyen al hecho de que las plantas captan y translocan el selenito y el seleniato por mecanismos diferentes. En efecto, se ha reportado que el seleniato se acumula en las células vegetales en contra de su gradiente de potencial electroquímico a través de un proceso de transporte activo (Brown y Shrift, 1982) y se ha propuesto que el seleniato es tomado por las plantas mediante un transportador de sulfato en la membrana plasmática radical (Arvy, 1993). La expresión de dicho transportador está regulada por el nivel de S en la planta, así como por los reguladores glutatión (GSH) y O-acetilserina, postulándose que al aumentar los niveles de O-acetilserina se incrementa la absorción de seleniato (Terry et al., 2000).

A diferencia del seleniato, no existe evidencia de que la absorción de selenito sea mediada por transportadores de membrana y se ha inferido que el mecanismo de absorción de selenito es pasivo (Brown y Shrift, 1982). Al respecto, Arvy (1993) indicaron que alrededor del 80% del Se aplicado como selenito fue absorbido pasivamente por *Phaseolus vulgaris* en un experimento con hidroxilamina, un inhibidor respiratorio y los resultados de Arvy (1989) señalaron que, a pesar de que el selenito fue absorbido principalmente en forma pasiva por las raíces de *Phaseolus vulgaris*, la aplicación de hidroxilamina generó una reducción del orden de 35% en la concentración de Se de las plantas.

Debido a que el selenito es más fuertemente adsorbido por las superficies minerales, es menos disponible para las plantas que el seleniato a igual tasa de aplicación al suelo. Sin embargo, tanto el selenito y como el seleniato son absorbidos rápidamente por las raíces de las plantas y las mayores diferencias radican en el mucho más bajo porcentaje de translocación y más bajas concentraciones de Se en las plantas tratadas con selenito en comparación a seleniato (Arvy, 1993; Banuelos y Meek, 1989; de Souza et al., 1998; Hopper y Parker, 1999; Yläranta, 1990b; Zayed et al., 1998).

Los estudios de la distribución del Se en distintas fracciones en tejidos vegetales pueden realizarse a través de procedimientos que permiten separar distintas formas de Se (Se-proteína soluble, Se-aminoácidos libres, Se-inorgánico y Se-residual) basados en la solubilidad de compuestos en agua y en el uso de cromatografía de intercambio iónico (Gissel-Nielsen et al.,

1987; Hartikainen et al., 1997; Ferry et al., 2004). Acualmente, la identificación de las especies químicas de Se presentes en los tejidos vegetales se realiza principalmente a través de espectroscopía de absorción de rayos x (XAS) y HPLC con interfase a espectroscopía de masa inductivamente acoplada a plasma (ICP-MS). Al respecto, de Souza et al. (1998) y Zayed et al. (1998) realizaron estudios de especiación del Se a través XAS en distintas especies vegetales y encontraron que en las plantas tratadas con seleniato, el Se permaneció mayoritariamente bajo la forma de seleniato en las raíces y en follaje, mientras que las plantas tratadas con selenito y Se-metionina acumularon principalmente compuestos de Se orgánico similares a Se-metionina. Además, Lin et al. (2002) en un estudio de especiación del Se con XAS en Chara canescens (una maroalga con uso potencial en fitorremediación de aguas residuales) encontraron que las plantas tratadas con selenito contenían 91% del Se bajo formas orgánicas (Se-éteres y diselenuros) en comparación con 47% de Se-orgánico en las plantas tratadas con seleniato. Por su parte, Kahakachchi et al. (2004) estudiaron la especiación del Se en Brassica juncea a través de HPLC ICP-MS encontrando resultados similares a de Souza et al. (1998), Zayed et al. (1998) y Lin et al. (2002) en raíces y follaje de plantas tratadas con selenito y seleniato.

La disponibilidad relativa del seleniato y del selenito para las plantas depende de las concentraciones de los iones sulfato y fosfato en solución (Hopper y Parker, 1999). Al respecto, se ha reportado una inhibición competitiva de la absorción y acumulación del seleniato por el sulfato (Mikkelsen et al., 1988; Mikkelsen y Wan, 1990; Yläranta, 1990b; Wu y Huang, 1991; 1992; Bell et al., 1992; Zayed y Terry, 1992; Zayed et al., 1998; Hopper y Parker, 1999). En tales experimentos, la absorción de seleniato por *Festuca arundinacea*, *Medicago sativa*, *Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*, *Trifolium repens*, *Trifolium fragiferum*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* y *Brassica oleracea*, fue significativamente reducida por un incremento en el suministro de sulfato.

De acuerdo a los antecedentes reportados en la literatura, existen muy pocos estudios sobre el antagonismo de los aniones selenito y sulfato sobre la absorción y asimilación del Se por las plantas. Asher et al. (1977) encontraron que la aplicación de S en dosis 5 veces superior a la de selenito disminuyó en 47% la concentración de Se en el xilema de plantas de tomate y Zayed

et al. (1998) demostraron que un incremento en el nivel de sulfato desde 0,25 a 10 mM en solución no produjo cambios significativos en la concentración de Se foliar, mientras que la concentración de Se radical disminuyó en 33% a la dosis de sulfato más alta en plantas de *Brassica oleracea* tratadas con selenito.

En cuanto al fosfato, su efecto antagónico con el seleniato puede ser de limitada relevancia (Khattak et al., 1991) y los resultados de Hopper y Parker (1999) indican que al aumentar los niveles de fosfato en la solución del suelo existiría una inhibición en la absorción y acumulación de selenito en *Lolium perenne* y *Trifolium fragiferum*.

2.3.3 Selenio: Un micronutriente esencial para las plantas

La esencialidad del Se para las plantas superiores es un tema de controversia y la mayoría de los reportes indican que no hay evidencia para el requerimiento de Se por las especies no acumuladoras (Terry et al., 2000). Sin embargo, a partir de la década de 1990, existen evidencias crecientes que sugieren un rol antioxidante del Se a través del incremento de la actividad glutatión peroxidasa (GSH-Px; Ec 1.11.1.9) y la disminución en la peroxidación lipídica en las plantas superiores (Hartikainen et al., 1997; Hartikainen y Xue, 1999; Hartikainen et al., 2000; Xue y Hartikainen, 2000; Xue et al., 2001; Pennanen et al., 2002; Djanaguiraman et al., 2005) y en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Yokota et al., 1988; Takeda et al., 1993).

Hartikainen et al. (2000) detectaron una promoción del crecimiento de *Lolium perenne* según la dosis de Se y edad de la planta y, además, un efecto doble del Se en el metabolismo y crecimiento de las plantas: a bajas concentraciones actuó como antioxidante, inhibiendo la peroxidación lipídica, mientras que a las concentraciones más altas se comportó como pro-oxidante, aumentando la acumulación de productos de la peroxidación lipídica. A su vez, hay evidencia que indica que el Se protege a las plantas del estrés oxidativo causado por episodios cortos de radiación UV y que puede mejorar la utilización de luz de longitud de onda corta, promoviendo el crecimiento a través de un efecto sinérgico (Hartikainen y Xue, 1999).

Pennanen et al. (2002) estudiaron el efecto del Se como antioxidante bajo condiciones severas de estrés inducidas por radiación UV y encontraron que el Se fue capaz de promover el crecimiento, pesumiblemente a través de la protección de enzimas fotosintéticas de las plantas contra el estrés oxidativo. En este estudio, el nivel de adición de Se más alto (0,05 mg Se kg⁻¹ de suelo bajo la forma de seleniato) generó un efecto tóxico en *Lactuca sativa*, el cual disminuyó por episodios de radiación UV, promoviendo el crecimiento de las plantas. Además, estudios realizados con *Solanum tuberosum* sugieren que el Se tiene una función como antioxidante o activa mecanismos de protección, los cuales pueden aliviar el estrés oxidativo en los cloroplastos (Seppänen et al., 2003).

Recientemente, Nowak et al. (2004) encontraron grandes impactos del Se sobre la actividad de enzimas oxidorreductasas en plantas de trigo. Al respecto, la concentración más baja de Se aplicada (0,05 mmol kg⁻¹ de suelo) afectó positivamente la defensa antioxidante de las plantas; sin embargo, la dosis de Se más alta generó respuestas de estrés.

Con la finalidad de estudiar la esencialidad del Se en las plantas superiores, se ha investigado si las plantas poseen Se-proteínas esenciales como las descubiertas en bacterias y animales, y existen evidencias moleculares de la presencia de la enzima GSH-Px en las plantas. Sabeh et al. (1993) purificó y caracterizó la enzima GSH-Px de plantas de *Aloe vera* y propuso que la enzima corresponde a una proteína tetramérica de 16 kD constituida por 4 subunidades idénticas que contienen un átomo de Se por subunidad, al igual que la mayoría de las GSH-Px descritas en animales.

Hatfield et al. (1992) caracterizó un Se-cisteil-tRNA de *Beta vulgaris*, el cual contiene el anticodón de UGA, como evidencia de la incorporación específica del Se hacia proteínas y Fu et al. (2002) demostraron que el codón UGA codifica Se-cisteína en la enzima GSH-Px de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Otros estudios también confirman la presencia de proteínas que contienen Se-cisteína y de la maquinaria de inserción de Se-cisteína hacia proteínas en *Chlamydomonas reinhardtii* (Novoselov et al., 2002; Rao et al., 2003) y Takeda et al. (2003) aislaron un cDNA que

codifica GSH-Px en la especie halotolerante Chlamydomonas sp. W80.

Las plantas superiores metabolizan el Se por la vía de asimilación del S (Brown y Shrift, 1982; Terry et al., 2000; Ellis y Salt, 2003). Esto implica que, además de la posible incorporación del Se hacia Se-proteínas esenciales o específicas, existe una incorporación no específica del Se hacia Se-aminoácidos y sus proteínas. En aquellas situaciones en las cuales el suministro de Se para las plantas supera su requerimiento potencial, se origina la volatilización del Se (Brown y Shrift, 1982; de Souza et al., 1998; Terry et al., 2000). Al respecto, Zayed et al. (1998) estudiaron el comportamiento de acumulación y volatilización de diferentes especies químicas de Se, determinando que la tasa de volatilización del Se de *Brassica oleracea, Brassica juncea, Beta vulgaris* y *Oryza sativa* fue mayor al suministrar Se-metionina a las plantas, seguida por el selenito y el seleniato. En este estudio, la volatilización del Se efectuada por las raíces fue 20 a 73 veces más alta al suministrar Se-metionina en comparación al selenito y 1,2 a 1,9 veces superior con el selenito que con el seleniato. A su vez, la volatilización llevada a cabo por las raíces fue entre 5 y 48 veces más alta que la registrada por el follaje de las distintas especies de plantas evaluadas.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Estudios de la adsorción de selenio en el suelo en sistemas simples y binarios

3.1.1 Caracterización físico-química del suelo

El suelo en estudio fue seleccionado considerando sus propiedades químicas (pH y concentración de P y S disponible) a partir de 4 Andisoles pertenecientes a las Series Pemehue, Vilcún, Osorno y Piedras Negras del Sur de Chile, los cuales han sido previamente caracterizados y estudiados en el Proyecto FONDECYT 1020934.

El suelo seleccionado corresponde a un Andisol de la Familia Temuco-Serie Vilcún (Medial, mesic, Entic Dystrandept), perteneciente a la IX Región en el Sur de Chile, que nunca ha sido fertilizado con Se. Previo a su caracterización, el suelo fue secado al aire y tamizado a 2 mm. El muestreo del suelo se llevó a cabo en un mismo cercado en dos años diferentes. El suelo recolectado en el primer muestreo (Mayo de 2002) fue utilizado para los estudios de la adsorción de Se en los sistemas simples y binarios. El suelo recolectado en el segundo muestreo (Octubre de 2003) fue utilizado para los estudios de la dinámica del Se en el sistema suelo-planta desarrollados bajo condiciones de invernadero.

3.1.1.1 Análisis químico del suelo en estudio

Se realizó un análisis químico del suelo en estudio en triplicado de acuerdo a la metodología descrita en Sadzawka et al. (2000), evaluándose el perfil 0 – 20 cm. Se determinó el pH al H₂O en una relación 1:2,5 de la suspensión suelo:agua. El P fue extraído con bicarbonato, utilizando el método Olsen y fue cuantificado a 880 nm por el método de Murphy y Riley (1962). El S fue extraído con una solución de Ca(H₂PO₄) (Blakemore et al., 1987) y fue determinado por turbidimetría a 440 nm según el método propuesto por Tabatabai (1982). La materia orgánica fue cuantificada por digestión húmeda según el procedimiento modificado de Walkley-Black. Los cationes básicos de intercambio (Ca, Mg, Na y K) fueron extraídos con CH₃COONH₄ 1M (pH 7) y determinados por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA). El Al de intercambio fue extraído con KCl 1M y determinado por EAA.

El Se total del suelo fue determinado de acuerdo a la metodología propuesta por EPA (1996) y cuantificado por Espectrofotometría de Absorción Atómica con Horno de grafito (EAA-HG) a una longitud de onda de 196,1 nm, utilizando D₂ como corrector de línea base.

La Tabla 3 indica las propiedades químicas del suelo Vilcún correspondiente a los dos años de muestreo (2002 y 2003) y en la Tabla 4 se presenta una caracterización de las formas de Al y Fe activas del suelo determinadas por el método de disolución selectiva (Mehlra y Jackson, 1960; Parfitt y Wilson, 1985; Blakemore et al., 1987; Parfitt y Childs, 1988) utilizando soluciones de extracción de ditionito-citrato-bicarbonato (Fe_d, Al_d), oxalato de amonio (Fe_o, Al_o, Si_o) y pirofosfato de sodio (Fe_p, Al_p) y que corresponde a la base de datos del Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas de la Universidad de La Frontera.

Tabla 3. Análisis químico de un Andisol de la Serie Vilcún de la IX Región.

Parámetro	Primer muestro (Mayo de 2002)	Segundo muestreo (Octubre de 2003)
P (mg kg ⁻¹)	14	7
S (mg kg ⁻¹)	9	9
Se total (mg kg ⁻¹)	0,68	0,68
pH (H ₂ O)	5,50	5,75
Materia Orgánica (%)	16	16
$K \text{ (cmol(+) kg}^{-1})$	0,89	0,79
Na (cmol(+) kg ⁻¹)	0,12	0,04
Ca (cmol(+) kg ⁻¹)	5,84	8,23
Mg (cmol(+) kg ⁻¹)	1,20	1,84
Al $(cmol(+) kg^{-1})$	0,25	0,20
Bases (cmol(+) kg ⁻¹)	8,04	10,90
Saturación de Al (%)	3,02	1,80

Tabla 4. Análisis de disolución selectiva y estimación de diferentes formas de Al y Fe activas de un Andisol de la Serie Vilcún de la IX Región.

Parámetro*	(%)
Al _o	1,41
Feo	0,89
Si_o	0,57
Al_d	2,30
Fe_d	5,63
Al_p	0,66
Fe_p	0,71
Alofán ^a	2,85
Ferrihidrita ^b	1,51

Adoptado de: Base de datos del Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas de la Universidad de la Frontera.

3.1.1.2 Determinación de la carga protónica del suelo

Se realizaron estudios de la carga protónica neta del suelo (Punto de Efecto Salino Cero, PESC) a partir de titulaciones potenciométricas en atmósfera de N₂, utilizando KOH 0,1 M y HCl 0,1 M como soluciones titulantes. En resumen, se mezcló 3 g de suelo con 100 mL de KCl a diferentes fuerzas iónicas (0,1 M, 0,01 M y 0,001 M). Las titulaciones fueron iniciadas al pH inicial de la muestra, previamente equilibradas 1 h, adicionando 0,2 mL de solución titulante cada 20 minutos. El PESC fue determinado a partir de un gráfico de carga superficial vs. pH a partir del punto de intersección de las tres curvas obtenidas a las diferentes fuerzas iónicas.

3.1.1.3 Titulaciones potenciométricas en presencia de selenito y seleniato

Con el objetivo de determinar el efecto del Se sobre la carga del suelo, se realizaron titulaciones potenciométricas en atmósfera inerte de N_2 y KCl 0,1 M. Las muestras de suelo (3 g) se equilibraron durante 1 hora a 25 \pm 0,1°C en presencia de selenito o seleniato a una

concentración de 2 mM. La suspensión fue titulada a partir de su pH inicial, adicionando 0,2 mL de KOH ó HCl 0,1 M cada 20 minutos.

3.1.2 Cinética de reacción del Se en el suelo

Se determinaron los tiempos de equilibrio en el proceso de adsorción de selenito y seleniato en el suelo, en el rango de 0 a 72 horas. Con esta finalidad, se pesaron muestras en duplicado de 1 g de suelo en tubos de centrífuga de 40 mL El estudio se realizó a pH 5,0, 25°C y fuerza iónica 0,1 M en KCl, en un volumen final de 20 mL. La concentración de Se estudiada fue 5 mM y los tiempos de reacción empleados fueron: 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 48 y 72 horas. Las suspensiones de suelo fueron centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos y se determinó la concentración de Se en el sobrenadante. La cantidad de Se adsorbida fue calculada a partir de la diferencia entre la cantidad final de Se en solución y la cantidad de Se inicialmente adicionada al suelo. Para cada tiempo de reacción se determinó la concentración de Se en solución por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) a una longitud de onda de 196 nm y D₂ como corrector de línea base.

La cinética de reacción de ambos aniones fue modelada a través de la ecuación de Elovich (Eq. [1]), según la cual:

$$q = (1/\beta) * \ln(\alpha\beta) + (1/\beta) * \ln(t + t_0)$$
 [1]

Donde: $q \text{ (mmol kg}^{-1}) = \text{cantidad de ión adsorbido a tiempo t (h)}$ $\alpha \text{ (mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \text{constante asociada a la velocidad inicial de adsorción}$ $\beta \text{ (mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \text{constante asocoada a la tasa de desorción}$ $t_0 = \text{constante de integración}$

3.1.3 Adsorción de Se en el suelo y adsorción de P y S en sistemas simples

Se realizaron estudios de adsorción de aniones en sistemas batch, utilizando un tiempo de reacción de 24 horas y KCl 0,1 M como electrolito de soporte.

Se evaluó la adsorción de Se (selenito y seleniato) en función del pH del suelo en el rango de pH 4,0 a 8,0 y, además, se realizaron isotermas de adsorción de Se (selenito y seleniato), P y S en función de la concentración en sistemas simples.

Los reactivos químicos empleados fueron: Na₂SeO₃ x 5H₂O (MERCK p.a.), Na₂SeO₄ (SIGMA p.a.), KH₂PO₄ (MERCK p.a.) y K₂SO₄ (MERCK p.a.).

En todos los experimentos se utilizaron tubos de centrífuga de polipropileno de capacidad de 40 mL, manteniendo una relación suelo : solución de 1 g suelo: 20 mL solución. Las suspensiones fueron colocadas en un baño termorregulado a 25 ± 0,1°C y agitadas periódicamente. Transcurridas 24 horas, las suspensiones de suelo fueron centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos y se determinó la concentración aniónica en el sobrenadante. La cantidad de anión adsorbida en el suelo fue calculada a partir de la diferencia entre la cantidad final de anión en solución y la cantidad de anión inicialmente adicionada.

3.1.3.1 Isotermas de adsorción de Se en función del pH del suelo

Se realizaron isotermas de adsorción de selenito y seleniato en el suelo a concentración de Se constante de 2 mM y variando el pH entre 4,0 y 8,0 mediante la adición de HCl ó KOH (0,1 ó 0,01 M). Los valores de pH evaluados fueron: 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 y 8,0. Transcurridas 24 horas, las suspensiones fueron centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos y se cuantificó la concentración de Se en solución por EAA a 196 nm y utilizando D₂ como corrector de línea base.

3.1.3.2 Estudios de adsorción de Se, P y S en sistemas simples

En una primera aproximación al efecto de competencia del P y del S sobre la adsorción de Se, se realizaron isotermas de adsorción de selenito, seleniato, fosfato y sulfato a pH 5,0, en forma separada en el suelo. En los experimentos con Se, las concentraciones iniciales variaron entre 0 y 5mM y para los estudios con P o S las concentraciones iniciales fluctuaron entre 0 y 10 mM. Las suspensiones de suelo fueron centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos y la concentración de Se en solución fue determinada por EAA a una longitud de onda de 196 nm, utilizando D₂ como corrector de línea base. El P fue analizado por el método de Murphy y

Riley (1962) y el S por el método turbidimétrico descrito por Sadzawka et al. (2000).

Los valores de adsorción de Se, P y S fueron ajustados a los modelos matemáticos de Langmuir (Eq. [2]) y Freundlich (Eq. [3]), determinando la afinidad y capacidad máxima de adsorción de los aniones en estudio. Además, se realizó el ajuste de los valores experimentales de adsorción de selentito a la ecuación de Sibbesen (Eq. [4]), que corresponde a una extensión de la ecuación de Freundlich en la cual el parámetro exponencial "b" varía en función de la concentración de anión en solución (Sibbesen, 1981).

Las ecuaciones de cada uno de estos modelos se presentan a continuación.

Ecuación de Langmuir:

$$x = \frac{K * x_{m} * c}{(1 + K * c)}$$
 [2]

Donde: x = Cantidad adsorbida

x_m = Capacidad de adsorción máxima

K = Constante de afinidad

c = Concentración de equilibrio de las especies en solución

Ecuación de Freundlich:

$$S = a * c^b$$
 [3]

Donde: S = Especie adsorbida

a = Cantidad adsorbida cuando la concentración en equilibrio

en solución es igual a 1

c = Concentración de equilibrio de las especies en solución

b = Constante relacionada con la intensidad de adsorción

Ecuación de Sibbesen:

$$S = a * c^b$$
 [4]

Donde: S = Especie adsorbida

a = Cantidad adsorbida cuando la concentración en equilibrio

en solución es igual a 1

c = Concentración de equilibrio de las especies en solución

 $b = b_1 * c^{b2}$, siendo b_1 y b_2 parámetros empíricos

3.1.4 Estudios de competencia en sistemas binarios

Se estudió el efecto de competencia ejercido por el fosfato sobre el selenito y el efecto de competencia ejercido por el sulfato sobre el seleniato en sistemas binarios. Se realizaron isotermas de adsorción a concentración de Se variable y concentración de anión competitivo (P o S) constante. En ambos estudios las concentraciones iniciales de Se fueron: 0, 0,05, 0,15, 0,25, 0,50, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 y 5,0 mM. Cada una de estas concentraciones fue evaluada a 0,5, 1,0 y 2,0 mM de anión competitivo (P y S para el selenito y el seleniato, respectivamente). Para ambos experimentos se pesó 1 g de suelo y se llevó a un volumen final de 20 mL. Las isotermas se realizaron a 25 ± 0.1 °C por 24 horas, ajustando el pH inicial a 5,0 y utilizando KCl 0,1 M como electrolito de soporte. Las suspensiones de suelo fueron centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos. La cantidad de anión adsorbida en el suelo fue calculada a partir de la diferencia entre la cantidad final de anión en solución y la cantidad de anión inicialmente adicionada. La concentración de Se en solución fue determinada por EAA a una longitud de onda de 196 nm y D₂ como corrector de línea base y el P fue cuantificado por el método de Murphy y Riley (1962). La concentración de S fue determinada por cromatografía iónica de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de conductividad. La fase móvil utilizada consistió en 1,5 mmol L⁻¹ de ácido p-hidrobenzoico más 10% de metanol a pH 7,8, ajustado con dietiletanolamina (DEEA).

3.1.5 Ajuste de los valores de adsorción a ecuaciones multicomponentes tipo Freundlich en los sistemas binarios selenito/fosfato

Para los sistemas binarios selenito/fosfato, se formuló ecuaciones multicomponentes tipo Freundlich a partir de la ecuación de competencia SRS, propuesta por Sheindorf et al. (1981). Utilizando la misma notación anterior, la ecuación SRS (Eq. [5]) que describe el efecto del ión "j" sobre la adsorción del ión "i" es la siguiente:

$$S_{i} = \frac{a_{i} * c_{i}}{(c_{i} + k_{i,j} * c_{j})^{1-b}}$$
 [5]

Donde: S_i = Especie "i" adsorbida

 a_i = Cantidad adsorbida de la especie "i" cuando la concentración en equilibrio en solución es igual a 1

 c_i = Concentración de equilibrio de la especie "i" en solución

b = Constante relacionada con la intensidad de adsorción

 $k_{i,j}$ = Coeficiente de competitividad de la especie "j" sobre la especie "i"

Sheindorf et al. (1981) utilizaron una aproximación gráfica para estimar los valores de los coeficientes de competencia, cuya principal desventaja es la dificultad de comprobar si en un sistema de competencia binario los coeficientes de competencia son simétricos, es decir, recíprocos. Con estos antecedentes, el Dr. Jim Barrow (Mount Claremont, Australia) creó un programa computacional especialmente formulado para evaluar los ajustes de los valores experimentales a los valores estimados, a partir de las variables experimentales (concentración aniónica inicial, concentración en equilibrio en solución y razón solución: suelo) en sistemas de adsorción de aniones en un amplio rango de concentración. El programa computacional resuelve de manera simultánea y con gran exactitud las ecuaciones de adsorción de ambos aniones en el sistema binario, evaluando el grado de ajuste de la concentración observada y la concentración estimada en solución.

Partiendo de su expresión más simple, a continuación se describen las ecuaciones testeadas para los sistemas de competencia selenito/fosfato. La significancia estadística de la inclusión de cada parámetro extra a la ecuación se testeó a través del principio de la suma extra de cuadrados (Mead y Pike, 1975).

a) Modelo 1. Sistema de ecuaciones de 6 parámetros (a_{Se}, b₁, b₂, k_{Se,P}, a_P y b_P) en el cual se incluye el parámetro Sibbesen para la descripción de la adsorción de Se y los coeficientes de competitividad del P sobre el Se y del Se sobre el P recíprocos (Ec. [6] y [7]):

$$S_{Se} = \frac{a_{Se} * c_{Se}}{(c_{Se} + k_{SeP} * c_{P})^{1-bSe}}$$
 [6]

Donde:
$$b_{Se} = b_1 c_{Se}^{b2}$$
 y

$$S_{P} = \frac{a_{P} * c_{P}}{(c_{P} + c_{Se}/k_{Se,P})^{1-bP}}$$
 [7]

b) Modelo 2. Sistema de ecuaciones de 7 parámetros (a_{Se}, b₁, b₂, k_{Se,P}, k_{P,Se}, a_P y b_P), en el cual los coeficientes de competitividad del Se sobre el P y del P sobre el Se no son recíprocos (Ec. [8] y [9]):

$$S_{Se} = \frac{a_{Se} * c_{Se}}{(c_{Se} + k_{Se,P} * c_{P})^{1-bSe}}$$
 [8]

Donde:
$$b_{Se} = b_1 c_{Se}^{b2}$$
 y

$$S_{P} = \frac{a_{P} * c_{P}}{(c_{P} + k_{P,Se} * c_{Se})^{1-bP}}$$
 [9]

c) Modelo 3. Sistema de ecuaciones de 8 parámetros (a_{Se}, m_{Se,P}, b₁, b₂, k_{Se,P}, k_{P,Se}, a_P y b_P), el cual incorpora los efectos de la adsorción del anión competitivo (fosfato) sobre el potencial de la superficie (Barrow, 1989; 1992), disminuyendo el valor del término "a_{Se}" a medida que aumenta la adsorción de fosfato en el sistema binario selenito/fosfato (Ec. [10] y [11]):

$$S_{Se} = \frac{a_{Se} * c_{Se}}{(c_{Se} + k_{Se,P} * c_{P})^{1-bSe}}$$
 [10]

Donde:
$$b_{Se} = b_1 c_{Se}^{b2}$$

$$a_{Se} = a_{Se,0} - m_{Se,P} S_P, \text{ siendo } a_{Se,0} \text{ el valor de } a_{Se} \text{ en ausencia de adsorción de P, y:}$$

$$S_{P} = \frac{a_{P} * c_{P}}{(c_{P} + k_{P,S_{e}} * c_{S_{e}})^{1-bP}}$$
 [11]

3.2 Selección de un cultivar de Lolium perenne para los estudios del sistema suelo-planta

Durante el mes de Mayo de 2003 se determinó la concentración de Se foliar de 6 cultivares de *Lolium perenne*, con la finalidad de seleccionar un cultivar que presente un adecuado potencial de acumulación de Se. Los cultivares evaluados corresponden a aquellos más utilizados en los sistemas pratenses del Sur de Chile y pertenecían al jardín de variedades de ballicas de la Estación Experimental Las Encinas de la Universidad de La Frontera de Temuco. Los cultivares evaluados corresponden a Aries, Quartet, Nui, Jumbo, Bronsyn y Nevis, y se desarrollaron sobre un Andisol que nunca ha recibido Se como fertilizante.

La determinación de la concentración de Se en las plantas se realizó en la Universidad de Helsinki, Finlandia, por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito (EAA-HG) de acuerdo a la metodología de Kumpulainen et al. (1983), durante una pasantía de

investigación financiada por el Proyecto de la Fundación Andes C-13755(28).

3.2.1 Determinación de la concentración de Se foliar por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito (EAA-HG)

El método de Kumpulainen et al. (1983) se basa en un sistema de digestión de la muestra a alta temperatura con una mezcla de ácidos fuertes (HNO₃ + HClO₄ + H₂SO₄) y, posteriormente, en la extracción de la muestra con el sistema Amonio pirrolidina ditiocarbamato- Isobutil metil cetona (APDC-MIBK) y el análisis de la concentración de Se por EAA-HG.

En resumen, se pesaron entre 0,2 y 1,0 g de muestra foliar molida y seca, se adicionó una mezcla ácida (16 mL de HNO₃ al 65% + 2 mL de HClO₄ al 70% + 2 mL de H₂SO₄ al 95%) y la mezcla se dejó reposar durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la mezcla fue calentada durante 3 horas a 120°C y se elevó la temperatura a 220°C, manteniéndose en este nivel hasta que el volumen de solución final fue de 3 mL (aproximadamente 3 horas). La muestra digerida se dejó enfriar durante la noche. Al día siguiente se adicionó 10 mL de HCl al 12% y la mezcla se calentó a 120°C por exactamente 20 minutos, con la finalidad de reducir el Se(+VI) a Se(+IV). Una vez enfriada, se adicionó 10 mL de una solución de NH₄OH al 25%. El Se fue extraído a una fase orgánica para eliminar interferencias y concentrarlo. Previo a la extracción, el pH de la solución fue ajustado a 5 adicionando NH₄OH: H₂O (1:1 v/v) ó HNO₃: H₂O (1:4 v/v), utilizando azul de bromofenol al 0,04% como indicador. Luego, se adicionó 5 ml de buffer de citrato de amonio (pH 5) y 5 mL de EDTA al 5%. El Se(+IV) fue quelado con 2 mL de una solución de APDC al 2% y para extraer el Se a la fase orgánica se adicionó entre 2,5 y 5 mL de MIBK. Las soluciones fueron agitadas en agitador recíproco durante 5 minutos y se dejó reposar durante 20 minutos para separar las fases.

El análisis de la concentración de Se en las muestras se realizó por EAA-HG a una longitud de onda de 196,1 nm, utilizando D₂ como corrector de línea base. Las determinaciones fueron realizadas en duplicado y se incluyó 2 muestras de referencia, provenientes del Departamento de Química Aplicada y Microbiología de la Universidad de Helsinki, en cada ronda analítica.

3.2.2 Análisis estadístico

La determinación de la concentración de Se foliar para cada cultivar se realizó sobre 3 repeticiones de material vegetal procedentes de parcelas establecidas en el mismo sitio experimental. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) y la comparación entre promedios se realizó a través de la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey a un nivel de significancia del 5%.

3.3 Evaluación de la dinámica de acumulación del selenio y su rol antioxidante en *Lolium* perenne según la fuente y dosis de Se aplicada. Estudio de invernadero

En el mes de Noviembre de 2003 se estableció un ensayo en macetas en el invernadero perteneciente al Departamento de Ciencias Químicas de la Universidad de La Frontera. El ensayo se realizó en un Andisol de la Serie Vilcún de la IX Región, evaluado en el perfil 0 a 20 cm, que corresponde al segundo muestreo del suelo realizado en Octubre de 2003 y cuya composición química se presenta en la Tabla 3 de la sección 3.1.1.

Para el experimento, se pesó 1,5 kg de suelo por maceta y cada muestra de suelo fue fertilizada con 200 mg P kg⁻¹ de suelo (Superfosfato Triple) y 50 mg S kg⁻¹ de suelo (Sulpomag). Se sembraron 60 semillas por maceta de *Lolium perenne* cv. Aries y se aplicó a los suelos soluciones de selenito de sodio (Na₂SeO₃ x 5H₂O, reactivo MERCK p.a.) y seleniato de sodio (Na₂SeO₄, reactivo SIGMA p.a.) en dosis de: 0, 0,1, 0,25, 0,50, 1,0, 1,5, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 y 10,0 mg Se kg⁻¹ de suelo. Una vez emergidas las plantas, el ensayo fue raleado a 40 plántulas por maceta y se aplicó 50 mg N kg⁻¹ de suelo bajo la forma de Urea.

Durante el período de crecimiento (55 días), las plantas fueron regadas periódicamente con agua destilada y las evaluaciones se realizaron para el primer corte, cuando las plantas presentaron una altura promedio de 30 cm.

3.3.1 Producción de materia seca y análisis químicos y bioquímicos en tejidos vegetales Al momento del corte, se registró el peso verde foliar (PV) de cada maceta y se secaron submuestras de materia verde a 65°C por 48 horas para la determinación de la producción de materia seca (ms) y la concentración de Se foliar, siendo esta última determinada por EAA-HG por el método de Kumpulainen et al. (1983), previamente descrito en la sección 3.2.1.

Además, se tomaron submuestras de materia verde de cada maceta, las que fueron almacenadas en una cámara de frío a -70°C y -20°C, para las determinaciones de la actividad glutatión peroxidasa (GSH-Px) y de la peroxidación lipídica, respectivamente.

3.3.1.1 Determinación de la actividad GSH-Px

La actividad GSH-Px fue determinada por el método de Flohé y Günzler (1984) modificado, utilizando H_2O_2 como sustrato. La enzima fue extraída de acuerdo al procedimiento descrito por Hartikainen et al. (2000) modificado por la inclusión de 1 mM de EDTA y polivinil polipirrolidona (PVPP) como inhibidores de proteasas. Se pesaron 50 mg de muestras foliares previamente maceradas en N_2 líquido y la enzima fue extraída con 1,6 mL de una solución pre-enfriada de buffer fosfato 100 mM – EDTA 1 mM (pH 7,0) más 30 mg de PVPP.

Las mezclas fueron centrifugadas a 4°C por 20 minutos (10000 rpm) y el sobrenadante obtenido después de la centrifugación fue utilizado como extracto crudo de la enzima. Para la reacción enzimática, se mezcló 0,2 mL de sobrenadante más 0,2 mL de buffer fosfato 100 mM– EDTA 1 mM (pH 7,0) más 0,4 mL de GSH (glutatión reducido) 1 mM. Paralelamente, se preparó un set de blancos de reacción no enzimática mezclando 0,4 mL de buffer fosfato 100 mM– EDTA 1 mM (pH 7,0) más 0,4 mL de GSH 1 mM.

Las mezclas se colocaron en un baño de agua a 25°C durante 5 minutos. Luego, se inició la reacción enzimática adicionanado a los tubos ordenados 0,2 mL de H₂O₂ 1,3 mM cada 10 segundos de intervalo. Trancurridos 10 minutos desde la primera adición, la reacción fue finalizada adicionando 1 mL de una solución de ácido tricloroacético (TCA) al 1% a los tubos en el mismo orden cada 10 segundos de intervalo y la mezcla fue colocada en un baño de hielo por 30 minutos para precipitar las proteínas.

En cubetas desechables, se mezclaron 1,1 mL de buffer fosfato 100 mM- EDTA 1 mM (pH 7,0) más 0,25 mL de mezcla y se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de

onda de 412 nm. Luego, para el desarrollo de color se adicionó 0,15 mL de 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) a cada cubeta y se volvió a determinar la absorbancia de las muestras a 412 nm en menos de 5 minutos. La actividad GSH-Px fue calculada como la disminución de GSH en el tiempo en comparación al blanco de reacción no enzimática.

La concentración de proteína en el extracto crudo de enzima fue determinada espectrofotométricamente a 595 nm por el método de Bradford (1976) y la actividad GSH-Px fue expresada en base proteíca.

3.3.1.2 Determinación de la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica fue monitoreada a través de la medición de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el material fresco de acuerdo a la metodología de Heath y Packer (1968) modificada por Du y Bramlage (1992). En este procedimiento modificado, la absorbancia de la muestra es medida a tres longitudes de onda con la finalidad de corregir las interferencias generadas por los complejos TBARS-polisacáridos.

Se maceró 0,25 g de muestra foliar en una solución pre-enfriada de TCA al 0,1%, con ayuda de arena de quarzo y se centrífugo el homogenizado a 10000 rpm por 5 minutos. Luego, se mezcló 1 mL de sobrenadante con 4 mL de una solución de TCA al 20% – TBA (ácido tiobarbitúrico) al 0,5%. La mezcla fue calentada a 95°C durante 30 minutos y, luego, enfriada rápidamente en un baño de hielo. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos y se midió la absorbancia del sobrenadante a 532, 600 y 440 nm. En el extracto, la concentración de TBARS expresada en equivalentes de Malondialdehido (nmol MDA mL⁻¹) fue calculada por el método propuesto por Du y Bramlage (1992):

Donde: A_{532} , A_{600} y A_{440} corresponden a las absorbancias medidas a

532, 600 y 440 nm, respectivamente

MA Sacarosa $_{532}$ = Absorbancia molar de sacarosa a 532 nm = 8,4

MA Sacarosa₄₄₀ = Absorbancia molar de sacarosa a 440 nm = 147

Coeficiente de extinción molar de MDA = $1,57 * 10^5$

3.3.2 Determinación de la concentración de Se disponible en el suelo

Una vez cortadas las plantas se separó una porción de suelo de cada maceta, el cual fue secado y tamizado a 2 mm para realizar la determinación de la concentración de Se disponible en el suelo, a través de su extracción en agua ácida (pH 4,5).

El agua ácida (pH 4,5) fue preparada diariamente al momento de su uso, adicionando gotas de HCl 0,1 M a 1 L de agua desionizada bajo agitación continua. Para el procedimiento de extracción, se pesó 5 g de cada muestra suelo en envases plásticos de base cuadrada y se adicionó 20 mL de agua desionizada pH 4,5. Las suspensiones fueron agitadas en agitador recíproco durante 30 minutos a 180 rpm y, posteriormente, fueron filtradas con papel filtro Whatman N° 42. Finalizado este procedimiento, se determinó la concentración de Se en los extractos de suelo por EAA-HG a una longitud de onda de 196,1 nm, utilizando D₂ como corrector de línea base.

3.3.3 Análisis estadístico

Las comparaciones entre promedios en los distintos tratamientos experimentales se realizaron a través de la deviación estandar (DE) de cada determinación. Además, se utilizó la correlación bivariada de Pearson a un nivel de signicicancia del 1% con la finalidad de establecer relaciones entre dos variables repuesta.

3.4 Estudio preliminar de la tecnología de aplicación del Se bajo condiciones de invernadero

Durante el mes de Diciembre de 2003 se implementó un ensayo en macetas con la finalidad de realizar una evaluación preliminar del impacto de la tecnología de aplicación del Se sobre la producción y concentración de Se foliar de *Lolium perenne* cv. Aries bajo condiciones de invernadero, utilizando como fuentes de Se selenito de sodio y seleniato de sodio. El ensayo se realizó en un Andisol de la Serie Vilcún de la IX Región, evaluado en el perfil 0 a 20 cm, que corresponde al segundo muestreo del suelo realizado en Octubre de 2003 y cuya composición química se presenta en la Tabla 3 de la sección 3.1.1.

Para el experimento, se pesó 1,5 kg de suelo por maceta y cada muestra de suelo fue fertilizada con 200 mg P kg⁻¹ de suelo (Superfosfato Triple) y 50 mg S kg⁻¹ de suelo (Sulpomag) y se sembraron 60 semillas por maceta de *Lolium perenne* cv. Aries. Los tratamientos experimentales consistieron en la aplicación de selenito y seleniato peletizado a la semilla y la aplicación de soluciones directamente al suelo al momento de la siembra, utilizando concentraciones de Se de 0,05, 0,10, 0,11, 0,25, 0,28 y 0,30 mg kg⁻¹. En el procedimiento se mezcló 5 g de semilla con una solución que contenía el adherente (2 g Metilán kg⁻¹ de semilla) y la dosis de Se utilizada según tratamiento. Posteriormente, las semillas fueron recubiertas con carbonato de calcio y magnesio (0,341 kg Magnecal kg⁻¹ de semilla) y se dejaron reposar durante 24 horas. Una vez emergidas las plantas, el ensayo fue raleado a 40 plantas por maceta y se aplicó 50 mg N kg⁻¹ suelo bajo la forma de Urea.

El ensayo fue evaluado a un corte, realizado a los 45 días, cuando las plantas presentaban una altura promedio de 30 cm, determinándose para cada tratamiento la producción de materia seca y la concentración de Se foliar, de acuerdo a la metodología de Kumpulainen et al. (1983) descrita en la sección 3.2.1.

3.5 Evaluación de la dinámica de incorporación del selenio y su rol antioxidante en *Lolium perenne* a distintos niveles de aplicación de azufre al suelo. Estudio de invernadero

En el mes de Septiembre de 2004 se estableció un ensayo en macetas en el invernadero perteneciente al Departamento de Ciencias Químicas de la Universidad de La Frontera. El ensayo se realizó en un Andisol de la Serie Vilcún de la IX Región, evaluado en el perfil 0 a 20 cm, que corresponde al segundo muestreo del suelo realizado en Octubre de 2003 y cuya composición química se presenta en la Tabla 3 de la sección 3.1.1.

Para el experimento, se pesó 7,0 kg de suelo por maceta y cada muestra de suelo fue fertilizada con 400 mg P kg⁻¹ (Superfosfato Triple) y 0, 50 y 100 mg S kg⁻¹ (Sulpomag). Se sembraron 200 semillas por maceta de *Lolium perenne* cv. Aries y se aplicó a los suelos soluciones de selenito de sodio (Na₂SeO₃ x 5H₂O, reactivo MERCK p.a.) en dosis de 2,0 mg Se kg⁻¹. La fuente y dosis de Se aplicada en este ensayo fueron seleccionadas en base a los resultados generados en el primer ensayo de invernadero, considerando la aplicación de: (i) la fuente de Se más eficiente desde el punto de vista del sistema antioxidativo de las plantas, (ii) una dosis de Se que no genere toxicidad en las plantas, pero que sea de una magnitud adecuada para realizar un análisis de fraccionamiento del Se en los tejidos vegetales y cercana al umbral de toxicidad del Se para los animales.

Una vez emergidas las plantas, el ensayo fue raleado a 168 plántulas por maceta y se aplicó 50 mg N kg⁻¹ de suelo bajo la forma de Urea. El experimento fue realizado en triplicado y las plantas fueron regadas periódicamente con agua destilada. Las evaluaciones se realizaron para el primer corte, realizado a los 65 días, cuando las plantas presentaban una altura promedio de 30 cm.

3.5.1 Producción de materia seca y análisis químicos y bioquímicos en tejidos vegetales

Al momento del corte se registró el peso verde foliar de cada tratamiento experimental. La mayor parte del material vegetal de cada maceta fue secado a 65°C por 48 horas con la

finalidad de obtener suficiente material para las determinaciones de producción de materia seca, concentración mineral de Se, P y S y para el procedimiento de fraccionamiento del Se.

3.5.1.1 Análisis de Se, P, S y N foliar

La concentración de Se foliar fue determinada de acuerdo a la metodología de Kumpulainen et al. (1983), descrita en la sección 3.2.1.

Para la determinación de la concentración de P foliar, se calcinó 1 g de muestra foliar molida y seca a 500°C por 8 horas y se realizó una disolución de las cenizas en HCl diluido. El P fue determinado por colorimetría por la formación del complejo P-vanadomolibdato a una longitud de onda de 466 nm según el método descrito por Sadzawka et al. (2004).

Para la determinación de la concentración de S foliar, 0,25 g de muestra foliar fueron calcinados a 500°C por 4 horas con nitrato de magnesio y las cenizas fueron disueltas en HCl diluido. La concentración de S foliar fue determinada por turbidimetría a 440 nm de acuerdo al método descrito por Sadzawka et al. (2004).

Para la determinación de N foliar, las muestras foliares fueron digeridas por el método Kjeldahl. Luego, las muestras fueron destiladas y el destilado fue atrapado en HBO₃, para su posterior titulación con H₂SO₄ 0,05 N según la metodología descrita por Mora (2000).

3.5.1.2 Determinación de la actividad GSH-Px

Se almacenaron submuestras de material verde en una cámara de frío a –70°C para evaluar la actividad GSH-Px, según la metodología previamente descrita en la sección 3.3.1.1. En resumen, la actividad enzimática fue determinada por el método propuesto por Flohé y Gunzler (1984) y la enzima fue extraída por el método descrito por Hartikainen et al. (2000), modificado por la inclusión de 1 mM de EDTA y 1% de PVPP como inhibidores de proteasas. La actividad enzimática fue expresada en base proteica y la concentración de proteína en el extracto crudo de enzima fue determinada de acuerdo a la metodología propuesta por Bradford (1976).

3.5.1.3 Determinación de la peroxidación lipídica

Se almacenaron submuestras de material verde en una cámara de frío a –20°C para la medición de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), según la metodología previamente descrita en la sección 3.3.1.2. La determinación de la peroxidación lipídica de realizó de acuerdo al método de Heath y Packer (1968) modificado por Du y Bramlage (1992).

3.5.1.4 Fraccionamiento del Se en los tejidos vegetales

Se realizó un estudio de la distribución del Se en varias fracciones en los tejidos foliares (Seaminoácidos libres, Se-residual y Se-inorgánico) de acuerdo al método planteado por Gissel-Nielsen (1987) y modificado por Hartikainen et al. (1997) por la inclusión de la fracción del Se ligada a la proteína soluble (Figura 4).

Se pesaron 5 g de muestra seca y molida, los cuales fueron extraídos tres veces por 30 minutos en agitador recíproco (180 rpm) con 50, 50 y 25 mL de agua desionizada, respectivamente. Posterior a las dos primeras extracciones, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm por 20 minutos y finalizada la tercera extracción, las muestras fueron centrifugadas a 11000 rpm durante 30 minutos. Se mezcló el sobrenadante obtenido después de cada centrifugación y el residuo insoluble se secó durante la noche a 70°C. Para la precipitación de la fracción de proteína soluble, se adicionó al sobrenadante combinado 30 mL de una solución de TCA al 30% y la muestra fue centrifugada a 11000 rpm durante 40 minutos. El sedimento (fracción de proteína soluble) fue secado durante la noche a 70°C. La solución obtenida de la extracción acuosa (pH 2) fue adicionada a una columna de intercambio iónico, utilizando una resina Dowex 50WX8-400 (forma H⁺). La fracción de Se-inorgánico fue eluida desde la columna con 200 mL de una solución de HCl 1 N y 50 mL de agua desionizada y concentrada en rotavapor a 55°C. La fracción de Se- aminoácidos libres fue eluida desde la columna con 275 mL de una solución de NaOH 0,2 M y concentrada en rotavapor a 55°C.

La concentración de Se de cada fracción (Se-residual, Se-proteína soluble, Se-aminoácidos libres y Se-inorgánico) fue determinada por el método de Kumpulainen et al. (1983), descrito en la sección 3.2.1.

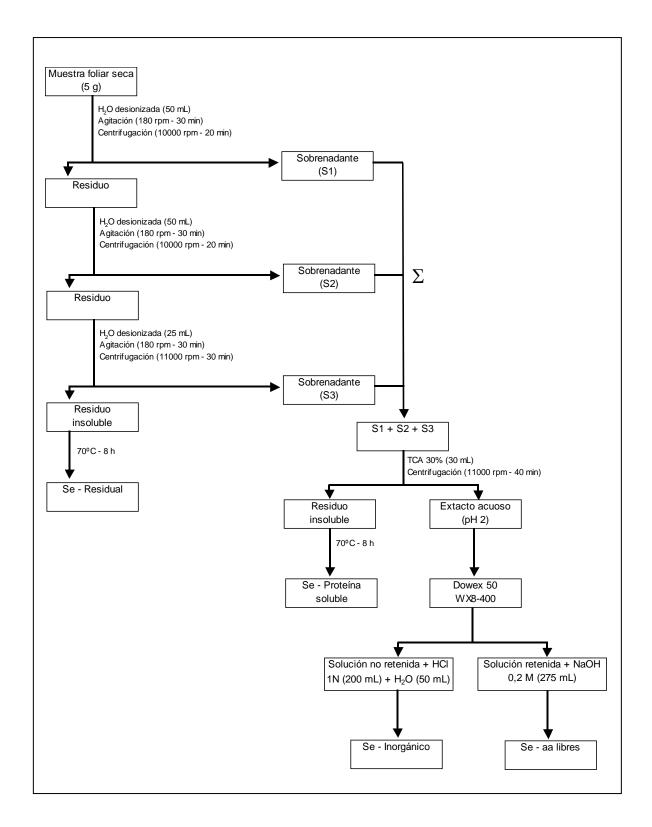


Figura 4. Esquema general del fraccionamiento del Se en tejidos vegetales.

3.5.1.5 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida – dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

La precipitación de las proteínas se realizó de acuerdo al método propuesto por Damerval et al. (1986). Se pesaron 0,3 g de muestras foliares previamente maceradas en N₂ líquido, se agregó 1 mL de una solución de acetona que contenía 2-mercaptoetanol al 0,07% y TCA al 10% y se colocaron a -20°C durante la noche. Al día siguiente, las muestras fueron centrifugadas a 11000 rpm por 20 minutos. Luego, se adicionó al pellet 1 mL de acetona fría (-20°C) que contenía 2-mercaptoetanol al 0,07% y se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos; este procedimiento se repitió 5 veces, hasta que el pellet se decoloró por completo. Posteriormente, se agregó a cada pellet 0,3 mL de una solución de Urea 8 M, las muestras se sonicaron durante 20 minutos y se centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos. Se colectó el sobrenadante, el cual contiene las proteínas solubles, y se almacenó a 4°C durante la noche para su corrida electroforética.

Para la electroforesis de proteínas SDS-PAGE, el gel de separación contenía Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), SDS al 0,4% y acrilamida (Acrilamida-Bisacrilamida 29:1) al 12,5%. El gel de apilamiento contenía Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), SDS al 0,4% y acrilamida (Acrilamida-Bisacrilamida 29:1) al 5%. Los geles se polimerizaron químicamente con TEMED (tetrametiletilendiamino) y persulfato de amonio (PSA), ambos al 0,05%. El buffer de carga contenía Tris-HCl 50 mM, ditiotreitol (DTT) 100 mM, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0,1% y glicerol al 10%. El buffer de corrida contenía Tris-HCl 0,025 M, glicina 0,19 M y SDS al 0,1%. Previo a la corrida electroforética, se mezcló 50 μL de muestra y 50 μL de buffer de carga y se calentaron en un baño de agua a 100°C durante 5 minutos. Se cargó 12 μL de muestra en cada carril y se incluyó un estándar de peso molecular. La corrida electroforética se realizó a 120 volts durante 1 hora y 45 minutos.

Una vez finalizada la corrida electroforética, las proteínas se fijaron al gel con una solución de metanol:agua desionizada:ácido acético (5:5:1 v/v/v) durante 2 horas para luego teñirlas durante la noche con una solución que contenía Azul de Coomassie R-250 al 0,02%, etanol al 5%, TCA al 6% y metanol al 25%. Al día siguiente, se destiñó el gel con una solución de metanol al 20% y ácido acético al 5% y se procedió a fotografiar y a analizar el

fraccionamiento electroforético con el programa Kodak Digital Science DC 120.

3.5.2 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados a través de un ANDEVA y las comparaciones entre promedios se realizaron por medio de la prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey a un nivel de significancia del 5%. Además, se determinó la desviación estandar de cada set de datos experimetales.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización físico-química del suelo

4.1.1 Composición química y carga neta del suelo

El suelo en estudio corresponde a un Andisol de la Familia Temuco-Serie Vilcún, evaluado en el perfil 0 a 20 cm, el cual fue seleccionado a partir de los resultados de la composición química de 4 Andisoles pertenecientes a las Series Pemehue, Vilcún, Osorno y Piedras Negras del Sur de Chile, y que corresponden a los suelos estudiados dentro del marco del Proyecto FONDECYT 1020934.

Para la caracterización físico-química del suelo y para los estudios de adsorción de aniones en sistemas simples y binarios se utilizó una muestra de suelo recolectada en Mayo de 2002, cuya composición química se presenta en la Tabla 3 de la sección 3.1.1.

Los resultados del análisis de suelo indican que el suelo presenta una reacción moderadamente ácida, registrando un valor de pH (H₂O) de 5,5. La suma de bases alcanzó 8,04 cmol(+) kg⁻¹, existiendo una adecuada proporción de cationes básicos en el complejo de intercambio, en el cual el Ca es el catión predominante. Consecuente con la elevada suma de bases, hubo una baja concentración de Al soluble en el complejo de intercambio, lo cual se tradujo en un porcentaje de saturación de Al cercano a 3%. Las concentraciones de P y S disponible alcanzaron un nivel medio de acuerdo a los estándares establecidos para una adecuada producción vegetal, con valores de 14 y 9 mg kg⁻¹, respectivamente. Por su parte, la concentración de Se total se encuentra dentro del rango de valores descritos por Araneda et al. (2001) para suelos de la IX Región, quienes encontraron que la concentración de Se fluctuó entre menos de 0,01 y 1,5 mg kg⁻¹, señalando que desde el punto de vista de la nutrición vegetal un 58% de las muestras presentaron valores deficientes de acuerdo a los estándares empleados en Nueva Zelandia.

Con el propósito de caracterizar la carga de la superficie, en la Figura 5 se presentan las curvas de titulación potenciométrica obtenidas para el suelo de la Serie Vilcún a tres distintas fuerzas iónicas, utilizando KCl como electrolito de soporte. El PESC, definido como el punto de intersección de tres curvas de titulación realizadas a diferente fuerza iónica en el cual no existe un efecto de la concentración del electrolito de soporte sobre la carga neta del suelo, alcanzó un valor de pH de 4,30 indicando un predominio de carga negativa al valor de pH que presenta el suelo.

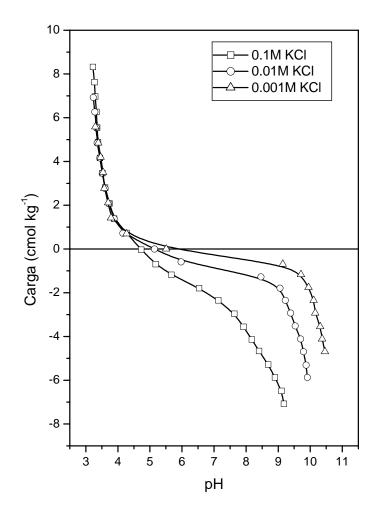


Figura 5. Curvas de titulación potenciométrica de un Andisol de la Serie Vilcún a distintas concentraciones de KCl y temperatura de 25°C.

Como era de esperarse, un incremento en la concentración de electrolito de soporte desplazó el PCC hacia valores de pH más bajos, debido a que en suelos de carga variable con predominio

de carga negativa un incremento en la fuerza iónica, al comprimir la capa difusa, genera la liberación de los protones más cercanos a las superficies coloidales incrementando la acidez de la solución.

4.1.2 Efecto del selenio adsorbido sobre la carga del suelo

En la Figura 6 (a,b) se presentan la curvas de titulación potenciométrica del suelo en estudio en presencia y ausencia de selenito y seleniato, respectivamente.

El selenito (Figura 6a) desplazó el PCC a valores de pH más altos, lo que significa liberación de OH desde las superficies coloidales al seno de la solución por efecto de la adsorción específica de este anión en el suelo a través del mecanismo de intercambio de ligandos (Hayes et al., 1987; Neal et al., 1987b; Sposito et al., 1988; Zhang y Sparks, 1990a). Además, a valores de pH inferiores a 8,0 se produciría un mayor consumo de protones como parte del mecanismo de adsorción y que no necesariamente significa la generación de carga positiva, sino que neutralización de carga negativa.

Según la Figura 6b el seleniato no ejerce un efecto sobre la carga protónica del suelo, evidenciando un mecanismo de unión a la superficie de carácter electrostático. Al respecto, Hayes et al. (1987) y Zhang y Sparks (1990a) concluyeron que el seleniato forma complejos de esfera externa sobre goetita y se ha reportado que el seleniato se une débilmente a la superficie y se lixivia fácilmente en el suelo (Neal y Sposito, 1989; Ahlrichs y Hossner, 1987).

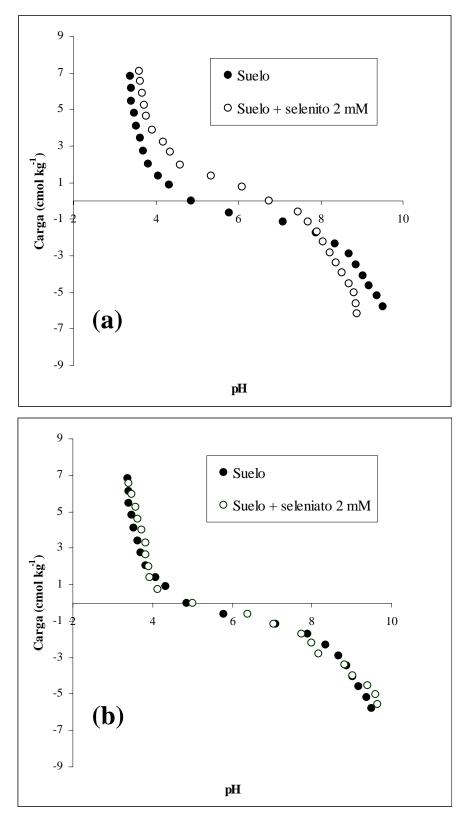


Figura 6. Curvas de titulación potenciométrica del suelo en presencia y ausencia de (a) Selenito de sodio y (b) Seleniato de sodio, utilizando KCl 0,1 M como electrolito de soporte.

4.1.3 Cinética de reacción de selenito y seleniato en el suelo

La Figura 7 describe la cinética de reacción de selenito y seleniato en el tiempo en el rango 0 a 72 horas ajustada a la ecuación de Elovich. En el caso del selenito, en los primeros 30 minutos se lleva a cabo alrededor del 50% de la reacción (Figura 7a). Posteriormente, la reacción continúa más lentamente hasta alcanzar una situación de equilibrio, al menos aparente a las 24 horas con un 91,9% del total adsorbido a las 72 horas. Esto coincide con los resultados de otros estudios que han encontrado que la reacción del selenito en el suelo persiste incluso por 75 días (Cary y Gissel-Nielsen, 1973), lo que Barrow y Whelan (1989b) atribuyen a una fuerte reacción de adsorción inicial seguida de una difusión intraparticular similar a aquella descrita para el fosfato, molibdato y fluoruro en el suelo.

La adsorción de seleniato es claramente inferior a la adsorción de selenito a la concentración de Se utilizada, registrándose más del 50% de la adsorción al cabo de 1 hora y una situación de equilibrio alrededor de las 18 horas, con un 91,6% de la adsorción total registrada a las 72 horas (Figura 7b). Por lo tanto, se seleccionó un período de adsorción de 24 horas para realizar los estudios de adsorción de selenito y seleniato en los sistemas simples y binarios.

Según la Figura 7 (a,b) las cinéticas de reacción de selenito y seleniato fueron descritas adecuadamente por la ecuación de Elovich, con valores de R^2 de 0,93 y 0,83, respectivamente. De acuerdo a las constantes obtenidas con este modelo, la velocidad inicial de adsorción (α) fue 9,5 veces superior para el selenito que para el seleniato, con valores respectivos de α de 136,2 y 14,3 mmol kg⁻¹ h⁻¹. El parámetro relacionado con desorción fue 3,3 veces superior para el seleniato (β = 0,529 mmol kg⁻¹ h⁻¹) que para el selenito (β = 0,162 mmol kg⁻¹ h⁻¹). Goh y Lim (2004) utilizaron la ecuación de Elovich para describir la cinética de adsorción de Se en el suelo y encontraron que, al igual que en este estudio, el parámetro de desorción (β) fue 3,3 veces mayor para el seleniato que para el selenito. Sin embargo, la velocidad inicial de adsorción (α) fue 3 órdenes de magnitud más baja para el selenito que para el seleniato, lo que difiere de los resultados previamente expuestos y puede atribuirse a que Goh y Lim (2004) trabajaron con un suelo sedimentario con predominio de arcillas cristalinas (kaolinita, montmorillonita y clorita) mientras que el Andisol utilizado en este estudio presenta 2,85% de alofán y 1,51% de ferrihidrita en su constitución mineralógica (Vistoso et al., 2005).

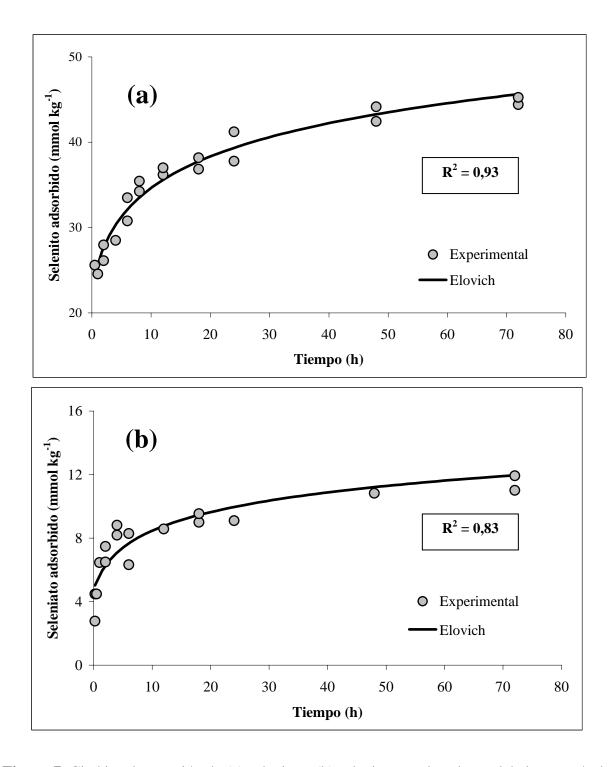


Figura 7. Cinética de reacción de (a) selenito y (b) seleniato en el suelo modelada a través de la ecuación de Elovich a una concentración de Se de 5 mM, pH 5,0 y 25°C, utilizando KCl 0,1 M como electrolito de soporte.

Los valores de α y β fueron utilizados para calcular la constante de equilibrio en el proceso de adsorción (k_{eq} , donde $k_{eq} = \alpha / \beta$). Según esta estimación, el valor de k_{eq} fue 31 veces más alto para el selenito ($k_{eq} = 840,74$) que para el seleniato ($k_{eq} = 27,03$), lo que denota la mayor afinidad del selenito por las superficies rectivas del suelo. Además, las diferencias en términos de la constante de desorción reflejan diferencias en el tipo y energía de enlace que ambos aniones presentan con la superficie, lo que concuerda con los mecanismos propuestos para la adsorción de selenito y seleniato, a través de la formación de complejos de esfera interna y complejos de esfera externa, respectivamente (Hayes et al., 1987; Zhang y Sparks, 1990a; Su y Suarez, 2000).

Se debe destacar que transcurridas 24 horas de reacción, los porcentajes de adsorción con respecto a la concentración inicial de Se adicionada (5 mM) fueron 41,2% y 9,2% para el selenito y el seleniato, respectivamente. Al respecto, los resultados de un estudio cinético realizado por Goh y Lim (2004) indicaron que a las 24 horas los porcentajes de adsorción fueron de 72% para el selenito y 25% para el seleniato, valores que resultan comparativamente más altos que los encontrados en este estudio. Sin embargo, cabe señalar que Goh y Lim (2004) realizaron su investigación sobre un suelo tropical, de mineralogía distinta a los Andisoles y de reacción fuertemente ácida, utilizando una concentración de Se significativamente más baja (0,2 mM) que la utilizada en este estudio (5 mM).

4.1.4 Efecto del pH sobre la adsorción de selenito y seleniato en el suelo

En la Figura 8 se presenta la adsorción de los aniones selenito y seleniato en función del pH del suelo. La adsorción de selenito fue al menos 3 veces superior a la adsorción de seleniato en el rango de pH 4,0 a 8,0.

La adsorción máxima de selenito en relación a la concentración de Se inicialmente adicionada (2 mM) fue de 75,8% y disminuyó a 59,3% a pH 8,0. En el caso del seleniato el máximo de adsorción cayó desde 27,9% a pH 4,0 a 16,1% a pH 8,0. Estos resultados coinciden el comportamiento de adsorción en función del pH observado por Goh y Lim (2004) quienes reportaron disminuciones significativas en la adsorción de selenito y seleniato en el suelo para el rango de pH 3,0 a 7,0.

La adsorción de selenito fue altamente dependiente del pH bajo condiciones ácidas, registrándose la mayor adsorción a valores de pH inferiores al PESC; a valores de pH sobre 5,0, el efecto de la reacción del suelo sobre la adsorción de selenito fue poco significativo. Al respecto, Pardo y Guadalix (1994) trabajando en dos suelos alofánicos, encontraron que la mayor adsorción de selenito ocurrió bajo el PCC, debido a que una disminución del pH bajo el PCC induce el desarrollo de carga neta positiva y un aumento en el potencial eléctrico, incrementando la adsorción. Por el contrario, valores de pH sobre este punto tienen un efecto menos marcado sobre la adsorción de selenito, debido a que aumenta la repulsión electrostática.

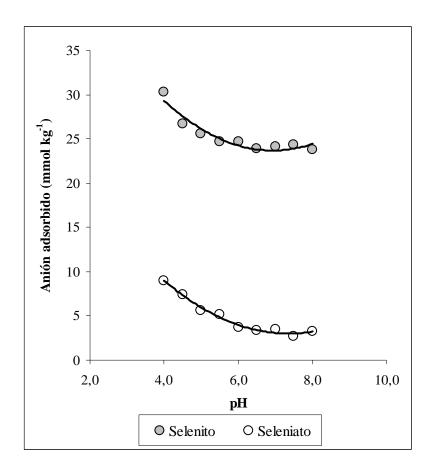


Figura 8. Efecto del pH sobre la adsorción de selenito y seleniato en el suelo a una concentración inicial de Se de 2 mM, 25°C y KCl 0,1 M.

En el caso del seleniato, la adsorción disminuye considerablemente al aumentar el pH hasta 6,0. Las diferencias en las cantidades de selenito y seleniato adsorbidas se presentan en la

Figura 9, en términos de adsorción relativa de cada anión en función del pH del suelo, tomando como 100% el máximo de adsorción observado a pH 4,0. Según se aprecia, la adsorción de selenito disminuyó en 21,7%, mientras que la adsorción de seleniato disminuyó en más de 62,7% en el rango de pH estudiado.

Tales diferencias se atribuyen a que la química de estos dos aniones en solución difiere apreciablemente (el seleniato tiene un pK_2 de 1,7, mientras que el selenito tiene un pK_1 de 2,75 y un pK_2 de 8,5) y denotan la baja afinidad que tiene el seleniato por las superficies minerales del suelo. En este sentido, Barrow y Whelan (1989a) plantean que el efecto del pH sobre la reacción de los aniones selenito y seleniato en el suelo depende de diferencias en el grado de disociación de los iones en solución y de diferencias en la localización del plano medio de adsorción.

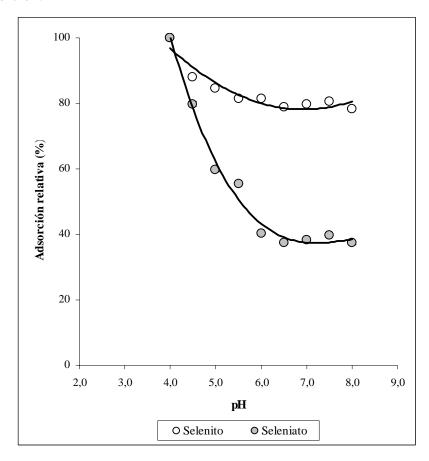


Figura 9. Disminución relativa de la adsorción de selenito y seleniato en el suelo. Entre pH 4,0 y 8,0, 2mM de Se (selenito o seleniato), 25°C y KCl 0,1 M.

4.1.5 Estudio de la adsorción de selenito, seleniato, fosfato y sulfato en sistemas simples

La Figura 10 presenta una comparación de las curvas de adsorción de selenito, seleniato, fosfato y sulfato en el suelo Vilcún ajustadas al modelo de Freundlich, a pH 5,0, concentración aniónica inicial entre 0 y 5 mM. Se debe considerar que los aniones selenito y fosfato al adsorberse específicamante en el suelo a través del mecanismo de intercambio de ligandos, liberaron grupos OH desde la superficie al seno de la solución, con el consecuente incremento del pH de la solución. Este efecto fue más marcado a medida que aumentó la concentración inicial del anión adicionado al sistema. Sin embargo, una vez transcurrido el tiempo de equilibrio de la reacción (24 horas) el máximo incremento observado del pH de la solución fue de aproximadamente 0,2 unidades, lo cual no tuvo un efecto significativo sobre la adsorción. Particularmente, en el caso del selenito, los efectos del pH sobre la adsorción son más marcados a valores de pH inferior a 5,0. Sobre este valor, la adsorción de selenito disminuye levemente al aumentar el pH de la solución hasta 8,0 como fue demostrado en los experimentos de adsorción en función del pH (sección 4.1.4). Por lo tanto, para los experimentos de adsorción en los sistemas simples y binarios se ajustó el pH inicial de la solución a 5,0 y no se consideró los valores de pH final en la estimación de la adsorción de selenito y fosfato en el suelo.

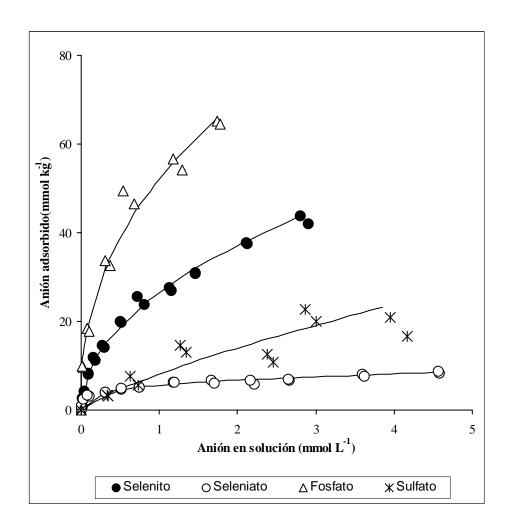


Figura 10. Isotermas de adsorción de selenito, seleniato, fosfato y sulfato a pH 5,0 , concentración aniónica entre 0 y 5 mM, 25°C y KCl 0,1 M. Ajuste al modelo de Freundlich.

En el caso del selenito, los valores de adsorción registrados son superiores aquellos reportados por Pardo y Guadalix (1994) para Andisoles de España de características de pH similares al suelo en estudio. Tales diferencias son atribuidas a los menores tiempos de adsorción empleados en dichos experimentos, en los cuales se estudió la adsorción de selenito en el suelo utilizando tiempos de equilibrio de una hora a 25°C. Por su parte, Nakamaru et al. (2005) reportaron que el 95% del Se adicionado bajo la forma de selenito fue adsorbido en Andisoles, adsorción que resulta comparativamente más alta que el 78,1% de adsorción observado en este estudio a la concentración inicial de Se más baja (0,05 mM); sin embargo, Nakamaru et al. (2005) trabajaron a concentraciones iniciales de Se significativamente inferiores a la más baja empleada en este estudio, utilizando tiempos de equilibrio de 7 días.

La adsorción de seleniato fue aproximadamente 5 veces más baja que la adsorción de selenito a la concentración de Se más alta que se utilizó en este estudio (Figura 10), consecuente con el hecho de que el selenito es fuertemente adsorbido por las superficies minerales del suelo y es potencialmente menos disponible para las plantas que el seleniato, el cual no sólo es adsorbido débilmente sino que, además, se lixivia fácilmente (Neal et al., 1987a,b; Neal y Sposito, 1989; Wang y Chen, 2003). En este sentido, Barrow y Whelan (1989a) reportaron factores de afinidad relativa neta de adsorción a pH 5,0 de 0,049 y 0,0014 para el Se(IV) y el Se(VI), respectivamente, lo que indica que en tales experimentos el selenito fue 35 veces más efectivo que el seleniato en producir adsorción en el suelo a las concentraciones empleadas.

En una primera aproximación al efecto competitivo ejercido por el fosfato y el sulfato sobre la adsorción de selenito y seleniato en el suelo, los valores experimentales de adsorción fueron ajustados a los modelos de Langmuir y Freundlich. En este estudio, las isotermas de adsorción de los cuatro aniones pueden ser mejor descritas por la ecuación de Freundlich, como lo indica el coeficiente de determinación (R²) obtenido en la modelación de cada sistema simple (Tabla 5). Por su parte, la ecuación de Langmuir no modeló adecuadamente los datos experimentales, particularmente a las concentraciones más altas de anión adicionado.

La Tabla 5 indica los valores de las constantes obtenidas para ambos modelos matemáticos. Según se aprecia, la adsorción de fosfato es claramente superior a la de los otros aniones en estudio; el selenito presenta un comportamiento de adsorción intermedio entre el fosfato y el sulfato, mientras que la adsorción de seleniato es inferior a la de fosfato, selenito y sulfato en el suelo. Además, se observa coherencia entre los parámetros x_m y a predichos por los modelos de Langmuir y Freundlich, respectivamente, para la adsorción de selenito y seleniato en el suelo. Comparativamente, la constante que indica el número de sitios máximos de adsorción del modelo de Langmuir (x_m) fue 83,4% más baja para el seleniato que para el selenito, mientras que el valor de la constante relacionada con afinidad de adsorción del modelo de Freundlich (a) fue 79,2% más baja para el seleniato que para el selenito.

Tabla 5. Constantes estimadas por los modelos matemáticos de Langmuir y Freundlich para la adsorción de fosfato, selenito, sulfato y seleniato en el suelo a una concentración aniónica inicial entre 0 y 5 mM, pH 5,0, 25°C y KCl 0,1 M.

Anión	Langmuir			Freundlich		
	$\mathbf{x_m}$	K	\mathbb{R}^2	a	b	\mathbb{R}^2
Fosfato	74,21	2,87	0,96	52,31	0,40	0,97
Selenito	52,44	1,23	0,96	26,57	0,46	0,97
Sulfato	29,43	0,49	0,79	9,25	0,56	0,76
Seleniato	8,68	2,22	0,90	5,52	0,28	0,97

Según el modelo de Langmuir, el fosfato presentó una adsorción máxima 29,3% y 88,3% superior a la de selenito y seleniato, respectivamente, y la capacidad de adsorción de sulfato fue 70,5% superior a la de seleniato. Se observó una tendencia similar para la constante de afinidad del modelo de Freundlich (a), según la cual la adsorción de fosfato fue claramente superior a la de selenito (49,2%) y seleniato (89,5%), y la adsorción de sulfato fue superior a la de seleniato en 40,3%. Al respecto, Wu et al. (2002) determinaron que la afinidad de adsorción sobre γ -Al₂O₃ fue en orden decreciente: selenito > seleniato > sulfato a partir de los coeficientes de las ecuaciones de Langmiur y Freundlich, siendo la capacidad máxima de adsorción de los aniones seleniato y sulfato bastante similares.

Basado en los ajustes matemáticos y en las constantes de los modelos de Langmuir y Freundlich, la capacidad máxima de adsorción y los coeficientes de afinidad por las superficies reactivas del suelo son en orden decreciente: fosfato > selenito > sulfato > seleniato. Considerando estos resultados, se decidió realizar los estudios de competencia en los sistemas binarios selenito/fosfato y seleniato/sulfato.

4.1.6 Estudios de competencia selenito/fosfato

4.1.6.1 Estudio de la adsorción de selenito y fosfato en el suelo a través de las ecuaciones de Freundlich y Sibbesen

A pesar de que la ecuación de Freundlich fue capaz de describir mejor la adsorción de selenito que la ecuación de Langmuir en los sistemas simples, se observó que sobre escala logarítmica los valores experimentales generaron una curvatura en el rango de concentraciones estudiadas. La bondad de ajuste de esta curvatura fue evaluada comparando los ajustes de los modelos de Freundlich y Sibbesen a través del principio de la suma extra de cuadrados propuesto por Mead y Pike (1975) para evaluar la significancia estadística del parámetro extra de la ecuación de Sibbesen. La Figura 11 indica que, en escala logarítmica, la ecuación de Sibbesen describió adecuadamente la curvatura de los valores experimentales, mientras que la ecuación de Freundlich sobreestimó la adsorción de selenito a altas y bajas concentraciones en solución y subestimó su adsorción a concentraciones intermedias en equilibrio en solución.

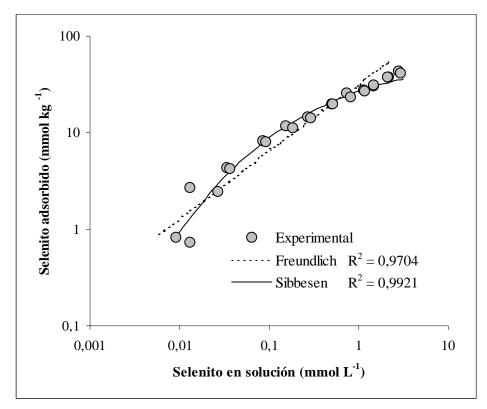


Figura 11. Comparación de los valores experimentales y modelados de la adsorción de selenito en el suelo a través de las ecuaciones de Freundlich y Sibbesen. Valores expresados en escala logarítmica.

La Figura 11 muestra que el coeficiente de determinación (R^2) para la ecuación de Freundlich fue 0,9704; luego, la fracción de suma de cuadrados no considerada fue 0,0296. Los valores de la ecuación de Sibbesen fueron 0,9921 y 0,0079. El mejoramiento debido al término extra de la ecuación de Sibbesen fue 0,0296 – 0,0079 = 0,0217. Entonces, considerando que hubo 24 observaciones experimentales, los grados de libertad para el residual de la suma de cuadrados después de la ecuación de Sibbesen fue 21 y el valor del cuadrado medio fue 0,0079/21 = 0,000376. La razón de varianza para testear el término extra de la ecuación de Sibbesen fue 0,0217/0,000376 = 57,7, lo cual es altamente significativo.

La ecuación de Sibbesen se ajustó mejor que la ecuación de Freundlich a los datos experimentales debido a que: (i) La ecuación de Sibbesen generó un residual de suma de cuadrados inferior a la ecuación de Freundlich; (ii) El valor F (razón de varianza) del mejoramiento causado por la inclusión de un parámetro extra en la ecuación de Sibbesen fue significativo (p < 0.01) y (iii) el coeficiente de determinación (R^2) de la ecuación de Sibbesen (0.9921) fue mayor que el R^2 de la ecuación de Freundlich (0.9704).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la adsorción de selenito y fosfato para los sistemas simples fue modelada en un ajuste común utilizando una forma modificada de la ecuación de Sibbesen descrita por Barrow y Whelan (1989a). La gráfica (Figura 12) fue obtenida: (i) ajustando la concentración de selenito en equilibrio en solución a un factor con la finalidad de comparar a adsorción de ambos aniones a un valor determinado de concentración en solución y (ii) fijando el factor que da cuenta de la adsorción de fosfato a 1.

Sobre la base de la escala logarítmica utilizada para representar el amplio rango de valores de adsorción (Figura 12) se puede observar que el selenito fue menos fuertemente adsorbido que el fosfato, lo que coincide con reportes previos (Ryden et al., 1987; Barrow y Whelan, 1989a; Pardo y Guadalix, 1994). El factor estimado para el selenito fue 0,168, lo que significa que bajo las condiciones de este experimento el fosfato fue alrededor de 6 veces más efectivo que el selenito en inducir adsorción en el suelo. Estos resultados indican una mayor afinidad neta relativa del selenito que aquella reportada por Barrow y Whelan (1989a), debido a diferencias en la constitución mineralógica y contenido de materia orgánica entre ambos suelos.

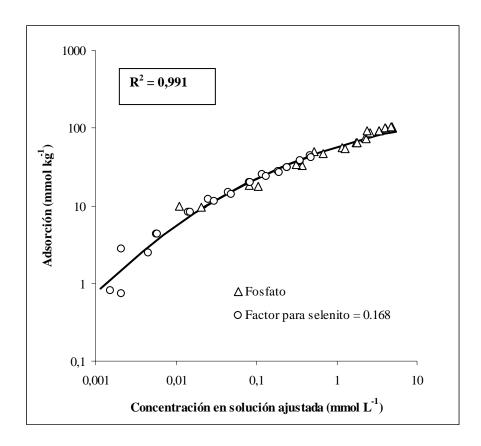


Figura 12. Adsorción de selenito en sistemas simples ajustada a un factor de afinidad relativa neta de adsorción de fosfato. Valores expresados en escala logarítmica.

Cuando los valores experimentales de competencia fueron adicionados al ajuste común presentado en la Figura 12, los valores de adsorción de fosfato y selenito de los sistemas binarios fueron satisfactoriamente modelados (Figura 13).

Así, el comportamiento del selenito y del fosfato en sistemas binarios parece ser la resultante de sus comportamientos individuales. La Figura 13 también demuestra que, considerando la competencia entre el fosfato y el selenito, fue deseable incluir un término para describir la no linealidad de la adsorción de selenito en escala logarítmica.

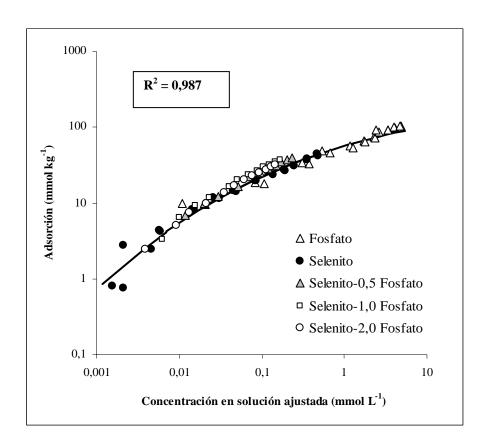
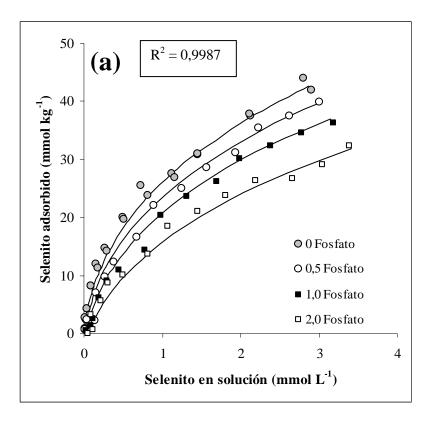


Figura 13. Adsorción de selenito en los sistemas simples y binarios ajustada a un factor de afinidad relativa neta de adsorción de fosfato. Valores expresados en escala logarítmica.

4.1.6.2 Estudio de la competencia selenito/fosfato a través de ecuaciones multicomponentes tipo Freundlich

La Figura 14a indica que la adsorción de selenito disminuyó en presencia de fosfato. Al adicionar concentraciones equimolares, el fosfato disminuyó la adsorción de selenito entre 12 y 27%. Comparativamente, Neal et al. (1987b) encontraron una disminución de la adsorción de selenito equivalente a 50% al adicionar igual concentración de fosfato en suelos aluviales.

La adsorción de fosfato también disminuyó en presencia del anión selenito, pero el efecto fue mucho más pequeño (Figura 14b). Al respecto, Barrow (1992) demostró que el fosfato continúa reaccionando más que el selenito en el suelo y que la ventaja competitiva del fosfato sobre el selenito aumenta con el tiempo de reacción.



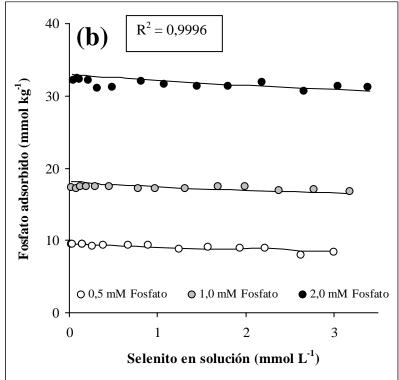


Figura 14. Valores experimentales y modelados de la adsorción de (a) selenito y (b) fosfato en el suelo a través de una ecuación multicomponente tipo Freundlich de 8 parámetros.

Como fue previamente explicado en la sección 3.1.5, se testeó la aplicabilidad de la ecuación SRS (Sheindorf et al., 1981) al sistema binario selenito/fosfato, partiendo de un modelo simple de 6 parámetros que incluye el término Sibbesen (Modelo 1) y verificando la significancia estadística de la inclusión de parámetros extras (Mead y Pike, 1975) con la finalidad de evaluar el grado de simetría de la competencia (Modelo 2, de 7 parámetros) y los efectos del anión competitivo sobre el potencial eléctrico de la superficie (Modelo 3, de 8 parámetros).

Según el principio de la suma extra de cuadrados (Mead y Pike, 1975), el Modelo 2 disminuyó significativamente la suma de cuadrados en relación al Modelo 1 (razón de varianza = 80,2 y 122 grados de libertad), lo que significa que los coeficientes de competitividad no fueron recíprocos.

El Modelo 3 generó una pequeña, aunque significativa disminución adicional de la suma de cuadrados (razón de varianza = 11,2 y 121 grados de libertad), lo que significa que hubo evidencia estadística de un efecto adicional del fosfato sobre la adsorción de selenito. Lo anterior implica que la concentración de fosfato en solución debería ser afectada a medida que la concentración de selenito en solución aumenta, lo que significa que las condiciones para la adsorción de selenito no son uniformes en la línea de adsorción. La magnitud de este efecto en Andisoles podría estar relacionada con mecanismos de reacción específicos y con la naturaleza de los sitios involucrados en la adsorción de selenito y fosfato, debido a que Rajan y Watkinson (1976) reportaron que existen dos reacciones que distinguen la adsorción de selenito y fosfato sobre alofán. A pesar de que ambos aniones son adsorbidos a través de intercambio de ligandos con grupos hidroxilos, silicato adsorbido y agua coordinada, el fosfato es capaz de adsorberse por dos mecanismos adicionales sobre alofán: disrupción de polímeros de aluminio y desplazamiento del silicato estructural de la arcilla. El Tabla 6 muestra los valores de los parámetros obtenidos mediante la aplicación del Modelo 3.

Tabla 6. Estimación de parámetros a través de la ecuación multicomponente tipo Freundlich de 8 parámetros (Modelo 3) para el sistema binario selenito/fosfato.

	Parámetros					
	$a_i ó a_{i,0}^a$	b ó b_I^{b}	b_2	$K_{i,j}$	$m_{i,j}$	R^2
i = Se, j = P	26,01	0,493	-0,045	1,360	0,202	0,9987
i = P, j = Se	52,32	0,441	_	0,058	_	0,9996

^aCuando no existe parámetro m en la sexta columna, el parámetro de la segunda columna indica el valor de a_i que se aplica en todos los niveles del anión competitivo. Cuando existe un valor para el parámetro m en la sexta columna, el parámetro de la segunda columna indica el valor de $a_{i,0}$ que se aplica que corresponde al valor donde la adsorción del anión competitivo es igual a 0.

^bCuando no existe parámetro b_2 en la cuarta columna, el parámetro de la tercera columna indica que el valor b se aplica a todos los niveles de concentración. Cuando existe un valor para el parámetro b_2 en la cuarta columna, el parámetro de la tercera columna indica el valor de b_1 que corresponde al valor ajustado a medida que la concentración se aproxima a 0.

Las ecuaciones ajustadas para el sistema de competencia selenito/fosfato fueron:

$$S_{Se} = \frac{a_{Se} * c_{Se}}{(c_{Se} + k_{Se,P} * c_{P})^{1-bSe}}$$
 Donde:
$$b_{Se} = b_{1}c_{Se}^{b2} \quad \text{y} \quad a_{Se} = a_{Se,0} - m_{Se,P}S_{P}, \text{ siendo } a_{Se,0} \text{ el }$$
 valor de a_{Se} en ausencia de adsorción de P, y:
$$S_{P} = \frac{a_{P} * c_{P}}{(c_{P} + k_{P,Se} * c_{Se})^{1-bP}}$$

La ecuación multicomponente tipo Freundlich derivada por Sheindorf et al. (1981) se basa en la premisa que la competencia entre ocurre sólo por los sitios de adsorción. Si éste fuera el caso, los coeficientes de competitividad serían simétricos. De acuerdo a los resultados obtenidos, el ajuste matemático del sistema binario selenito/fosfato mejoró significativamente cuando los coeficientes de competitividad no fueron simétricos (Modelo 2) y cuando la predicción de la adsorción de selenito fue inducida a disminuir por un efecto separado de la adsorción de fosfato al adicionar un parámetro extra en el Modelo 3. Estos efectos se atribuyen a que la adsorción de iones y su subsecuente penetración en la superficie producen un efecto separado de competencia a través de un cambio en la carga y, por lo tanto, en el potencial eléctrico de la superficie.

4.1.7 Estudios de competencia seleniato/sulfato

La Figura 15 muestra la adsorción de seleniato en presencia de 0,5, 1,0 y 2,0 mM de sulfato, en escala semilogarítmica. Los valores experimentales fueron ajustados a la ecuación de Sibbesen debido a que la ecuación de Freundlich no generó una adecuada predicción de los valores experimentales en los sistemas binarios, sobreestimando la adsorción de seleniato a las concentraciones más altas empleadas en este experimento. Particularmente, el parámetro "a" estimado por la ecuación de Sibbesen para la adsorción de seleniato en presencia de 0, 0,5, 1,0 y 2,0 mM de sulfato fue 5,57, 4,07, 2,97 y 2,54, respectivamente, lo cual evidencia que la capacidad de adsorción de seleniato disminuyó significativamente al aumentar la concentración de sulfato adicionada al suelo.

Según se observa en la Figura 15 (a,b,c), el sulfato disminuyó la adsorción de seleniato a razones molares seleniato/sulfato inferiores a 3. Sobre esta razón, la adsorción de seleniato no fue afectada por el sulfato adicionado. Al respecto, Wijnja y Schulthess (2000) reportaron un pequeño efecto competitivo del sulfato sobre el seleniato en un estudio de adsorción sobre óxidos de Al y Wijnja y Schulthess (2002) encontraron una reducción significativa en la adsorción de seleniato sobre goetita a valores de pH inferiores a 6,5, lo que coincide con los resultados reportados por Goh y Lim (2004) quienes encontraron que la adsorción de seleniato disminuyó significativamente al adicionar concentraciones crecientes de sulfato a un suelo tropical.

La comparación de los resultados de adsorción de seleniato en presencia y ausencia de sulfato indicó que la adsorción de seleniato disminuyó entre 18 y 50% al adicionar concentraciones equimolares de seleniato y sulfato al suelo. Lo anterior indica que, en términos prácticos, existiría una importante disminución en la adsorción de seleniato por efecto del sulfato a las tasas habitualmente aplicadas de ambos nutrientes como fertilizante al suelo, debido a que se ha determinado que el seleniato y el sulfato se adsorben en las superficies minerales formando complejos de esfera externa (Zhang y Sparks, 1990a,b; He et al., 1996; 1997).

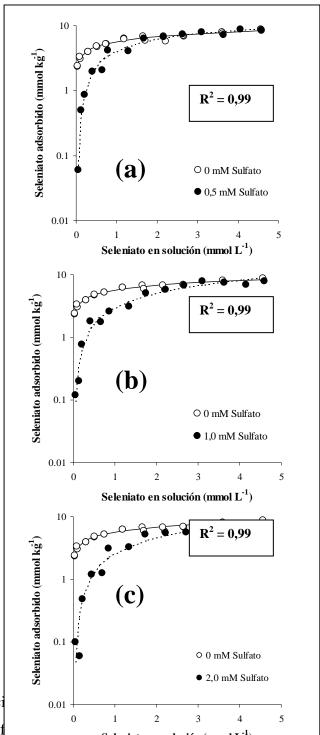


Figura 15. Descripci concentración de sulf (eje y) fue graficada

0.01

0 1 2 3 4 5

Seleniato en solución (mmol L⁻¹)

ecuación de Sibbesen a adsorción de seleniato r el efecto del sulfato a

bajas razones molares seleniato/sulfato en solución.

Por su parte, el seleniato fue capaz de disminuir la adsorción de sulfato en todo el rango de concentraciones evaluadas (Figura 16). A concentraciones equimolares de seleniato y sulfato, la adsorción de sulfato disminuyó entre 20 y 30% en relación a los valores de adsorción de

sulfato obtenidos en los sistemas simples, observándose la mayor disminución en adsorción a razones molares seleniato/sulfato inferiores a 1, particularmente a una concentración inicial de sulfato de 2 mM. Al considerar en conjunto los mmoles kg⁻¹ de anión adsorbido (seleniato + sulfato) se observa que, bajo las condiciones de este experimento, la concentración adsorbida se hace constante a razones molares seleniato/ sulfato mayores a 3. Lo anterior implica que existe poca probabilidad de una competencia real entre el seleniato y el sulfato por los sitios activos del suelo, excepto cuando la concentración inicial de seleniato es alta. La disminución de la concentración de sulfato adsorbida a razones molares seleniato/ sulfato inferiores a 1 puede atribuirse a un impedimento estérico causado por el seleniato sobre la adsorción de sulfato.

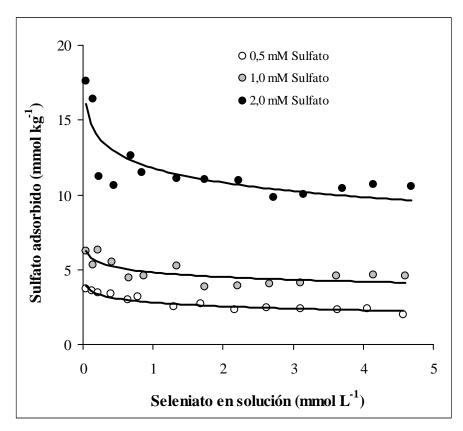


Figura 16. Valores experimentales de la adsorción de sulfato en los sistemas binarios seleniato/sulfato.

4.2 Efecto de la fuente y dosis de selenio sobre la dinámica de acumulación del selenio y su actividad antioxidante en *Lolium perenne*

4.2.1 Selección de un cultivar de Lolium perenne para estudios de invernadero

En el Tabla 7 se presentan los resultados correspondientes a la evaluación de la concentración de Se foliar de 6 cultivares de *Lolium perenne*, provenientes de la Estación Experimental Las Encinas, Universidad de La Frontera-Temuco, Chile.

Tabla 7. Concentración de Se de seis cultivares de *Lolium perenne* provenientes de la Estación Experimental Las Encinas perteneciente a la Universidad de La Frontera-Temuco.

Cultivar	Concentración de Se (μg kg ⁻¹)
Aries	9,7 ± 0,3 a
Quartet	$6.6 \pm 0.5 \text{ b}$
Nui	$5.8 \pm 0.5 \text{ b}$
Jumbo	$5.7 \pm 0.4 \text{ bc}$
Bronsyn	$4.7 \pm 0.5 \text{ cd}$
Nevis	$3.7 \pm 0.2 d$

Valores promedio de 3 repeticiones \pm Desviación estándar (DE). Cifras con letras distintas denotan diferencias significativas según la Prueba de Comparación Múltiple de Promedios de Tukey (p < 0.05).

De acuerdo a los resultados (Tabla 7), existen diferencias significativas (p< 0,05) en la concentración de Se foliar de los cultivares evaluados, siendo el cultivar Aries el que presentó los niveles foliares más altos y, por lo tanto, el mayor potencial de acumulación de Se en comparación a todos los cultivares evaluados.

Es interesante destacar que ninguno de los cultivares presenta una concentración de Se adecuada en relación a los requerimientos nutricionales del ganado, los cuales son superiores a 50 μg kg⁻¹ de materia seca de acuerdo a los estándares establecidos en Nueva Zelandia. Más aún, NRC (2000) plantea que los requerimientos de Se en bovinos de carne son del orden de 100 μg kg⁻¹ de materia seca y que se han reportado signos clínicos y subclínicos de deficiencia en animales alimentados con forraje que contiene concentraciones de 20 a 50 μg kg⁻¹.

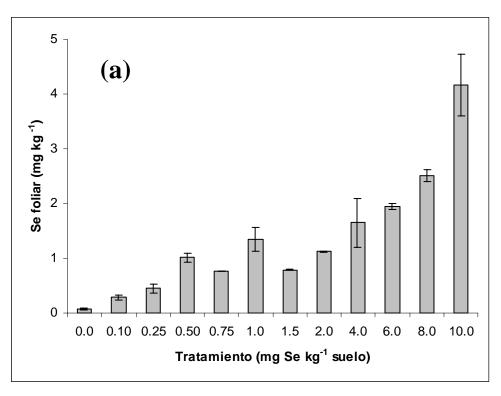
La deficiencia de Se encontrada en todos los cultivares se atribuye a una baja concentración de Se disponible en este suelo, el cual nunca ha sido fertilizado con Se.

Por lo tanto, considerando las concentraciones de Se foliar obtenidas, se seleccionó el cultivar Aries para los estudios posteriores realizados bajo condiciones de invernadero.

4.2.2 Concentración de Se foliar y producción de materia seca

En el mes de Noviembre de 2003 se estableció un ensayo en macetas bajo condiciones de invernadero. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la fuente de Se (selenito y seleniato) y de la dosis de aplicación sobre la concentración de Se foliar en *Lolium perenne* cv. Aries y su incidencia en el sistema antioxidativo de las plantas.

La Figura 17 (a,b) muestra que la concentración de Se foliar aumentó significativamente con la aplicación de selenito y seleniato al suelo. Sin embargo, es interesante destacar la gran diferencia en la concentración de Se foliar entre ambas fuentes a igual concentración de Se aplicada al suelo.



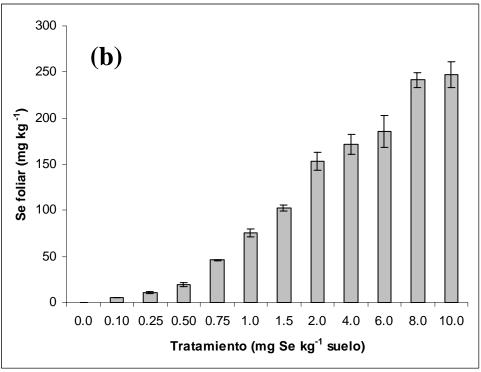


Figura 17. Concentración de Se foliar (mg kg⁻¹) en *Lolium perenne* cv. Aries al aplicar (a) selenito de sodio y (b) seleniato de sodio en dosis entre 0 y 10 mg Se kg⁻¹ de suelo.

En las plantas control (sin adición de Se) la concentración foliar fue 0.07 ± 0.02 mg kg⁻¹ de materia seca y las concentraciones más altas fueron obtenidas en las plantas tratadas con seleniato. Así, a la tasa más baja de aplicación de Se $(0.1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ de suelo})$ la concentración foliar de Se aumentó a 0.28 ± 0.04 y 5.72 ± 0.2 mg kg⁻¹ en las plantas tratadas con selenito y seleniato, respectivamente, mientras que con la dosis más alta (10 mg Se kg^{-1} de suelo) la concentración de Se foliar alcanzó valores respectivos de 4.17 ± 0.5 y 247 ± 13 mg Se kg⁻¹ con la adición de selenito y seleniato al suelo.

Las diferencias observadas pueden ser atribuidas a que: (i) Como lo indican los estudios de adsorción presentados en la sección 4.1, el selenito se comporta como el fosfato en el suelo y, por lo tanto, es más fuertemente adsorbido en las superficies minerales, lo que implica que es menos disponible para las plantas que el seleniato a igual tasa de aplicación y (ii) a pesar de que el selenito y el seleniato son absorbidos rápidamente por las raíces de las plantas, las mayores diferencias radican en el mucho más bajo porcentaje de translocación y las más bajas concentraciones foliares de Se en las plantas tratadas con selenito en comparación con seleniato (Asher et al., 1977; Banuelos y Meek, 1989; Yläranta, 1990b; Arvy, 1993; de Souza et al., 1998; Zayed et al., 1998; Hopper y Parker, 1999).

La significativa diferencia en concentración de Se foliar alcanzada con ambas fuentes de Se generó diferencias en rendimiento entre las plantas tratadas con selenito y seleniato. Cuando se adicionó selenito, la producción de materia seca no fue afectada por la aplicación de dosis crecientes entre 0,1 y 10 mg de Se kg⁻¹ de suelo, con un rendimiento promedio de 2,9 g de materia seca por maceta. Sin embargo, cuando las plantas fueron tratadas con seleniato se registró una disminución en el rendimiento, particularmente cuando la concentración de Se foliar superó los 150 mg kg⁻¹, lo cual fue equivalente a la aplicación de 4,0, 6,0, 8,0 y 10,0 mg de Se kg⁻¹ de suelo y rendimientos de 2,29, 2,24, 2,01 y 1,52 g de materia seca por maceta.

La disminución en producción de materia seca fue acompañada por síntomas de seleniosis en las plantas, presentándose una clorosis generalizada de las hojas y necrosis en el extremo de las láminas foliares más viejas, especialmente al emplear la dosis de Se más alta (Figura 18). Así, la aplicación de 10 mg Se kg⁻¹ de suelo bajo la forma de seleniato generó una reducción

del rendimiento del orden de 48,7% en comparación a la producción de materia seca del control (2,96 g maceta⁻¹).

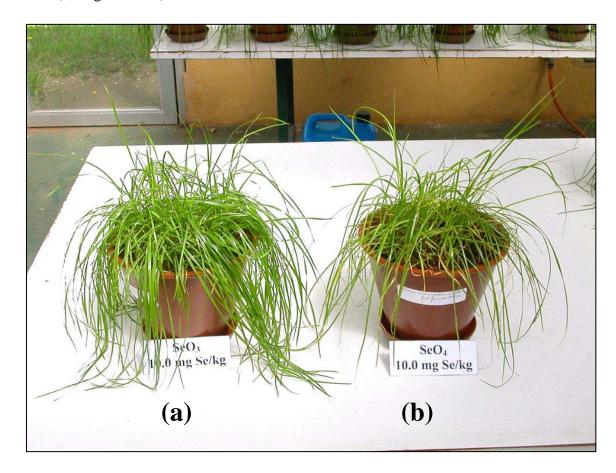


Figura 18. Producción de materia seca de *Lolium perenne* cv. Aries y síntomas de seleniosis asociados al aplicar 10 mg Se kg⁻¹ de suelo. (a) plantas tratadas con selenito y (b) plantas tratadas con seleniato.

La reducción en rendimiento explicaría la significativa correlación negativa encontrada para la concentración de Se foliar y la producción de materia seca (r = -0.838; p < 0.01) en las plantas tratadas con selenito y seleniato como lo muestra la Figura 19, en escala semilogarítmica.

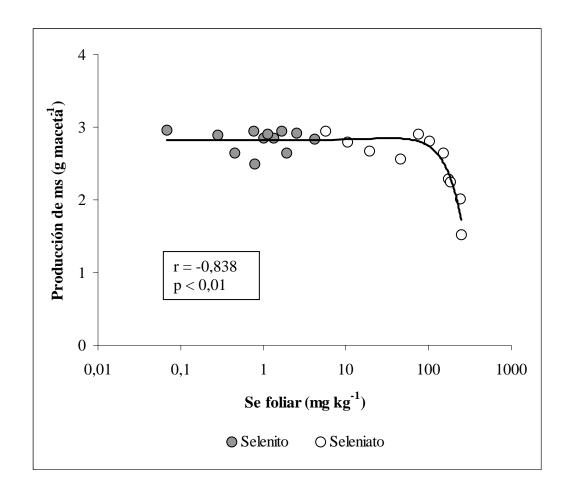
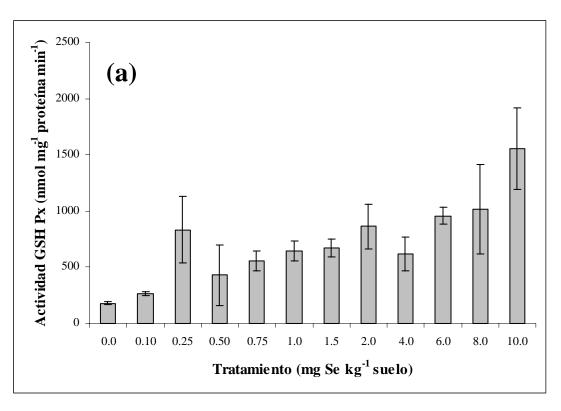


Figura 19. Correlación de Pearson entre la producción de materia seca (g maceta⁻¹) y concentración de Se foliar (mg kg⁻¹) en las plantas de *Lolium perenne* cv. Aries tratadas con selenito y seleniato. La concentración de Se foliar (eje x) fue graficada en escala logarítmica con la finalidad de diferenciar las respuestas al selenito y al seleniato de sodio.

4.2.3. Actividad GSH-Px y peroxidación lipídica

La aplicación de Se al suelo, bajo la forma de selenito y seleniato, incrementó la actividad GSH-Px en las plantas (Figura 20 a,b) lo que coincide con los resultados previamente reportados para ballica (Hartikainen et al., 1997; Hartikainen et al., 2000), lechuga (Xue et al., 2001; Pennanen et al., 2002) y soya (Djanaguiraman et al., 2005).



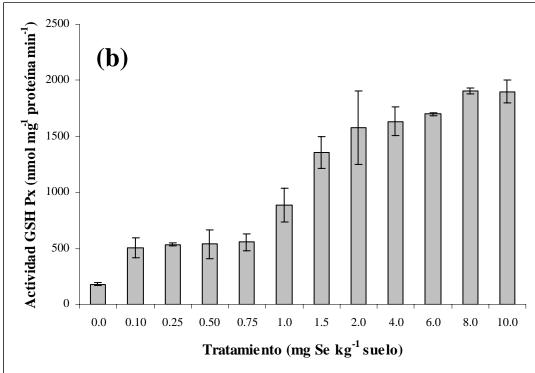


Figura 20. Actividad GSH-Px (nmol mg⁻¹ proteína min⁻¹) en el follaje de *Lolium perenne* cv. Aries a tasas de aplicación de Se entre 0 y 10 mg Se kg⁻¹ suelo. (a) selenito de sodio y (b) seleniato de sodio.

La Se-dependencia de la actividad GSH-Px fue evidente cuando la concentración de Se foliar y la actividad GSH-Px fueron significativamente correlacionadas para cada fuente de Se (Figura 21 a,b). A pesar de que el selenito y el seleniato elevaron la actividad GSH-Px, el incremento de dicha actividad enzimática no estuvo relacionado con la magnitud de incremento de la concentración de Se foliar; es decir, la actividad GSH-Px respondió de manera disímil a la concentración de Se foliar.

Las plantas tratadas con selenito presentaron una actividad GSH-Px de magnitud similar a las plantas tratadas con seleniato, incluso a concentraciones de Se foliar hasta 100 veces más bajas, lo que denota una mayor eficiencia del selenito en inducir la actividad GSH-Px y, por lo tanto, un mayor potencial del selenito como antioxidante en tejidos vegetales. Al respecto, se debe destacar que el rol del Se como antioxidante en las plantas ha sido previamente reportado sólo en términos de dosis crecientes de aplicación de Se y que éste es el primer estudio que compara el efecto de la forma química de Se sobre la actividad GSH-Px.

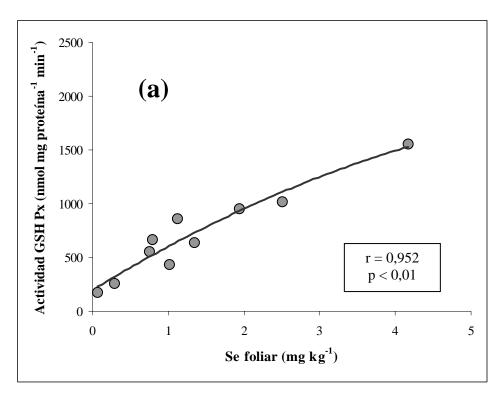
A partir de estos resultados puede inferirse que la Se-dependencia de la actividad GSH-Px se encuentra más bien relacionada con la forma química de Se aplicada que con la concentración de Se en los tejidos vegetales debido a que en las plantas superiores existen diferentes vías metabólicas para la asimilación del Se según la fuente disponible para las plantas (Terry et al., 2000). Así, cuando se aplica seleniato, el Se se encuentra mayoritariamente en forma inorgánica en las hojas de las plantas, debido a que en proceso de asimilación del seleniato bajo formas orgánicas, la reducción del seleniato llevada a cabo por la enzima ATP sulfurilasa es el factor limitante, como lo demuestran los resultados de de Souza et al. (1998) y Pilon-Smits et al. (1999) en *Brassica juncea*. Por el contrario, al aplicar selenito la mayor parte del Se es incorporado hacia formas de Se orgánico, es decir, Se-aminoácidos y Se-proteínas (de Souza et al., 1998; Zayed et al., 1998). A su vez, Stadtman (1980; 1991) señala que las enzimas GSH-Px identificadas a la fecha en mamíferos, pájaros y diatomeas corresponden a proteínas solubles tetraméricas que contienen residuos de Se-cisteína, en el plasma presentan una forma glicosilada y en membranas son proteínas monoméricas que reducen específicamente la peroxidación lipídica.

Aunque Terry et al. (2000) señalaron que no hay indicaciones concluyentes de la presencia de GSH-Px dependientes de Se en las plantas superiores, existen algunas evidencias moleculares de que el reino vegetal posee la maquinaria necesaria para sintetizar Se-cisteína (Fu et al., 2002; Novoselov et al., 2002; Rao et al., 2003). Además, Hatfield et al. (1992) identificaron el Se-cisteil-tRNA en *Beta vulgaris*, Sabeh et al. (1993) purificaron una Se-proteína tetramérica de 16 KD con actividad GSH-Px en plantas de *Aloe vera* y Seppänen et al. (2003) demostraron que el Se alteró la acumulación de transcriptos de GSH-Px en *Solanum tuberosum*.

En la Figura 22 se presentan los resultados correspondientes a la peroxidación lipídica, monitoreada como TBARS, de las plantas tratadas con selenito y seleniato. Según se aprecia, la adición de selenito disminuyó la peroxidación lipídica a dosis de aplicación de Se superiores a 6 mg Se kg⁻¹ de suelo, lo que fue equivalente a una concentración foliar de de 1,94 ± 0,06 mg Se kg⁻¹ de materia seca. Por otra parte, la adición de seleniato generó una reducción significativa de TBARS a tasas de aplicación entre 0 y 0,5 mg Se kg⁻¹ de suelo y, sobre este nivel, la peroxidación aumentó paulatinamente. Independiente de la fuente de Se utilizada, el umbral para la disminución de TBARS correspondió a una concentración foliar de aproximandamente 20 mg Se kg⁻¹, lo cual evidencia que el nivel de peroxidación lipídica fue dependiente de la concentración de Se foliar más que de la forma química de Se suministrada a las plantas.

Estos resultados confirman el efecto doble del Se sobre el sistema antioxidativo de las plantas que fue previamente reportado por Hartikainen et al. (2000) debido a que a bajas concentraciones el Se actuó como antioxidante, disminuyendo la acumulación de TBARS (y, por lo tanto, el estrés oxidativo de las plantas) mientras que a concentraciones foliares sobre 20 mg kg⁻¹ el Se actuó como prooxidante al incrementar la peroxidación lipídica (Figura 22) y reducir la producción de materia seca (Figura 19).

Considerando los requerimientos nutricionales del ganado, puede inferirse que la adición de Se al suelo bajo la forma de selenito mejora la calidad del forraje debido a que el rol del Se como antioxidante en *Lolium perenne* sugiere un retardo en la senescencia y, con ello, un aumento de la persistencia de pasturas deficientes en Se.



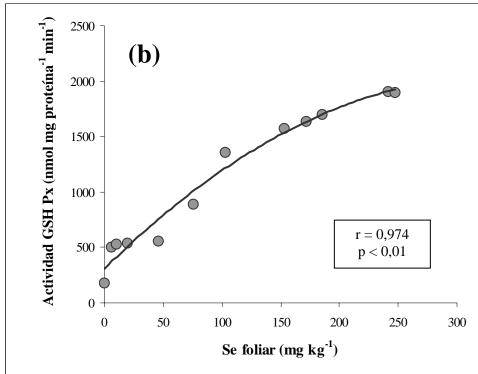


Figura 21. Correlación de Pearson entre la concentración de Se foliar (mg kg⁻¹) y la actividad GSH-Px (nmol mg⁻¹ proteína min⁻¹) en plantas tratadas con (a) selenito de sodio y (b) seleniato de sodio.

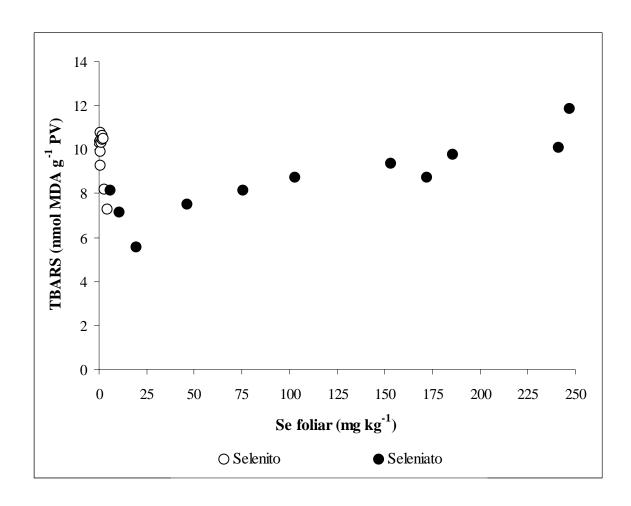


Figura 22. Relación entre la peroxidación lipídica (TBARS) y la concentración de Se foliar en plantas tratadas con selenito de sodio y seleniato de sodio.

4.2.4 Se disponible en el suelo y relación suelo-planta

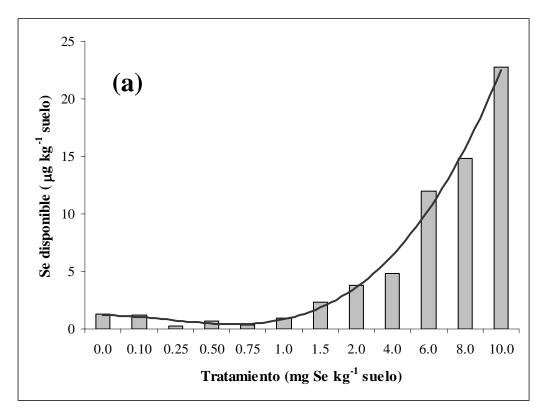
Debido a que los Andisoles son suelos ácidos, de carga variable y alto contenido de materia orgánica, y a que la disponibilidad del Se en los suelos depende de varios factores físico-químicos (Neal, 1990; Gissel-Nielsen, 2002), el Se disponible para las plantas debería ser evaluado por un método capaz de simular la acidez del suelo rizosférico.

Por lo anterior, se desarrolló un método de extracción del Se en agua ácida considerando que: (i) El Se extraído en agua es un mejor indicador de la disponibilidad del Se para las plantas que el contenido de Se total del suelo (Yläranta, 1993; Séby et al., 1997) y (ii) existen pocas

metodologías capaces de estimar adecuadamente el contenido de Se disponible para los cultivos. De hecho, la mayoría de los reportes indican una baja (Wang y Sippola, 1990) o nula correlación entre el contenido de Se del suelo y la planta, especialmente en suelos deficientes en Se (Gissel-Nielsen et al., 1984).

El Se disponible en el suelo de cada tratamiento fue extraído con agua ácida (pH 4,5) al finalizar el experimento en invernadero. En la Figura 23 (a,b) se observa que el contenido de Se disponible aumentó paulatinamente al aplicar dosis crecientes de Se al suelo. Sin embargo, la magnitud de dicho incremento estuvo relacionada con la fuente de Se utilizada y, como era de esperarse, el seleniato permaneció al menos 100 veces más disponible en el suelo que el selenito en todo el rango de dosis de aplicación de Se evaluado.

Por otra parte, se observó correlación positiva entre el Se disponible en el suelo y la concentración de Se foliar (r = 0.945; p < 0.01) cuando se aplicó Se al suelo bajo la forma de selenito y seleniato (Figura 24), observándose la mayor dispersión de valores a bajos niveles de Se disponible en el suelo.



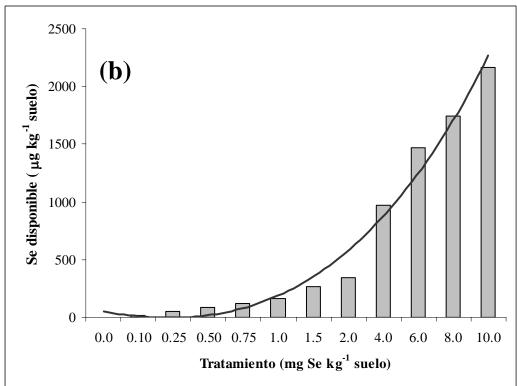


Figura 23. Se disponible en el suelo (µg kg⁻¹ suelo) al aplicar (a) selenito de sodio y (b) seleniato de sodio en dosis entre 0 y 10 mg Se kg⁻¹ de suelo.

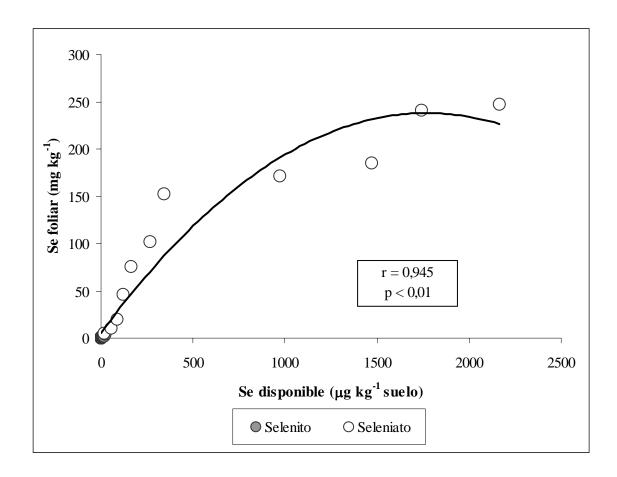


Figura 24. Correlación de Pearson entre el Se disponible en el suelo (μg kg⁻¹ suelo) y la concentración de Se foliar (mg kg⁻¹) en plantas tratadas con selenito y seleniato de sodio.

Este es un estudio preliminar de la relación suelo-planta y, por lo tanto, se requieren estudios posteriores para generar una base de datos más acabada que permita confirmar el alto grado de correlación entre el Se disponible en el suelo y la concentración de Se foliar aquí obtenido. Sin embargo, en relación a otros métodos de digestión y/o extracción reportados (Fujii et al., 1988; Wang y Sippola, 1990; Tokunaga et al., 1991; Martens y Suarez, 1997; Bujdoš et al., 2000), el método de extracción del Se en agua ácida aquí propuesto se vislumbra como una alternativa interesante para la determinación de Se por EAA-HG desde el punto de vista económico y, además, por su simplicidad, rapidez y capacidad de correlacionar el contenido de Se del suelo con la concentración de Se foliar.

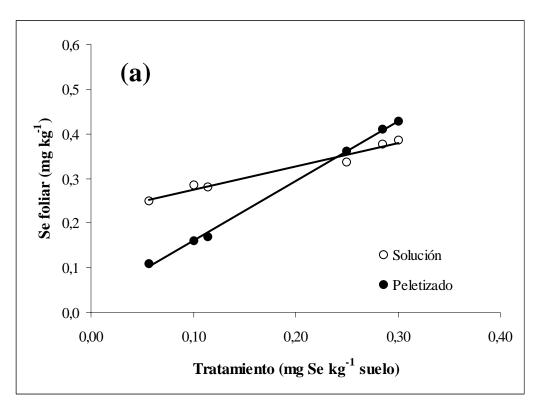
4.2.5 Estudio preliminar de la tecnología de aplicación del Se bajo condiciones de invernadero

En cuanto a la tecnología de aplicación del Se a *Lolium perenne*, los resultados del estudio preliminar bajo condiciones de invernadero (sección 3.4) indican que no hubo cambios significativos en la producción de materia seca ni síntomas de toxicidad asociados a la aplicación de selenito y seleniato en solución o peletizado (Tabla 8) y que la peletización de las semillas fue efectiva en incrementar la concentración de Se foliar (Figura 25 a,b).

Tabla 8. Efecto de la peletización de semillas y de la aplicación de soluciones de selenito y seleniato de sodio sobre la producción de materia seca (g maceta⁻¹) en *Lolium perenne* cv. Aries bajo condiciones de invernadero.

Tratamiento	Producción de materia seca (g maceta ⁻¹)					
(mg Se kg ⁻¹ suelo)	Sele	enito	Seleniato			
(ling se kg suelo)	Peletizado	Solución	Peletizado	Solución		
0	2,81	2,83	2,81	2,83		
0,05	2,89	2,80	2,84	2,80		
0,10	2,82	2,84	2,80	2,83		
0,11	2,81	2,82	2,82	2,86		
0,25	2,84	2,85	2,81	2,84		
0,28	2,86	2,85	2,85	2,81		
0,30	2,82	2,83	2,82	2,82		

Según la Figura 25b, en los tratamientos en base a seleniato, se observó que la peletización de las semillas tuvo un efecto entre 13 y 38% superior en la acumulación de Se foliar en relación a la aplicación de soluciones de seleniato de sodio directamente al suelo.



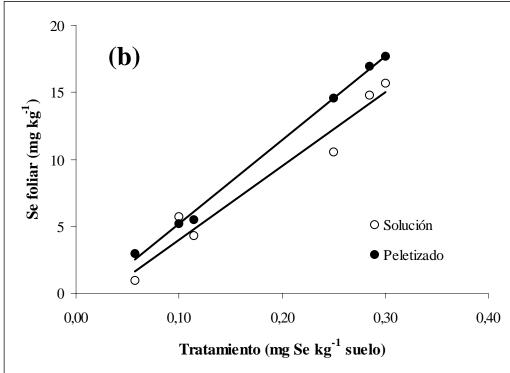


Figura 25. Efecto del método de aplicación de Se sobre la concentración de Se foliar en *Lolium perenne* cv. Aries, utilizando como fuentes de Se (a) selenito de sodio y (b) seleniato de sodio.

En los tratamientos en base a selenito (Figura 25a) se observó al peletizar las semillas con concentraciones de Se inferiores a 0,25 mg kg⁻¹ de suelo, la concentración de Se foliar fue claramente inferior en comparación a la aplicación de soluciones de Se al suelo. Sin ambargo, la peletización con concentraciones superiores a 0,25 mg Se kg⁻¹ de suelo aumentó la concentración de Se foliar entre 9 y 11% en comparación con la aplicación del Se en solución.

Considerando que los experimentos fueron realizados con reactivos químicos de elevada pureza, se utilizó un volumen muy pequeño de la sal (selenito de sodio) para el peletizado. Consecuentemente, al peletizar con bajas concentraciones de Se, hubo un elevado efecto de dilución del selenito y una menor superficie de contacto entre el Se y la semilla que al utilizar dosis de Se más altas. Lo anterior, sumado a la alta afinidad que presenta el selenito por las superficies reactivas del suelo, disminuyó la absorción de Se de las plantas debido que se presume que una importante proporción del selenito peletizado en la semilla fue adsorbido en el suelo.

Independiente de la forma de aplicación de Se (peletizado en la semilla o en solución al suelo) se debe considerar que el selenito elevó la concentración de Se foliar a rangos de suficiencia en relación a los requerimientos nutricionales del ganado (NRC, 1983; 2000), mientras que la aplicación de seleniato de sodio incrementó la concentración de Se foliar a niveles considerados tóxicos para los animales. Las diferencias en concentración foliar encontradas con ambas fuentes de Se coinciden con los resultados previamente reportados en la sección 4.2.2.

4.3 Efecto del selenio sobre la capacidad antioxidante y distribución del selenio en *Lolium* perenne bajo distintos niveles de aplicación de S al suelo.

A pesar de que la esencialidad del Se para las plantas continúa siendo un hecho de controversia, los resultados expuestos en la sección 4.2.3 ratifican la existencia de la actividad GSH-Px Se-dependiente reportada en literatura (Hartikainen y Xue, 1999; Hartikainen et al., 2000; Xue y Hartikainen, 2000; Xue et al., 2001; Pennanen et al., 2002; Djanaguiraman et al., 2005) e indican que la actividad GSH-Px se encuentra especialmente relacionada con la forma química de Se suministrada a las plantas más que con la concentración de Se foliar, siendo más eficiente el selenito que el seleniato como inductor de dicha actividad enzimática. Con respecto a las interacciones minerales que regulan el comportamiento de incorporación del Se en los tejidos vegetales, la mayoría de los estudios desarrollados a la fecha se han focalizado en la inhibición competitiva ejercida por el sulfato sobre la absorción, acumulación y distribución del Se en plantas tratadas con seleniato (Banuelos y Meek, 1990; Mikkelsen y Wan, 1990; Yläranta, 1990b; Bell et al., 1992; Wu y Huang, 1992; Zayed y Terry, 1992; Kopsell y Randle, 1997; Zayed et al., 1998; Hopper y Parker, 1999). Sin embargo, existen muy pocos estudios que evalúen el antagonismo selenito-sulfato sobre la absorción y distribución del Se en fracciones orgánicas e inorgánicas en los tejidos vegetales (Asher et al., 1977; Zayed et al., 1998) y el efecto de dosis crecientes de S sobre la actividad GSH-Px no ha sido aún reportado.

En el mes de Septiembre de 2004 se estableció un ensayo en macetas bajo condiciones de invernadero (Figura 26). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aplicación de Se sobre la concentración de Se foliar, sistema antioxidativo y distribución del Se en *Lolium perenne* cv. Aries, a distintos niveles de aplicación de S al suelo. El ensayo contempló la aplicación de una concentración constante de Se por maceta (2 mg Se kg⁻¹ de suelo) bajo la forma de selenito de sodio, una concentración constante de P (400 mg P kg⁻¹ de suelo) y niveles crecientes de S (0, 50 y 100 mg S kg⁻¹ de suelo), dando origen a 3 tratamientos experimentales en función de la dosis de S aplicada al suelo (Control, 50 S y 100 S).



Figura 26. Efecto del Se sobre el sistema antioxidativo y distribución del Se en *Lolium perenne* bajo distintos niveles de aplicación de S al suelo.

4.3.1 Producción de materia seca y concentración mineral en el follaje

En el Tabla 9 se presenta el peso seco y concentración de Se, S, P y N foliar. Según los resultados, no hubo efecto significativo de la aplicación de concentraciones crecientes de S sobre la sobre la concentración de P foliar (Tabla 9) debido a que la concentración de P disponible en el suelo se mantuvo constante, independiente del nivel de adición de S al suelo (Tabla 10). Esto denota la mayor afinidad del fosfato en relación al sulfato por los sitios de adsorción en el suelo, como lo indican los coeficientes de afinidad y capacidad máxima de adsorción obtenidos para ambos aniones a través de las ecuaciones de Freundlich y Langmuir, respectivamente, en los estudios de adsorción en los sistemas simples (sección 4.1.5). Por otra parte, no hubo diferencias significativas en la concentración foliar de N y la concentración de S foliar aumentó significativamente en respuesta a la aplicación de S al suelo (p < 0,05).

Tabla 9. Producción de materia seca foliar y concentración mineral de Se, S, P y N en *Lolium perenne* cv. Aries a distintas dosis de aplicación de S y niveles constantes de aplicación de P (400 mg kg⁻¹) y Se (2 mg kg⁻¹) al suelo.

Tratamiento	Materia seca	Se	S	P	N
(mg S kg ⁻¹ suelo)	(g maceta ⁻¹)	$(mg kg^{-1})$	$(g kg^{-1})$	$(g kg^{-1})$	$(g kg^{-1})$
0	$12,8 \pm 0,9a$	$3,76 \pm 0,48a$	$3,2 \pm 0,2c$	$4,2 \pm 0,1a$	$40,3 \pm 1,2a$
50	$12,8 \pm 0,4a$	$2,49 \pm 0,34b$	$3.9\pm0.1b$	$4,1\pm0,3a$	$41,0 \pm 1,3a$
100	$13,2 \pm 0,8a$	$2,12 \pm 0,20b$	$4,3 \pm 0,1a$	$4,0\pm0,1a$	$40,7 \pm 0,6a$

Valores promedio de 3 repeticiones \pm Desviación estándar (DE). Cifras con letras distintas denotan diferencias significativas según la Prueba de Comparación Múltiple de Promedios de Tukey (p < 0,05).

La concentración de Se foliar disminuyó significativamente en respuesta a la aplicación de S al suelo (p < 0,05). Así, la aplicación de dosis de 50 y 100 mg S kg⁻¹ de suelo disminuyó la concentración de Se foliar en más de 33% comparado con el tratamiento control (sin adición de S). Esta respuesta puede ser difícilmente explicada por la disponibilidad relativa del Se en el suelo, debido a que la adición de S disminuyó sólo escasamente el contenido de Se disponible en el suelo al final del experimento (Tabla 10). Además, es posible que el fosfato compitiera efectivamente con el selenito, reduciendo la absorción de Se por parte de las plantas como ha sido previamente reportado para *Lolium perenne* (Hopper y Parker, 1999). Sin embargo, se debe considerar que el nivel de P disponible se mantuvo constante en el suelo (Tabla 10) lo que implica que si hubiese existido sólo una interacción competitiva selenito-fosfato, la concentración de Se foliar habría disminuido a un nivel constante, independiente de la concentración de S adicionada al suelo.

Puede especularse la ocurrencia de una interacción competitiva ejercida por el sulfato a nivel de la absorción de selenito o bien una interferencia del S en la translocación del Se al follaje de las plantas tratadas con selenito. Aunque Arvy (1989; 1993) determinó que, a diferencia de sulfato, la mayor parte del selenito es absorbido pasivamente por las raíces de las plantas, Zayed et al. (1998) encontraron que la aplicación de concentraciones crecientes de sulfato entre 0,25 y 10 mM inhibió la absorción de selenito en plantas de brócoli en 33%. A su vez, se

ha demostrado que el transporte del Se en plantas de tomate fue parcialmente inhibido por el sulfato, lo que sugiere que el S podría estar involucrado en la absorción y transporte del Se en plantas tratadas con selenito (Asher et al., 1977).

Tabla 10. Propiedades químicas del suelo Vilcún posterior al ensayo de invernadero a distintas dosis de aplicación de S y niveles constantes de aplicación de P (400 mg kg⁻¹) y Se (2 mg kg⁻¹) al suelo.

Tratamiento	pН	Se disponible	S disponible	P Olsen
(mg S kg ⁻¹ soil)	(H_2O)	$(\mu g kg^{-1})$	$(mg kg^{-1})$	$(mg kg^{-1})$
0	$5,35 \pm 0,05a$	$8,5 \pm 0,3a$	10 ± 1c	39 ± 3a
50	$5,41 \pm 0,13a$	$7.8 \pm 0.3b$	$20 \pm 2b$	41± 2a
100	$5,34 \pm 0,07a$	$6,1\pm0,4c$	$33 \pm 3a$	$42 \pm 1a$

Valores promedio de 3 repeticiones ± DE. Cifras con letras distintas denotan diferencias significativas según la Prueba de Comparación Múltiple de Promedios de Tukey a un nivel de significancia del 5%.

La concentración de S foliar aumentó significativamente con la adición de S al suelo (p < 0,05). Aparentemente, no hubo efectos detrimentales del Se sobre la absorción y/o translocación del S al follaje de las plantas. No obstante, de existir algún efecto, podría no ser de una magnitud importante debido a que la concentración de S foliar aumentó progresivamente en respuesta a la aplicación de concentraciones crecientes de S al suelo.

La producción de materia seca no fue afectada por la concentración de Se foliar, debido que la dosis de Se utilizada (2 mg kg⁻¹ de suelo) correspondió a un nivel de aplicación lo suficientemente bajo como para evitar disminuciones en rendimiento y síntomas de toxicidad en las plantas y fue seleccionada a partir de los resultados obtenidos en el primer ensayo de invernadero (sección 4.2.2), en el cual se observó una disminución en producción a concentraciones de Se foliar al menos 40 veces más altas que las registradas en este ensayo. Adicionalmente, el rendimiento de materia seca promedio de este ensayo (12,9 g maceta⁻¹) que consideró 168 plantas por maceta fue equivalente a la producción de materia seca generada en las plantas tratadas con selenito en el primer estudio de invernadero, en el cual el rendimiento

promedio de 40 plantas fue de 2,9 g por maceta. Debido a que en este ensayo se producen 12,9 g de materia seca, este valor es muy similar al rendimiento teóricamente calculado para el primer ensayo (12,2 g de materia seca) al considerar el establecimiento de igual número de plantas por maceta.

4.3.2 Actividad antioxidante del selenio

Se evaluó la influencia de diferentes niveles de adición de S sobre el sistema antioxidativo Sedependiente de las plantas a través de la determinación de la actividad GSH-Px y peroxidación lipídica. Según la Figura 27, la actividad GSH-Px disminuyó significativamente por efecto de la aplicación de S (p < 0,05). La más baja actividad GSH-Px (387,8 \pm 11,6 nmol mg⁻¹ proteína min⁻¹) fue registrada a la concentración de S más alta aplicada (100 mg S kg⁻¹ suelo), mientras que la más alta actividad enzimática (499,3 \pm 4,7 nmol mg⁻¹ proteína min⁻¹) fue observada cuando no se aplicó S al suelo. Esta respuesta en actividad GSH-Px se encuentra estrechamente relacionada con la magnitud de la concentración de Se foliar obtenida para cada nivel de adición de S al suelo.

La menor acumulación de TBARS ($16,1\pm1,3$ nmol MDA g^{-1} peso verde) fue registrada sin la adición de S al suelo (Figura 28). A medida que el suministro de S aumentó, la peroxidación lipídica aumentó significativamente (p<0,05), lo cual fue una consecuencia directa de la disminución de la actividad GSH-Px en el follaje de las plantas.

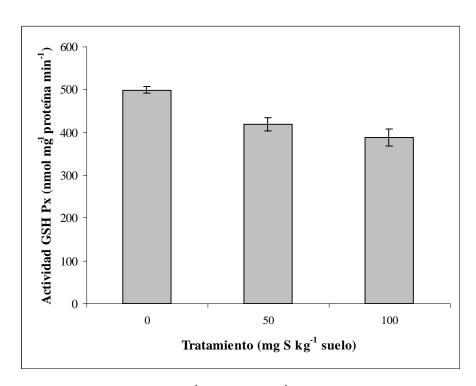


Figura 27. Actividad GSH-Px (nmol mg⁻¹ proteína min⁻¹) en *Lolium perenne* cv. Aries a distintos niveles de aplicación de S y niveles constantes de aplicación de P (400 mg kg⁻¹) y Se (2 mg kg⁻¹) al suelo. Valores promedio de 3 repeticiones ± DE.

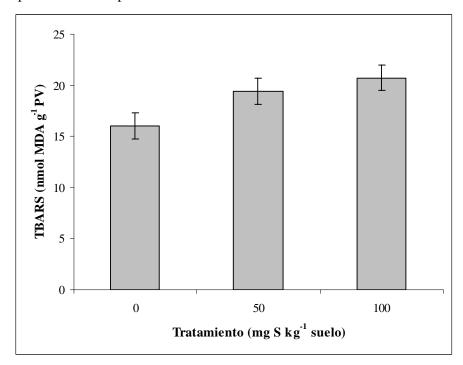


Figura 28. Peroxidación lipídica (nmol MDA g⁻¹ PV) en *Lolium perenne* cv. Aries a distintos niveles de aplicación de S y niveles constantes de aplicación de P (400 mg kg⁻¹) y Se (2 mg kg⁻¹) al suelo. Valores promedio de 3 repeticiones ± DE.

En este estudio, el Se actuó como antioxidante mejorando la actividad GSH-Px y disminuyendo la peroxidación lipídica en respuesta a la concentración de Se foliar, lo que coincide con reportes previos (Hartikainen y Xue, 1999; Hartikainen et al., 2000; Xue y Hartikainen, 2000; Xue et al., 2001; Pennanen et al., 2002; Djanaguiraman et al., 2005). Así, la actividad GSH-Px siguió una tendencia similar a la concentración de Se foliar, lo que denota que dicha actividad enzimática Se-dependiente fue indirectamente influenciada por el nivel de S aplicado al suelo. Es decir, el S aplicado al suelo redujo la concentración de Se foliar, lo cual incidió directamente en las propiedades antioxidantes del Se: disminuyó la actividad GSH-Px (Figura 27) e incrementó la peroxidación lipídica (Figura 28).

4.3.3 Distribución del Se en distintas fracciones en los tejidos vegetales

La Figura 29 muestra que, en todos los tratamientos, la concentración de Se en las distintas fracciones fue en orden decreciente: Se-residual > Se-inorgánico > Se- proteína soluble > Se- aminoácidos libres. Además, la concentración de Se de cada fracción disminuyó significativamente en cada fracción al adicionar S al suelo (p < 0,05). Para cada fracción, la magnitud de la disminución en concentración de Se estuvo relacionada con la reducción en la concentración de Se foliar generada por la adición de S al suelo.

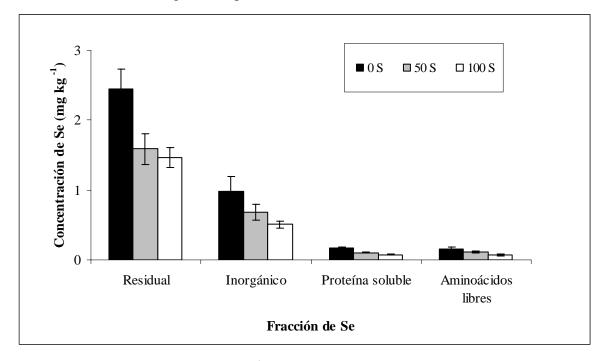


Figura 29. Concentración de Se (mg kg $^{-1}$) en diferentes fracciones de *Lolium perenne* a distintos niveles de S y niveles constantes de aplicación de P y Se al suelo. Promedio de 3 repeticiones \pm DE.

La Figura 30 muestra que la mayor parte del Se (> 73%) se incorporó hacia la fracción orgánica en el follaje (Se-residual, Se-proteína soluble y Se-aminoácidos) independiente de la concentración de S adicionada al suelo. Para todos los tratamientos, la fracción de Seinorgánico fue inferior a 27%. Sin embargo, en consideración a la disminución de la concentración de Se foliar observada al adicionar S al suelo y a que no hubo diferencias significativas en la producción de materia seca entre los distintos tratamientos experimentales (Tabla 9), el contenido de Se (mg Se) de la fracción orgánica disminuyó al aumentar la dosis de aplicación de S al suelo.

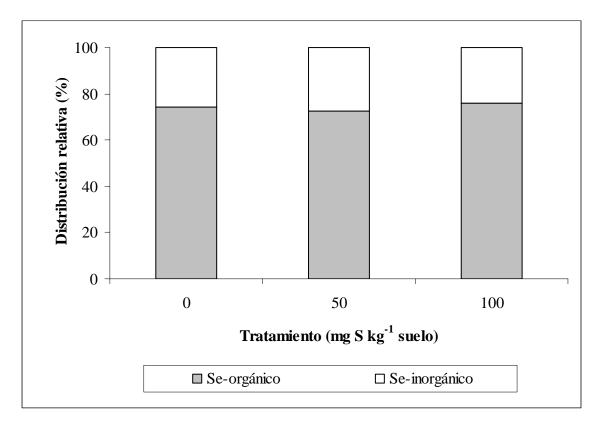


Figura 30. Distribución relativa de las fracciones de Se orgánico e inorgánico en *Lolium perenne* cv. Aries a distintos niveles de aplicación de S y niveles constantes de aplicación de P (400 mg kg⁻¹) y Se (2 mg kg⁻¹) al suelo. Valores promedio de 3 repeticiones ± DE.

La fracción orgánica soluble (correspondiente al Se localizado en las fracciones proteína soluble y aminoácidos libres) fue equivalente a menos del 10% de la concentración de Se total en el follaje. Además, la incorporación del Se a las fracciones de proteína soluble y

aminoácidos libres disminuyó por efecto de la aplicación de S al suelo (Figura 31).

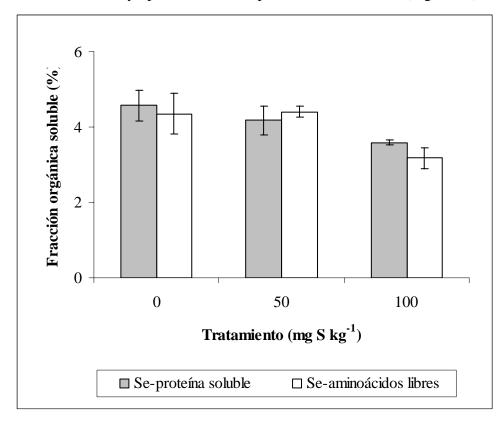


Figura 31. Distribución de la fracción de Se-orgánico soluble en *Lolium perenne* cv. Aries a distintos niveles de aplicación de S y niveles constantes de aplicación de P (400 mg kg⁻¹) y Se (2 mg kg⁻¹) al suelo. Valores promedio de 3 repeticiones ± DE.

La influencia del S aplicado sobre la localización del Se en diferentes fracciones fue evidente al analizar la razón entre la concentración de Se-residual o Se-inorgánico y las fracciones de Se-orgánico soluble (Tabla 11). Así, la incorporación del Se hacia las fracciones de proteína soluble y Se-aminoácidos libres ocurrió más bien a expensas de la fracción de Se-residual más que de la fracción de Se-inorgánico (p < 0,05). Además, la más alta incorporación del Se hacia las fracciones de proteína soluble y aminoácidos libres ocurrió en el tratamiento control y al adicionar 50 mg S kg⁻¹ al suelo. Por lo tanto, la aplicación de S al suelo generó un aumento de la concentración de Se en la fracción residual y disminuyó la incorporación del Se a la fracción orgánica soluble.

Tabla 11. Relación entre la concentración de Se en diferentes fracciones en *Lolium perenne* cv. Aries a distintos niveles de aplicación de S y niveles constantes de aplicación de P (400 mg kg⁻¹) y Se (2 mg kg⁻¹) al suelo.

Tratamiento (mg S kg ⁻¹ suelo)	Se _{Res} /Se _{Prot}	Se _{Res} /Se _{aa}	Se _{Inorg} /Se _{Prot}	Se _{Inorg} /Se _{aa}
0	14,3 ± 0,7 b	15,1 ± 1,2 b	5,7 ± 1,3 a	6,0 ± 1,6 a
50	$15,4 \pm 1,6 \text{ b}$	$14,6 \pm 1,0 \text{ b}$	$6,6 \pm 0,8 \text{ a}$	$6,2 \pm 0,3$ a
100	$19,3 \pm 0,7$ a	$21,9 \pm 1,6$ a	$6,7 \pm 0,3$ a	$7,6 \pm 1,1 \text{ a}$

Valores promedio de 3 repeticiones ± DE. Cifras con letras distintas denotan diferencias significativas según la Prueba de Comparación Múltiple de Promedios de Tukey a un nivel de significancia del 5%.

Los resultados de la migración electroforética efectuada para la fracción proteica de las plantas por medio de SDS-PAGE indican que hubo diferencias en el patrón de bandeo de proteínas entre los distintos tratamientos experimentales. Particularmente, se observó una tendencia a la atenuación de las bandas de peso molecular aproximado de 38 y 15 kDa, y una intensificación de una banda de un peso molecular alrededor de 17 kDa, al incrementar la concentración de S aplicada al suelo (Figura 32). En consideración a la disminución de la actividad GSH-Px (Figura 27) y de la concentración de Se en la fracción proteína soluble (Figura 31), podría especularse que cualquiera de las bandas de proteína que presentaron una atenuación en respuesta a la aplicación de S podría corresponder a la enzima GSH-Px, debido a que Sabeh et al. (1993) purificaron un extracto de *Aloe vera* con actividad GSH-Px y estimaron un peso molecular aparente de 16 kDa para la enzima GSH-Px por electroforesis SDS-PAGE.

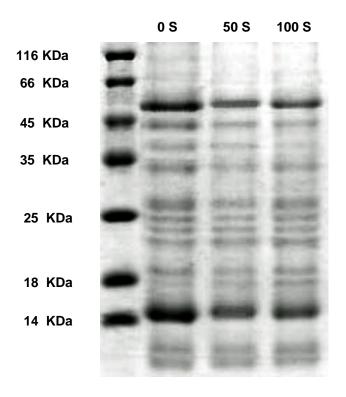


Figura 32. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE de *Lolium perenne* cv. Aries a distintos niveles de aplicación de S y niveles constantes de aplicación de P (400 mg kg⁻¹) y Se (2 mg kg⁻¹) al suelo.

A partir de los resultados anteriormente expuestos, puede inferirse que el S podría interferir en la incorporación específica del Se hacia proteínas en las plantas superiores debido a que la fracción de proteína soluble de las plantas involucra proteínas esenciales como la GSH-Px, que es una proteína tetramérica que contiene residuos de Se-cisteína como parte integral de la enzima (Stadtman, 1980; 1991). Luego, una disminución en la abundancia relativa de la fracción de Se-proteína soluble por efecto de la aplicación de S podría contribuir a explicar las respuestas en actividad GSH-Px observadas en este experimento y, por lo tanto, la reducción de la capacidad antioxidante del Se como consecuencia del incremento de la dosis de aplicación de S al suelo.

4.4 Proyecciones del estudio

Una de las principales limitantes en el estudio de la dinámica del Se en el sistema suelo-planta es la escasa correlación que existe entre el nivel de Se del suelo y la concentración de Se foliar. Esta última parece ser, a la fecha, el indicador más ampliamente aceptado de los requerimientos de Se en la cadena trófica. Considerando la elevada correlación obtenida entre la concentración de Se foliar y el Se disponible en el suelo extraído en agua ácida bajo condiciones de invernadero (sección 4.2.4), esta técnica de extracción de Se se proyecta como una alternativa interesante para la estimación de la concentración de Se en las plantas y, con ello, de la necesidad de la aplicación de Se como fertilizante en función los requerimientos de los animales y seres humanos. Sin embargo, es necesario corrobrorar la buena correlación aquí obtenida a través de la elaboración de una extensa base de datos con información acerca de los niveles de Se disponible en el suelo, rendimiento y concentración de Se foliar de diferentes praderas y cultivos. Además, para las praderas, se debería estudiar la evolución de la concentración de Se foliar en función de la curva de producción de forraje con la finalidad de generar estrategias de fertilización que consideren la dosis de Se y su época de aplicación.

Otro aspecto interesante a destacar es que, por su condición de micronutriente, el Se debe ser aplicado en pequeñas cantidades al suelo, de manera de generar concentraciones en los cultivos y forrajes inferiores al umbral de toxicidad para los animales y el hombre. Considerando que en nuestro país no existen en el mercado fertilizantes que incluyan Se en su formulación, surge la necesidad de generar tecnologías de fertilización con Se en pasturas que sean eficaces y eficientes desde el punto de vista práctico y técnico de su aplicación. Al respecto, el estudio preliminar desarrollado para evaluar el impacto de la tecnología de aplicación de Se peletizado a la semilla de *Lolium perenne* (sección 4.2.5) genera una nueva alternativa para de aplicación de este microelemento cuya efectividad debería evaluarse en estudios bajo condiciones de campo con las especies más utilizadas en los sistemas pratenses del Sur de Chile.

Con respecto al metabolismo del Se en las plantas, es necesario seguir investigando acerca de las vías propuestas para la absorción y asimilación del Se en los tejidos vegetales, a través de

estudios cinéticos de absorción y realizando estudios de la especiación de Se en las raíces y en el follaje de las plantas, así como haciendo uso de herramientas biotecnológicas que involucren la purificación y caracterización de Se-proteínas esenciales como la enzima GSH-Px. Además, en el caso de la interacción selenito/sulfato, es importante determinar con claridad del mecanismo de la absorción de selenito por parte de las plantas y determinar si el efecto antagónico de sulfato sobre selenito que fue observado en este estudio (sección 4.3) corresponde a un efecto de competencia por la vía de absorción y/o implica transformaciones del Se en las raíces de las plantas que disminuyen su translocación y/o asimilación en los tejidos foliares.

5 CONCLUSIONES

- En el Andisol utilizado como modelo, la disponibilidad de Se depende de la especie química aplicada (selenito o seleniato) y de las propiedades químicas y físicoquímicas del suelo. La adsorción de seleniato fue aproximadamente 5 veces más baja que la adsorción de selenito a una concentración de Se inicial de 5 mM y el efecto del pH indica que los mecanismos de adsorción son diferentes. La adsorción de seleniato no modifica la carga superficial del suelo, denotando un mecanismo de unión con la superficie de carácter electrostático, mientras que la adsorción de selenito genera la liberación de OH desde las superficies coloidales al seno de la solución por efecto de su adsorción específica en la superficie a través del mecanismo de intercambio de ligandos.
- Los estudios de adsorción en el suelo a través de los modelos de Langmuir y Freundlich indican que la capacidad de adsorción y el grado de afinidad por las superficies del suelo es en orden decreciente: fosfato > selenito > sulfato > seleniato. En el sistema binario selenito-fosfato no existe simetría de competencia, siendo el fosfato un competidor más fuerte que el selenito, debido a que la competencia no sólo ocurre por los sitios de adsorción sino que también involucra efectos derivados de la penetración en la superficie. En el sistema binario seleniato-sulfato, la adsorción de seleniato disminuye a razones molares seleniato/sulfato inferiores a 3, mientras que sobre este valor la adsorción de seleniato no es afectada por el sulfato adicionado.
- La dinámica de acumulación y asimilación del Se en *Lolium perenne* está directamente relacionada con la dosis y forma química de Se suministrada a las plantas. La concentración de Se foliar aumentó progresivamente con la aplicación de selenito y seleniato al suelo, siendo significativamente superior en las plantas tratadas con seleniato.
- Se El Se es un elemento esencial para *Lolium perenne* debido a que disminuye el estrés oxidativo a través de la actividad GSH-Px, cuya eficiencia es claramente superior en plantas tratadas con selenito en comparación a seleniato.

- La incorporación del Se bajo formas orgánicas es superior a 73% en las plantas fertilizadas con selenito, independiente de la concentración de S aplicada al suelo. La aplicación de S al suelo disminuye la concentración de Se foliar y, con ello, el contenido de Se orgánico, generando una disminución de las fracciones de proteína soluble y aminoácidos libres a expensas de la fracción de Se-residual en las plantas.
- En resumen, la evaluación de un sistema pratense modelo utilizando un Andisol de reacción moderadamente ácida y *Lolium perenne* como planta indicadora, indica que la aplicación de Se al suelo asegura una suficiente cantidad de Se para la nutrición de las plantas y mejora la calidad del forraje debido a que:
 - El rol antioxidante del Se en *Lolium perenne* a través de la actividad GSH-Px indica una disminución de la senescencia y un aumento la persistencia de las pasturas deficientes en Se hasta una concentración de Se foliar de 20 mg Se kg⁻¹ de materia seca. Sobre este umbral de concentración foliar, el Se actúa como prooxidante incrementando la peroxidación lipídica, con disminuciones significativas de la producción de materia seca a concentraciones foliares superiores a 150 mg Se kg⁻¹.
 - La aplicación de selenito al suelo aumenta la asimilación del Se bajo formas orgánicas y, con ello, el aporte de Se orgánico a la dieta de los animales, lo que sugiere un beneficio para la salud animal.

6 REFERENCIAS

Ahlrichs, J.S. and Hossner, L.R. (1987). Selenate and selenite mobility in overburden by saturated flow. J. Environ. Qual. 16: 95–98.

Araneda, P., Wittwer, F., Contreras, P., Ceballos, A., Böhmwald, H., Andaur, M., Kruze, J., Leyán, V. y Matamoros, R. (2001). Actividad de glutatión peroxidasa eritrocítica en rebaños bovinos lecheros de la Región de La Araucanía, Chile y su relación con el contenido de selenio en suelo y forrajes. XXVI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal. Simposio Internacional en Producción Animal y Medio Ambiente, Proceedings. pp: 496–497.

Arvy, M. P. (1989). Some factors influencing the uptake and distribution of selenite in the bean plant (*Phaseolus vulgaris*). Plant Soil. 117: 129–133.

Arvy, M. P. (1993). Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). J. Exp. Bot. 44: 1083–1087.

Asher, C. J., Butler, G. W. and Peterson, P. J. (1977). Selenium transport in root systems of tomato. J. Exp. Bot. 28: 279–291.

Balistrieri, L. S. and Chao, T. T. (1987). Selenium adsorption by goethite. Soil Sci. Soc. Am. J. 51: 1145–1151.

Banuelos G. S. and Meek, D. W. (1989). Selenium accumulation in selected vegetables. J. Plant Nutr. 12: 1255–1272.

Banuelos, G. S. and Meek, D. W. (1990). Accumulation of selenium in plants grown on selenium-treated soil. J. Environ. Qual. 19: 772–777.

Bañuelos, G. S., Lin, Z-Q., Arroyo, I. and Terry, N. (2005). Selenium volatilization in vegeted agricultural drainage sediment from the San Luis Drain, Central Cafifornia. Chemosphere. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.02.033.

Barrow, N. J. (1989). Testing a mechanistic model. IX. Competition between anions for sorption by soil. J. Soil Sci. 40: 415–425.

Barrow, N. J. (1992). The effect of time on the competition between anions for sorption. J. Soil Sci. 43: 421–428.

Barrow, N. J. (1999). The four laws of soil chemistry: the Leeper lecture 1998. Aust. J. Soil Res. 37: 787–829.

Barrow, N. J. and Whelan, B. R. (1989a). Testing a mechanistic model. VII. The effects of pH and of electrolyte on the reaction of selenite and selenate with a soil. J. Soil Sci. 40: 17–28.

Barrow, N. J. and Whelan, B. R. (1989b). Testing a mechanistic model. VIII. The effects of time and temperature of incubation on the sorption and subsequent desorption of selenite and selenate by a soil. J. Soil Sci. 40: 29–37.

Bell, P. F., Parker, D. R. and Page, A. L. (1992). Contrasting selenate-sulfate interactions in selenium-accumulating and nonaccumulating plant species. Soil Sci. Soc. Am. J. 56: 1818–1824.

Berrow, M. L. and Ure, A. M. (1989). Geological materials and soils. En: Ihnat, M. (Ed). Ocurrence and Distribution of Selenium. CRC Press, Boca Raton, FL. pp: 213–242.

Berry, M. J., Banu, L., Chen, Y., Mandel, S. J., Kieffer, J. D., Harney, J. W. and Larsen, P. R. (1991). Recognition of UGA as a selenocysteine codon in Type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. Nature. 353: 273–276.

Birringer, M., Pilawa, S. and Flohé, L. (2002). Trends in selenium biochemistry. Nat. Prod. Rep. 19: 693–718.

Blakemore, L.C., Searle P.L. and Daly B.K. (1987). Methods for chemical analysis of soils. New Zealand Bureau Scientific Report Number 80. NZ Soil Bureau. Lower Hutt, New Zealand. 103 p.

Bolan, N, Mora, M- L., Adriano, D, Mahimairaja, S and Rowarth, J. (2005). A critical review on biological transformation of nutrient elements in acid soils as affected by liming. Trabajo en prepapración.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248–254.

Brown, T. A. and Shrift, A. (1982). Selenium: toxicity and tolerance in higher plants. Biol. Rev. 57: 59–84.

Bujdoš, M., Kubová, J. and Streško, V. (2000). Problems of selenium fractionation in soils rich in organic matter. Anal. Chim. Acta. 408: 103–109.

Cary, E. E. and Gissel-Nielsen, G. (1973). Effect of fertilizer anions on the solubility of native and applied selenium in soil. Soil Sci. Am. Proc. 37: 590–593.

Ceballos, M. A. y Wittwer, F. (1996). Metabolismo del selenio en rumiantes. Arch. Med. Vet. 28: 5–18.

Ceballos, A., Wittwer, F., Contreras, P. A. y Böhmwald, H. (1998). Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa en rebaños lecheros a pastoreo: variación según edad y época del año. Arch. Med. Vet. 30: 13–22.

Chauhan, G. (2003). Selenium: The essential poison. Free Radicals in Biology and Medicine. 77: 222. Paper 4. 11p.

Corah, L. R. and Ives, S. (1991). The effects of essential trace minerals on reproduction in beef cattle. Vet. Clin. N Am.-Food A. 7: 41–57.

Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M. and Thiellement, H. (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. Electrophoresis. 7: 52–54.

Davies, E. B. and Watkinson, J. H. (1966). Uptake of native and applied selenium by pasture species. I. Uptake of selenium by browntop, ryegrass, cocksfoot, and white clover from Atiamuri sand. NZ J. Agric. Res. 9: 317–327.

De Gregori, I., Lobos, G., Lobos, S., Pinochet, H., Potin-Gautier, M. and Astruc, M. (2000). Copper and selenium in raiwater, soils and alfalfa from agricultural ecosystems of Valparaíso Region, Chile. Bol. Soc. Chil. Quím. 45: 131–146.

de Souza, M. P., Pilon-Smits, E. A. H., Lytle, C. M., Hwang, S., Tai, J., Honma, T. S. U., Yeh, L. and Terry, N. (1998). Rate-limiting steps in selenium assimilation and volatilization by Indian mustard. Plant Physiol. 117: 1487–1494.

Djanaguiraman, M., Durga Devi, D., Shanker, A. K., Sheeba, J. A. and Bangarusamy, U. (2005). Selenium – an antioxidative protectant in soybean during senescence. Plant Soil. 272: 77–86.

Du, Z. and Bramlage, W. (1992). Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. J. Agric. Food Chem. 40: 1566–1570.

Dungan, R. S. and Frankenberger, W. T. (1999). Microbial transformations of selenium and the bioremediation of seleniferous environments. Biorem. J. 3: 171–188.

Dungan, R. S., Stork, A. and Frankenberger, W. T. (2000). A wind tunnel for measuring selenium volatilization under field conditions. J. Environ. Qual. 29: 460–466.

Dynes, J. J. and Huang, P. M. (1997). Influence of organic acids on selenite sorption by poorly ordered aluminum hydroxides. Soil Sci. Soc. Am. J. 61: 772–783.

Ellis, D. R. and Salt, D. E. (2003). Plants, selenium and human health. Curr. Opin. Plant Biol. 6: 273–279.

EPA. (1996). Method 3050B. Acid Digestion of Sediments, Sludges and Soils. En: SW-846 On Line. Test Methods for Evaluating Solid Wastes Physical/ Chemical Methods. http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3050b.pdf

Ferry, T., Coccioli, F., De Luca, C., Callegari, C. V. and Morabito, R. (2004). Distribution and speciation of selenium in *Lecythis ollaria* plant. Microchem. J. 78: 195–203.

Fishbein, L. (1991). Selenium. En: Merian, E. (Ed). Metals and their Compounds in the Environment. VCH Publishers, Inc, New York. pp: 1153–1190.

Flohé, L., Günzler, W. A. and Schock, H. H. (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. FEBS Lett. 32: 132–134.

Flohé, L. and Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. En: Methods in Enzymology. Ed. L. Packer. Vol 105: 114–121.

Fu, L-H., Wang, X-F., Eyal, Y., She, Y-M., Donald, L. J., Standing, K. G. and Ben-Hayyim, G. (2002). A selenoprotein in the plant kingdom. Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. J. Biol. Chem. 277: 25983–25991.

Fujii, R., Deverel, S. J. and Hatfield, D. B. (1988). Distribution of selenium in soils of agricultural fields, Western San Joaquin Valley, California. Soil Sci. Soc. Am. J. 52: 1274–1283.

Gissel-Nielsen, G. (1987). Fractionation of selenium in barley and rye-grass. J. Plant Nutr. 10: 2147–2152.

Gissel-Nielsen, G. (2002). Selenium. En: Encyclopedia of Soil Science. Ed. Rattan Lal. Marcel Dekker, Inc. Schoool of Natural Resources. The Ohio State University Columbus, Ohio, USA. 1476 p.

Gissel-Nielsen, G., Gupta, U. C., Lamand, M. and Westermarck, T. (1984). Selenium in soils and plants and its importance in livestock and human nutrition. Adv. Agron. 37: 397–460.

Gladyshev, V. N., Jeang, K-T., Wootton, J. C. and Hatfield, D. L. (1998). A new human selenium-containing protein: Purification, characterization and cDNA sequence. J. Biol. Chem. 273: 8910–8915.

Goh, K-H and Lim, T-T. (2004). Geochemistry of inorganic arsenic and selenium in a tropical soil: effect of reaction time, pH, and competitive anions on arsenic and selenium adsorption. Chemosphere. 55: 849–859.

Gunter, S. A., Beck, P. A. and Phillips, J. M. (2003). Effects of supplementary selenium source on the performance and blood measurements in beef cows and their calves. J. Anim. Sci. 81: 856–864.

Gupta, U. and Gupta, S. (2000). Selenium in soils and crops, its deficiencies in livestock and humans: implications for management. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 31: 1791–1807.

Hartikainen, **H.** (2002). Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on plants.

Selenium-Tellurium development association. ISSN 1682-6353. En: http://www.stda.net/publications/B2002-1.pdf

Hartikainen, H. and Xue, T. (1999). The promotive effect of selenium on plant growth as triggered by ultraviolet irradiation. J. Environ. Qual. 28: 1372–1375.

Hartikainen, H., Ekholm, P., Piironen, V., Xue, T., Koivu, T. and Yli-Halla, M. (1997). Quality of the ryegrass and lettuce yields as affected by selenium fertilization. Agric. Food Sci. Finland. 6: 381–387.

Hartikainen, H., Xue, T. and Piironen, V. (2000). Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. Plant Soil. 225: 193–200.

Hatfield, D., Choi, I., Mischke, S. and Owens, L. (1992). Selenocysteyl-tRNAs recognize UGA in *Beta vulgaris*, a higher plant, and in *Gliocladium virens*, a filamentous fungus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 184: 254–259.

Hayes, K. F., Roe, A. L., Brown, G. E., Hodgson, K. O., Leckie, J. O. and Parks, G. A. (1987). In situ x-ray absorption study of surface complexes: Selenium oxyanions on α-FeOOH. Science. 238: 783–786.

He, L.M., Zelazny, L.W., Baligar, V.C., Ritchey, K.D. and Martens, D.C. (1996). Hydroxyl-sulfate exchange stoichiometry on γ -Al₂O₃ and kaolinite. Soil Sci. Soc. Am. J. 60: 442–452.

He, L.M., Zelazny, L.W., Baligar, V.C., Ritchey, K.D. and Martens, D.C. (1997). Ionic strength effects on sulfate and phosphate adsorption on γ -alumina and kaolinite: Triple-layer model. Soil Sci. Soc. Am. J. 61: 784–793.

Heath, R. and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125: 189–198.

Hingston, F. J., Posner, A. M. and Quirk, J. P. (1974). Anion adsorption by goethite and gibbsite. II. Desorption of anions from hydrous oxide surfaces. J. Soil Sci. 25: 16–26.

Hopper, J. L. and Parker, D. R. (1999). Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. Plant Soil. 210: 199–207.

Huang, W. I., Wen, H. M. and Chern, J. C. (1987). Selenium content of soils, crops and foods in Taiwan area. J. Chin. Agric. Chem. Soc. 25: 150–158.

Kahakachchi, C., Boakye, H. T., Uden, P. C. and Tyson, J. F. (2004). Chromatographic speciation of anionic and neutral selenium compounds in Se-accumulating *Brassica juncea* (Indian mustard) and in selenized yeast. J. Chromatogr. A. 1054: 303–312.

Khattak, R. A., Page, A. L., Parker, D. R. and Bakhtar, D. (1991). Accumulation and interactions of arsenic, selenium, molybdenum and phosphorus in alfalfa. J. Environ. Qual. 20: 165–168.

Kopsell, D. A. and Randle, W. M. (1997). Selenate concentration affects selenium and sulfur uptake and accumulation by 'Granex 33' onions. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 122: 721–726.

Kumpulainen, J., Raittila, A. M., Lehto, J. and Koivistoinen, P. (1983). Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of selenium in foods and diets. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66: 1129–1135.

Lakin, H. W. (1972). Selenium accumulation in soils and its absorption by plants and animals. Geol. Soc. Am. Bull. 83: 181–189.

Laporte, J., Wittwer, F., Contreras, P. A., Morales, H. y Böhmwald, H. (1997). Evaluación del estado nutricional de selenio en bovinos lecheros de la Provincia de Bío-Bío, Chile. X Congreso Nacional de Med. Vet., Valdivia, Chile. pp: 55–56.

Lim, T-T and Goh, K-H. (2005). Selenium extractability from a contaminated fine soil fraction: implication on soil cleanup. Chemosphere. 58: 91–101.

Lin, Z.-Q., de Souza, M., Pickering, I. J. and Terry, N. (2002). Evaluation of the macroalga, muskgrass, for the phytoremediation of selenium-contaminated agricultural drainage water by microcosms. J. Environ. Qual. 31: 2104 – 2110.

Losi, M. E. and Frankenberger, W. T. (1997). Bioremediation of selenium in soil and water. Soil Sci. 162: 692–702.

Maas, J. P. (1983). Diagnosis and management of selenium-responsive diseases in cattle. Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. 5: S393–S399.

Marschner, H. (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed. London Academic Press. 674 p.

Martens, D. A. and Suarez, D. L. (1997). Selenium speciation of soil/sediment determined with sequential extractions and hydride generation atomic absorption spectrophotometry. Environ. Sci. Technol. 31: 133–139.

Mead, R. and Pike, D. J. (1975). A review of response surface methodology from a biometric viewpoint. Biometrics. 31: 803–851.

Mehra, O. and Jackson, M. (1960). Iron oxide removal from soils and clays by a dithionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate. Clays and Clays Minerals. 7: 317 - 327.

Mikkelsen, R. L. and Wan, H. F. (1990). The effect of selenium on sulfur uptake by barley and rice. Plant Soil. 121: 151–153.

Mikkelsen, R. L., Page, A. L. and Haghnia, G. H. (1988). Effect of salinity and its composition on the accumulation of selenium by alfalfa. Plant Soil. 107: 63–67.

Mora, M. L. (2000). Métodos de Análisis Foliar. Laboratorio de Análisis de Suelo y Plantas. Instituto de Agroindustria. Universidad de La Frontera. 15 p.

Murphy, J. and Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta. 27: 31–36.

Nakamaru, Y., Tagami, K. and Uchida, S. (2005). Distribution coefficient of selenium in Japanese agricultural soils. Chemosphere. 58: 1347–1354.

National Research Council (NRC). (1983). Selenium in Nutrition. Revised Edition. Committee on Animal Nutrition. National Academy Press, Washington, D. C. 174 p.

National Research Council (NRC). (2000). Nutrients Requirements of Beef Cattle. Committee on Animal Nutrition. National Academy Press, Washington, D. C. 232 p.

Neal, R. H. (1990). Selenium. En: Alloway, B. J. (Ed). Heavy metals in soils. Blackie and Son Ltd. 339 p.

Neal, R. H. and Sposito, G. (1989). Selenate adsorption on alluvial soils. Soil Sci. Soc. Am. J. 53: 70–74.

Neal, R. H., Sposito, G., Holtzclaw, K. M. and Traina, S. J. (1987a). Selenite adsorption on alluvial soils: I. Soil composition and pH effects. Soil Sci. Soc. Am. J. 51: 1161–1165.

Neal, R. H., Sposito, G., Holtzclaw, K. M. and Traina, S. J. (1987b). Selenite adsorption on alluvial soils: II. Solution composition effects. Soil Sci. Soc. Am. J. 51: 1165–1169.

Novoselov, S., Rao, M., Onoshko, N., Zhi, H., Kryukov, G., Xiang, Y., Weeks, D., Hatfield, D. and Gladyshev, V. (2002). Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system *Chlamydomonas reinhardtii*. EMBO J. 21: 3681–3693.

Nowak, J., Kaklewski, K. and Ligocki, M. (2004). Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and plants. Soil Biol. Biochem. 36: 1553–1558.

Ortman, K. and Pehrson, B. (1999). Effect of selenate as a feed supplement to dairy cows in comparison to selenite and selenium yeast. J. Anim. Sci. 77: 3365–3370.

Pallud, S., Lennon, A-M., Ramauge, M., Gavaret, J-M., Croteau, W., Pierre, M., Courtin, F. and St Germain, D. L. (1997). Expression of the type II iodothyronine deiodinase in cultured rat astrocytes is selenium dependent. J. Biol. Chem.. 272: 18104–18110.

Pardo, M. T. and Guadalix, M. E. (1994). Chemical factors affecting selenite sorption by allophanic soils. Geoderma. 63: 43–52.

Parfitt, R. L. and Wilson, A. D. (1985). Estimation of allophane and halloysite in three sequences of volcanic soils, New Zealand. Catena Supp. 7: 1–8.

Parfitt, R. L. and Childs, C. W. (1988). Estimation of forms of Fe and Al: a review, and analysis of contrasting soils by dissolution and Mössbauer methods. Aust. J. Soil Res. 26: 121–144.

Pehrson, B., Ortman, K., Madjid, N. and Trafikowska, U. (1999). The influence of dietary selenium as selenium yeast or sodium selenite on the concentration of selenium in the milk of suckler cows and on the selenium status of their calves. J. Anim. Sci. 77: 3371–3376.

Pennanen, A., Xue, T. and Hartikainen, H. (2002). Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. J. Appl. Bot. 76: 66–76.

Pezzarossa, B. and Petruzzelli, G. (2001). Selenium in soil: sorption and desorption processes. En: Selim, H. M., Sparks, D. L. (Eds). Heavy Metals Release in Soils. Lewis Publishers, Boca Raton, FL. pp: 191–206.

Pilon-Smits, E. A. H., Hwang, S., Lytle, C. M., Zhu, Y., Tai, J. C., Bravo, R. C., Chen, Y., Leustek, T. and Terry, N. (1999). Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. Plant Physiol. 119: 123 – 132.

Rajan, S. S. (1979). Adsorption of selenite, phosphate and sulphate on hydrous alumina. J. Soil Sci. 30: 709–718.

Rajan, S. S and Watkinson, J. H. (1976). Adsorption of selenite and phosphate on an allophane clay. Soil Sci. Soc. Am. J. 40: 51–54.

Ramauge, M., Pallud, S., Esfandiari, A., Gavaret, J. M., Lennon, A., Pierre, M. and Courtin, F. (1996). Evidence that type III iodothyronine deiodinase in rat astrocyte is a selenoprotein. Endocrinology. 137: 3021–3025.

Rao, M., Carlson, B., Novoselov, S., Weeks, D., Gladyshev, V. and Hatfield, D. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* selenocysteine tRNA^{[Ser]Sec}. RNA. 9: 923–930.

Rosenfeld, I. and Beath, O. A. (1964). Selenium. Geobotany, Biochemistry, Toxicity and Nutrition. New York, Academic Press. 411p.

Ryden, J. C., Syers, J. K. and Tillman, R. W. (1987). Inorganic anion sorption and interactions with phosphate sorption by hydrous ferric oxide gel. J. Soil Sci. 38: 211–217.

Sabeh, F., Wright, T. and Norton, S. J. (1993). Purification and characterization of a glutathione peroxidase from the *Aloe vera* plant. Enzyme Prot. 47: 92–98.

Sadzawka, A., Grez, R., Mora, M. L., Saavedra, N., Carrasco, M. A. y Rojas, C. (2000). Métodos de análisis recomendados para los suelos chilenos. Comisión de Normalización y Acreditación (CNA). Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. 62 p.

Sadzawka, A., Grez, R., Carrasco, M. A. y Mora, M. L. (2004). Métodos de Análisis de

Tejidos Vegetales. Comisión de Normalización y Acreditación (CNA). Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo. 53 p.

Séby, F., Potin Gautier, M., Lespés, G. and Astruc, M. (1997). Selenium speciation in soils after alkaline extraction. Sci. Total Environ. 207: 81–90.

Seppänen, M., Turakainen, M. and Hartikainen, H. (2003). Selenium effects on oxidative stress in potato. Plant Sci. 165: 311–319.

Sheindorf, C. H., Rebhun, M. and Sheintuch, M. (1981). A Freundlich-type multicomponent isotherm. J. Colloid Interf. Sci. 79: 136–142.

Sibbesen, E. (1981). Some new equations to describe phosphate sorption by soils. J. Soil Sci. 32: 67–74.

Sposito, G. (1989). The chemistry of soils. Oxford University Press, New York. 277 p.

Sposito, G., DeWitt, J. C. M. and Neal, R. H. (1988). Selenite adsorption on alluvial soils. III. Chemical modeling. Soil Sci. Soc. Am. J. 52: 947–950.

Stadtman, T. (1980). Selenium-dependent enzymes. Ann. Rev. Biochem. 49: 93–110.

Stadtman, T. (1991). Biosynthesis and function of selenocysteine-containing enzymes. J. Biol. Chem. 266: 16257–16260.

Stork, A., Jury, W. A. and Frankenberger, W. T. (1999). Accelerated volatilization rates of selenium from different soils. Biol. Trace Elem. Res. 69: 217 – 234.

Su, C. and Suarez, D. L. (2000). Selenate and selenite sorption on iron oxides: An infrared and electrophoretic study. Soil Sci. Soc. Am. J. 64: 101–111.

Tabatabai, M.A. (1982). Sulfur. En: Page, A. L., Miller, R.H. y Keeney, D.R. (Eds). Methods of Soil Analysis. Part 2 – Chemical and Microbiological Properties. (2nd ed). pp. 501–538. American Society of Agronomy, Madison, WI.

Takeda, T., Nakano, Y. and Shigeoka, S. (1993). Effects of selenite, CO₂ and illumination on the induction of selenium-dependent glutathione peroxidase in *Chlamydomonas* reinhardtii. Plant Sci. 94: 81–88.

Takeda, T., Miyao, K., Tamoi, M., Kanaboshi, H., Miyasaka, H. and Shigeoka, S. (2003). Molecular characterization of glutathione peroxidase-like protein in halotolerant *Chlamydomonas* sp. W80. Physiol. Plant. 117: 467–475.

Terry, N. and Zayed, A. M. (1998). Phytoremediation of Selenium. En: Frankenberger, W. T., Engberg, R. A. (Eds). Environmental Chemistry of Selenium. Marcel-Dekker Inc., New York. pp: 633–655.

Terry, N., Zayed, A. M., de Souza, M. P. and Tarun A. S. (2000). Selenium in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: 401–432.

Tokunaga, T.K., Lipton, D.S., Benson, S.M., Yee, A.W., Oldfather, J.M., Duckart, E.C., Johannis, P.W. and Halvorsen, K.E. (1991). Soil selenium fractionation, depth profiles and time trends in a vegetated upland at Kesterson Reservoir. Water Air Soil Pollut. 57-58: 31–41.

Vistoso, E., Bolan, N. S., Parfitt, R. L. and Mora, M. L. (2005). Molybdate sorption by Andisols of Southern Chile as affected by phosphate and pH. Eur. J. Soil Sci. 05-124. (Enviado)

Wang, M. C. and Chen, H. M. (2003). Forms and distribution of selenium at different depths and among particle size fractions of three Taiwan soils. Chemosphere. 52: 585–593.

Wang, D. and Sippola, J. (1990). Selenium in soil extracts and plants determined by fluorometry. Ann. Agric. Fenn. 29: 151–156.

Wang, X. C., Yan, W. D., An, Z., Lu, Q., Shi, W. M., Cao, Z. H. and Wong, M. H. (2003). Status of trace elements in paddy soil and sediment in Taihu Lake region. Chemosphere. 50: 707–710.

Whelan, B. R. and Barrow, N. J. (1994). Slow-release selenium fertilizers to correct selenium deficiency in grazing sheep in Western Australia. Fert. Res. 38: 183–188.

Whelan, B. R., Peter, D. W. and Barrow, N. J. (1994a). Selenium fertilizers for pasture grazed by sheep. I. Selenium concentrations in whole blood and plasma. Aust. J. Agric. Res. 45: 863–875.

Whelan, B. R., Barrow, N. J. and Peter, D. W. (1994b). Selenium fertilizers for pasture grazed by sheep. II. Wool and live weight responses to selenium. Aust. J. Agric. Res. 45: 877–887.

Whitehead, D. (2000) Nutrient Elements in Grassland. Soil – Plant – Animal Relatioships. Department of Soil Science. University of Reading, UK. CABI Publishing. 369 p.

Wijnja, H. and Schulthess, C. P. (2000). Interaction of carbonate and organic anions with sulfate and selenate adsorption on aluminum oxide. Soil Sci. Soc. Am. J. 64: 898–908.

Wijnja, H. and Schulthess, C. P. (2002). Effect of carbonate on the adsorption of selenate and sulfate on goethite. Soil Sci. Soc. Am. J. 66: 1190 – 1197.

Wilber, C. G. (1980). Toxicology of selenium: a review. Clin. Toxicol. 17: 171–230.

Wittwer, F., Araneda, P., Ceballos, A., Contreras, P. A., Andaur, M. y Böhmwald, H. (2002). Actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en sangre de bovinos a pastoreo de la IX

Región, Chile y su relación con la concentración de selenio en el forraje. Arch. Med. Vet. 34: 49–57.

Wittwer, F. (2002). Selenio: Requerimientos y respuestas frente a su suplementación estratégica en el ganado. XII Congreso Chileno Medicina Veterinaria. Chillán, Chile. 5p.

Wu, L. and Huang, Z.-Z. (1991). Chloride and sulfate salinity effects on selenium accumulation by tall fescue. Crop Sci. 31: 114–118.

Wu, L. and Huang, Z.-Z. (1992). Selenium assimilation and nutrient element uptake in white clover and tall fescue under the influence of sulphate concentration and selenium tolerance of the plants. J. Exp. Bot. 43: 549–555.

Wu, C.-H., Kuo, C.-Y., Lin, C.-F. and Lo, S.-L. (2002). Modeling competitive adsorption of molybdate, sulfate, selenate and selenite using a Freundlich-type multicomponent isotherm. Chemosphere. 47: 283 – 292.

Wu, L., VanMantgem, P. J. and Guo, X. (1996). Effects of forage plant and field legume species on soil selenium redistribution, leaching, and bioextraction in soils contaminated by agricultural drain water sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 329–338.

Xue, T. and Hartikainen, H. (2000) Association of antioxidative enzymes with the synergistic effect of selenium and UV irradiation in enhancing plant growth. Agric. Food Sci. Finland. 9: 177–186.

Xue, T., Hartikainen, H. and Piironen, V. (2001). Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. Plant Soil. 237: 55–61.

Yläranta, T. (1983a). Effect of added selenite and selenate on the selenium content of Italian rye grass (*Lolium multiflorum*) in different soils. Ann. Agric. Fenn. 22: 139–151.

Yläranta, T. (1983b). Effect of liming and sulphate on the selenium content of Italian rye

grass (Lolium multiflorum). Ann. Agric. Fenn. 22: 152–163.

Yläranta, T. (1983c). Effect of applied selenite and selenate on the selenium content of barley (*Hordeum vulgare*). Ann. Agric. Fenn. 22: 164–174.

Yläranta, T. (1985). Increasing the selenium content of cereal and grass crops in Finland. Academic Dissertation. Agricultural Research Centre, Institute of Soil Science, SF-31600 Jokioinen, Finland. 72 p.

Yläranta, T. (1990a). The selenium content of some agricultural crops and soils before and after the addition of selenium to fertilizers in Finland. Ann. Agric. Fenn. 29: 131–139.

Yläranta, T. (1990b). Effects of liming and the addition of sulphate and phosphate on the selenium content of Italian rye grass. Ann. Agric. Fenn. 29: 141–149.

Yläranta, T. (1991). Effects of the addition of sulphate and phosphate on the leaching of selenite and selenate in acidic soils. Ann. Agric. Fenn. 30: 311–319.

Yläranta, T. (1993). Selenium fertilization in Finland: selenium soil interactions. En: Frøslie, A. (Ed). Problems on Selenium in Animal Nutrition. Proceeding from a NJF symposium at Ås, Norway. Supplement N° 11. pp: 141–149.

Yokota, A., Shigeoka, S., Onishi, T. and Kitaoka, S. (1988). Selenium as inducer of glutathione peroxidase in low-CO₂-grown *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. 86: 649–651.

Zayed, A. M. and Terry, N. (1992). Selenium volatilization in broccoli as influenced by sulfate supply. J. Plant Physiol. 140: 646–652.

Zayed A., Lytle C. M. and Terry, N. (1998). Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. Planta. 206: 284–292.

Zhang, P. and Sparks, D. L. (1990a). Kinetics of selenate and selenite adsorption/desorption at goethite/water interface. Environ. Sci. Technol. 24: 1848–1856.

Zhang, P. and Sparks, D. (1990b). Kinetics and mechanisms of sulfate adsorption/desorption on goethite using pressure-jump relaxation. Soil Sci. Soc. Am. J. 54: 1266–1273.

Zhang, Y. Q. and Frankenberger, W. T. (1999). Effects of soil moisture, depth, and organic amendments on selenium volatilization. J. Environ. Qual. 28: 1321–1326.

Zhang, Y. Q., Frankenberger, W. T. and Moore, J. N. (1999). Effect of soil moisture on dimethylselenide transport nod transformation to non-volatile selenium. Environ Sci. Technol. 33: 3415–3420.