UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA, ALIMENTARIA
Y DE BIOSISTEMAS**

**EFFECTOS DE LA ADICIÓN DE ENMIENDAS ORGÁNICAS Y COMBINACIÓN CON
LA FITOEXTRACCIÓN MEDIANTE EL USO DE DOS ESPECIES VEGETALES
(*Brassica napus* y *Sinapis alba*), EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y
BIOLÓGICAS DE SUELOS MINEROS DE ESPAÑA**

TESIS DOCTORAL- DOCTORADO EN AGROINGENIERÍA

ELIANA MARCELA CÁRDENAS AGUIAR

Madrid, Septiembre de 2019

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE
BIOSISTEMAS

TESIS DOCTORAL

EFFECTOS DE LA ADICIÓN DE ENMIENDAS ORGÁNICAS Y COMBINACIÓN CON LA
FITOEXTRACCIÓN MEDIANTE EL USO DE DOS ESPECIES VEGETALES (*Brassica napus* y
Sinapis alba), EN LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE SUELOS MINEROS
DE ESPAÑA

AUTOR: ELIANA MARCELA CÁRDENAS AGUIAR

Bióloga- Msc. Ingeniería Ambiental

DIRECTORES:

GABRIEL GASCÓ GUERRERO

Catedrático Universidad Politécnica de Madrid

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas

ANA MARÍA MÉNDEZ LÁZARO

Profesora Titular Universidad Politécnica de Madrid

Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas y Energía

Madrid, Septiembre de 2019

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a los directores de la presente tesis, Ana y Gabriel, por su constante ayuda durante el desarrollo del doctorado. Gracias por abrirme las puertas del grupo de investigación y por llenarme de conocimientos. En estos tres años me han permitido crecer como investigadora y como persona. Ana, gracias por tu asesoría en el laboratorio, por tus palabras de aliento y por confiar en mis capacidades. Gabriel, gracias por tus constantes revisiones de mis documentos, por tu apoyo y por darme la oportunidad de guiar el trabajo de otros estudiantes. Gracias por preocuparse por mí pues ya saben que estar lejos de la familia nunca es fácil.

A mis padres, Maria y Tito, quiero agradecerles por su constante e incondicional apoyo y por viajar para estar conmigo. Siempre encontraron la manera de hacerme sentir acompañada. Ustedes son mi motor para seguir adelante. Mami, gracias por escucharme en cada momento sin importar la hora, por ayudarme en los momentos difíciles y por siempre dar el consejo perfecto para seguir adelante. Papi, gracias por tu esfuerzo para brindarme todo lo necesario para llegar aquí, por tus sorpresas y amor incondicional. A mis hermanos, Juan Camilo y Diego, gracias por sus palabras de aliento y por recargar mi energía en cada momento. Los amo familia.

A Marisa gracias por su constante ayuda en el laboratorio, por los momentos de distracción, por siempre estar pendiente de mí y preocuparse por hacerme sentir acompañada durante el tiempo en España. A Iría, gracias por resaltar mis capacidades, cuando dudaba de ellas y por sus recomendaciones para mejorar los métodos del laboratorio. Ana, gracias por ayudarme a ver las cosas desde otra perspectiva. A las tres, agradecerles por los momentos de diversión y por brindarme su amistad. A todas las personas (Orne, Daniel, Ale, Maria, Marly, etc.) que hicieron de mi estancia en España, un momento maravilloso. A mis amigos que desde Colombia me animaban y llenaban de la mejor energía.

Al profesor Saran Sohi por su disposición para guiarme durante la estancia en la Universidad de Edimburgo. A Xuejiao e integrantes del UK Biochar Research Center por su constante ayuda. Al Consejo Social de la UPM por concederme la beca para realizar dicha estancia.

Agradecimientos al Ministerio de Economía y Competitividad por la financiación del proyecto: “Tratamiento de suelos contaminados por metales mediante combinación de técnicas de fitorremediación con adición de biochar (CGL2014-58322-R)” del programa Retos 2014, en el que se enmarca la presente tesis.

“What is a scientist after all? It is a curious man looking through a keyhole, the keyhole of nature, trying to know what's going on”

Jacques Cousteau

LISTA DE TABLAS INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Clasificación de los metales en los suelos (Sumner, 2000).	3
Tabla 2. Concentraciones de metales en los suelos- niveles de fondo (mg kg ⁻¹).	4
Tabla 3. Valores de metales en suelos según legislación filandensa (Tóth et al., 2016).	7
Tabla 4. Inventario nacional de espacios contaminados, actividades industriales y emplazamientos potencialmente contaminados (BOE 114-MOPTMA, 1995).	10
Tabla 5. NGR (mg kg ⁻¹) en base seca para metales en suelos (Consejería de Fomento, Ordenación del Territorio y Medio Ambiente- Principado de Asturias, 2014; Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio- Junta de Andalucía, 2015).	11
Tabla 6. Composición de los residuos mineros (relaves) y del agua asociada en la mina de Aznalcóllar (Eriksson y Adamek, 2000).	13
Tabla 7. Tecnologías de tratamiento de suelos contaminados por metales (Chang y Yen, 2006; Ortiz et al., 2007; Yang et al., 2005).	15
Tabla 8. Clasificación de la biomasa (Vassilev et al., 2010).	19
Tabla 9. Propiedades de los residuos ganaderos según el tipo de materia prima. MV: materia volátil, CF: carbono fijo.	22
Tabla 10. Propiedades de biochar fabricados a partir de residuos ganaderos. MV: materia volátil, CF: carbono fijo.	27
Tabla 11. Efectos de la aplicación de biochar en la movilidad y biodisponibilidad de los metales pesados en el suelo (Zhang et al., 2013).	30
Tabla 12. Propiedades de hidrochar fabricados a partir de residuos ganaderos. MV: materia volátil, CF: carbono fijo.	34
Tabla 13. Técnicas de fitorremediación. Tomado y modificado de: Paz-Ferreiro et al. (2014)...36	
Tabla 14. Plantas que hiperacumuladoras de metales (Bhargava et al., 2012).	38
Tabla 15. Investigaciones sobre la combinación de fitoextracción y adición de biochar.	40
Tabla 16. Estimación de deyecciones producidas en España anualmente (Cueto-García, 2016).	41

LISTA DE TABLAS CAPÍTULO I

Tabla I- 1. Longitudes de onda (λ) y patrones utilizados para cada uno de los elementos de las bases de cambio.	54
Tabla I- 2. Escala para el índice de germinación.	60
Tabla I- 3. Mezclas utilizadas para el montaje de los experimentos.	61
Tabla I- 4. Propiedades físicas y químicas del EC, biocharres e hidrocharres. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$). CE: conductividad eléctrica; C_{oxi} : carbono orgánico fácilmente oxidable; C_{sol} : carbono orgánico soluble; CIC: capacidad de intercambio catiónico; P_{redox} : potencial oxidación-reducción; P_{olsen} : fósforo Olsen, P total: fósforo total.....	68
Tabla I- 5. Concentración metales totales en el EC, biocharres e hidrocharres. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	71
Tabla I- 6. Concentración de metales totales ($mg\ kg^{-1}$) en hidrocharres de purín de cerdo (PC). Modificado de: Song et al., 2017.....	72
Tabla I- 7. Concentración de metales totales ($mg\ kg^{-1}$) en biocharres a partir de residuos animales.	73
Tabla I- 8. Análisis elemental del EC, biocharres e hidrocharres.	75
Tabla I- 9. Fraccionamiento de la materia orgánica mediante UV- visible para el EC, biocharres e hidrocharres. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$)......	77
Tabla I- 10. Pérdidas de peso (P) obtenidas del análisis termo – gravimétrico para el EC, biocharres e hidrocharres.	81
Tabla I- 11. Área superficial S_{BET} y porosimetría del EC, biocharres e hidrocharres. V_{micro} : Volumen de microporos; V_{meso} : Volumen de mesoporos; V_{macro} : Volumen de macroporos. .	82
Tabla I- 12. Propiedades fisicoquímicas de la caracterización inicial de los suelos. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	87

Tabla I- 13. TF de <i>Brassica napus</i> (%) para los tratamientos de GAM.	117
Tabla I- 14. TF de <i>Brassica napus</i> (%) para los tratamientos de PORT.....	117
Tabla I- 15. TF de <i>Sinapis alba</i> (%) para los tratamientos de GAM.	143
Tabla I- 16. TF de <i>Sinapis alba</i> (%) para los tratamientos de PORT.....	144

LISTA DE TABLAS CAPÍTULO II

Tabla II- 1. Mezclas utilizadas para el montaje de los experimentos.....	152
Tabla II- 2. Propiedades físicas y químicas del EC y biocharres. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).....	154
Tabla II- 3. Concentración de metales (mg kg ⁻¹) totales en el EC y biocharres. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	157
Tabla II- 4. Análisis elemental del EC y biocharres.	158
Tabla II- 5. Pérdidas de peso (P) obtenidas del análisis termo – gravimétrico para el EC y los biocharres.....	161
Tabla II- 6. Área superficial SBET y porosimetría del EC y biocharres. Vmicro: Volumen de microporos; Vmeso: Volumen de mesoporos; Vmacro: Volumen de macroporos.	161
Tabla II- 7. Propiedades físico químicas determinadas en la caracterización inicial de los suelos. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	163
Tabla II- 8. TF de <i>Brassica napus</i> (%) para los tratamientos de L32.	181
Tabla II- 9. TF de <i>Brassica napus</i> (%) para los tratamientos de P2.....	181
Tabla II- 10. TF de <i>Sinapis alba</i> (%) para los tratamientos de L32.....	198
Tabla II- 11. TF de <i>Sinapis alba</i> (%) para los tratamientos de P2.....	199

LISTA DE TABLAS CAPÍTULO III

Tabla III- 1. Mezclas utilizadas para el montaje de experimentos. G: gallinaza, CV: carbón vegetal, C: colza, M: Mostaza, R: Riotinto.	207
--	-----

Tabla III- 2. Propiedades físicas y químicas de los materiales de partida gallinaza (G) y carbón vegetal (CV). CE: conductividad eléctrica, Coxi: carbono orgánico fácilmente oxidable, Csol: carbono soluble, CIC: capacidad de intercambio catiónico, Polsen: fósforo Olsen, MV: materia volátil, CF: carbono fijo. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).....	208
Tabla III- 3. Metales totales y fósforo total de los materiales de partida gallinaza (G) y carbón vegetal (CV). Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	210
Tabla III- 4. Análisis elemental de los materiales de partida gallinaza (G) y carbón vegetal (CV).	210
Tabla III- 5. Propiedades fisicoquímicas de la caracterización inicial de los suelos del área de Riotinto. RI-II: represa Riotinto I-II, RIII: represa Riotinto III, RIIS: suelo Riotinto aledaño a la represa III. CE: conductividad eléctrica, Coxi: carbono orgánico fácilmente oxidable, CIC: capacidad de intercambio catiónico. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	211
Tabla III- 6. Factor de translocación (%) de Brassica napus y Sinapis alba para los suelos de Riotinto. Los valores con la misma letra no presentan diferencias según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	233

LISTA DE TABLAS CAPÍTULO IV

Tabla IV- 1. Variaciones en los biocharres posterior al envejecimiento. CIC: capacidad de intercambio catiónico, CE: conductividad eléctrica. El símbolo (-) se refiere a la ausencia de variaciones.	237
Tabla IV- 2. Materiales utilizados para el envejecimiento.....	239
Tabla IV- 3. Análisis elemental de biocharres e hidrocharres. BEC: biochar estiércol de conejo, BPC: biochar purín de cerdo, HEC: hidrochar estiércol de conejo, HPC: hidrochar purín de cerdo.	240
Tabla IV- 4. Pérdidas de peso (P) obtenidas del análisis termo – gravimétrico para los biocharres frescos y envejecidos.....	248

LISTA DE FIGURAS INTRODUCCIÓN

Figura 1. Porcentaje de tierras agrícolas con concentraciones de metales superiores al valor inferior (Tóth et al., 2016).	8
Figura 2. Porcentaje de tierras agrícolas con concentraciones de metales superiores al valor superior (Tóth et al., 2016).	9
Figura 3. Ubicación áreas mineras de Riotinto, Tharsis y Huelva (Chopin y Alloway, 2007).	12
Figura 4. Diagrama esquemático sobre la adición de enmiendas en suelos (Tang et al., 2013). .	19
Figura 5. Representación estructural de biomásas lignocelulósicos (Kambo y Dutta, 2015).	21
Figura 6. Tecnologías termoquímicas que transforman la biomasa en biochar y recursos energéticos renovables (bio-aceite y syngas). a) Temperatura de pirólisis, b) tiempo de residencia, g) % de gas producido, s) % solido producido (biochar), L) % de líquido producido (bio- aceite) (Kuppusamy et al., 2016). Las leyendas encontradas al lado de cada proceso hacen referencias a las ventajas.....	24
Figura 7. Características del biochar (Oliveira et al., 2017).....	26
Figura 8. Conceptos referentes a la producción, aplicación e impacto del hidrochar (Wang et al., 2018).....	32
Figura 9. Características de las especies vegetales usadas para fitoextracción.	37

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO I

Figura I- 1. Área de Gamonedo.	46
Figura I- 2. Área de Portmán.	47
Figura I- 3. Esquema de proceso para la producción de biochar e hidrochar a partir de la biomasa.	48
Figura I- 4. Reactor utilizado para la elaboración de biochar e hidrochar (DEMEDE S.L.).	49

Figura I- 5. Preparación de hidrocharres. a: Autoclave Hastelloy, b: proceso de filtrado, c: Parte sólida retenida.	50
Figura I- 6. Montaje prueba de germinación de Zucconi.	59
Figura I- 7. Esquema montaje de experimentos (ej: GAM).	62
Figura I- 8. Diagrama de Van Krevelen para el EC, biocharres e hidrocharres.	76
Figura I- 9. Curvas TG y dTG para el EC.	79
Figura I- 10. Curvas TG y dTG para el BEC450.	79
Figura I- 11. Curvas TG y dTG para el BEC600.	80
Figura I- 12. Curvas TG y dTG para el HEC190.	80
Figura I- 13. Curvas TG y dTG para el HEC240.	81
Figura I- 14. Análisis FTIR del EC, biocharres e hidrocharres.	83
Figura I- 15. Emisiones CO ₂ para el EC, biocharres e hidrocharres. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan (p= 0.05).	85
Figura I- 16. Índice de germinación para el EC, biocharres e hidrocharres. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan (p= 0.05).	86
Figura I- 17. pH en los suelos control y con Brassica napus: a. GAM y b. PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan (p= 0.05).	89
Figura I- 18. CE (dS m ⁻¹) en los suelos control y con Brassica napus: a. GAM y b. PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan (p= 0.05).	89
Figura I- 19. Fosfomonoesterasa con Brassica napus: a. GAM y b. PORT. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; p= 0.05).	92
Figura I- 20. β-glucosidasa con Brassica napus: a. GAM y b. PORT. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; p= 0.05).	92
Figura I- 21. Deshidrogenasa con Brassica napus: a. GAM y b. PORT. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; p= 0.05).	94

Figura I- 22. Índice GMea con Brassica napus: a. GAM y b. PORT. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	94
Figura I- 23. Biomasa microbiana (C- biomasa) con Brassica napus para GAM. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	96
Figura I- 24. Biomasa microbiana (C- biomasa) con Brassica napus para PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	97
Figura I- 25. Metales totales en los suelos control y con Brassica napus. a. Cd en GAM, b. Cd en PORT, c. V en GAM, d. V en PORT, e. Cr en GAM, f. Cr en PORT, g. Fe en GAM, h. Fe en PORT, i. Co en GAM, j. Co en PORT, k. Ni en GAM, l. Ni en PORT, m. Cu en GAM, n. Cu en PORT, ñ. Zn en GAM, o. Zn en PORT, p. As en GAM, q. As en PORT, r. Al en GAM, s. Al en PORT, t. Pb en GAM, u. Pb en PORT, v. P en GAM, w. P en PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas Duncan ($p= 0.05$).	105
Figura I- 26. Biomasa vegetal de Brassica napus en GAM. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	107
Figura I- 27. Biomasa vegetal de Brassica napus en PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	108
Figura I- 28. BCF de Brassica napus determinado para el Cd. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	109
Figura I- 29. BCF de Brassica napus determinado para el V. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	109
Figura I- 30. BCF de Brassica napus determinado para el Cr. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	110
Figura I- 31. BCF de Brassica napus determinado para el Co. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	110
Figura I- 32. BCF de Brassica napus determinado para el Fe. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	111
Figura I- 33. BCF de Brassica napus determinado para el Ni. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	111

Figura I- 34. BCF de Brassica napus determinado para el Cu. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).....	112
Figura I- 35. BCF de Brassica napus para el Zn. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	113
Figura I- 36. BCF de Brassica napus determinado para el As. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).....	113
Figura I- 37. BCF de Brassica napus determinado para el Al. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).....	114
Figura I- 38. BCF de Brassica napus determinado para el Pb. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).....	114
Figura I- 39. Valores porcentaje de extracción de metales en hojas y tallos de Brassica napus en los tratamientos de Gamonedo.....	119
Figura I- 40. Valores porcentaje de extracción de metales en hojas y tallos de Brassica napus en los tratamientos de Portmán.	119
Figura I- 41. Valores porcentaje de extracción de metales en las raíces de Brassica napus en los tratamientos de Gamonedo.	120
Figura I- 42. Valores porcentaje de extracción de metales en las raíces de Brassica napus en los tratamientos de Portmán.	121
Figura I- 43. pH de los suelos control y con Sinapis alba: a. GAM y b. PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	122
Figura I- 44. CE (dS m^{-1}) de los suelos control y con Sinapis alba: a. GAM y b. PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	122
Figura I- 45. Fosfomonoesterasa para Sinapis alba: a. GAM y b. PORT. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	125
Figura I- 46. β -glucosidasa para Sinapis alba: a. GAM y b. PORT. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	125

Figura I- 47. Deshidrogenasa para <i>Sinapis alba</i> : a. GAM y b. PORT. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	126
Figura I- 48. Índice GMea para <i>Sinapis alba</i> : a. GAM y b. PORT. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$)	126
Figura I- 49. Biomasa microbiana (C- biomasa) de <i>Sinapis alba</i> en GAM. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	127
Figura I- 50. Biomasa microbiana (C- biomasa) de <i>Sinapis alba</i> en PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	128
Figura I- 51. Metales totales en los suelos control y con <i>Sinapis alba</i> . a. Cd en GAM, b. Cd en PORT, c. V en GAM, d. V en PORT, e. Cr en GAM, f. Cr en PORT, g. Fe en GAM, h. Fe en PORT, i. Co en GAM, j. Co en PORT, k. Ni en GAM, l. Ni en PORT, m. Cu en GAM, n. Cu en PORT, ñ. Zn en GAM, o. Zn en PORT, p. As en GAM, q. As en PORT, r. Al en GAM, s. Al en PORT, t. Pb en GAM, u. Pb en PORT, v. P en GAM, w. P en PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas Duncan ($p= 0.05$).	134
Figura I- 52. Biomasa vegetal de <i>Sinapis alba</i> en GAM. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	136
Figura I- 53. Biomasa vegetal de <i>Sinapis alba</i> en PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	136
Figura I- 54. BCF de <i>Sinapis alba</i> determinado para el Cd. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	137
Figura I- 55. BCF de <i>Sinapis alba</i> determinado para el V. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	138
Figura I- 56. BCF de <i>Sinapis alba</i> determinado para el Cr. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	138
Figura I- 57. BCF de <i>Sinapis alba</i> determinado para el Co. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	139
Figura I- 58. BCF de <i>Sinapis alba</i> determinado para el Ni. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	139

Figura I- 59. BCF de Sinapis alba determinado para el Fe. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).....	140
Figura I- 60. BCF de Sinapis alba determinado para el Cu. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).....	140
Figura I- 61. BCF de Sinapis alba determinado para el Zn. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).....	141
Figura I- 62. BCF de Sinapis alba determinado para el As. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).....	142
Figura I- 63. BCF de Sinapis alba determinado para el Al. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).....	142
Figura I- 64. BCF de Sinapis alba determinado para el Pb. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).....	143
Figura I- 65. Valores porcentaje de extracción de metales en hojas y tallos de Sinapis alba en los tratamientos de Gamonedo.	145
Figura I- 66. Valores porcentaje de extracción de metales en hojas y tallos de Sinapis alba en los tratamientos de Portmán.	146
Figura I- 67. Valores porcentaje de extracción de raíces de Sinapis alba en los tratamientos de Gamonedo.....	147
Figura I- 68. Valores porcentaje de extracción de raíces de Sinapis alba en los tratamientos de Portmán.	147

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO II

Figura II- 1. Zonas de muestreo correspondientes al área de Portmán: Suelo Portmán 2 (P2) y Presa 977 II 4 32 (L32).....	150
Figura II- 2. Diagrama de Van Krevelen para el EC y biochares.	158
Figura II- 3. Curvas TG y dTG para el EC.	159
Figura II- 4. Curvas TG y dTG para el B300.....	160

Figura II- 5. Curvas TG y dTG para el B600.	160
Figura II- 6. Índice de germinación para el EC y biochar. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	162
Figura II- 7. pH en los suelos control y con Brassica napus: a. L32 y b. P2. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	165
Figura II- 8. CE (dS m ⁻¹) en los suelos control y con Brassica napus: a. L32 y b. P2. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	165
Figura II- 9. Fosfomonoesterasa con Brassica napus: a. L32 y b. P2. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	167
Figura II- 10. β -glucosidasa con Brassica napus: a. L32 y b. P2. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	167
Figura II- 11. Deshidrogenasa con Brassica napus: a. L32 y b. P2. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	168
Figura II- 12. Índice GMea con Brassica napus: a. L32 y b. P2. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	168
Figura II- 13. Biomasa microbiana (C- biomasa) con Brassica napus para L32. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	169
Figura II- 14. Biomasa microbiana (C- biomasa) con Brassica napus para P2. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	170
Figura II- 15. Metales totales en los suelos control y con Brassica napus. a: Cd en L32, b: Cd en P2, c: Cu en L32, d: Cu en P2, e: Fe en L 32, f: Fe en P2, g: Pb en L32, h: Pb en P2, i: Zn en L32, j: Zn en P2, k: As en L32, l: As en P2.	174
Figura II- 16. Biomasa vegetal de Brassica napus en L32. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	175
Figura II- 17. Biomasa vegetal de Brassica napus en P2. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	176

Figura II- 18. BCF de Brassica napus determinado para el Cd. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	177
Figura II- 19. BCF de Brassica napus determinado para el Cu. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	178
Figura II- 20. BCF de Brassica napus determinado para el Fe. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	179
Figura II- 21. BCF de Brassica napus determinado para el Pb. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	179
Figura II- 22. BCF de Brassica napus determinado para el Zn. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	180
Figura II- 23. BCF de Brassica napus determinado para el As. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	180
Figura II- 24. Valores porcentaje de extracción de metales en hojas y tallos de Brassica napus en los tratamientos de L32.	184
Figura II- 25. Valores porcentaje de extracción de metales en hojas y tallos de Brassica napus en los tratamientos de P2.	184
Figura II- 26. Valores porcentaje de extracción de metales en raíces de Brassica napus en los tratamientos de L32.....	185
Figura II- 27. Valores porcentaje de extracción de metales en raíces de Brassica napus en los tratamientos de P2.....	185
Figura II- 28. pH en los suelos control y con Sinapis alba: a. L32 y b. P2. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$)......	184
Figura II- 29. CE (dS m^{-1}) en los suelos control y con Sinapis alba: a. L32 y b. P2. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	184
Figura II- 30. Fosfomonoesterasa con Sinapis alba: a. L32 y b. P2. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	186

Figura II- 31. β -glucosidasa con <i>Sinapis alba</i> : a. L32 y b. P2. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	186
Figura II- 32. Deshidrogenasa con <i>Sinapis alba</i> : a. L32 y b. P2. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	187
Figura II- 33. Índice GMea con <i>Sinapis alba</i> : a. L32 y b. P2. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$)	187
Figura II- 34. Biomasa microbiana (C- biomasa) con <i>Sinapis alba</i> para L32. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	188
Figura II- 35. Biomasa microbiana (C- biomasa) con <i>Sinapis alba</i> para P2. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	189
Figura II- 36. Metales totales en los suelos control y con <i>Sinapis alba</i> . a: Cd en L32, b: Cd en P2, c: Cu en L32, d: Cu en P2, e: Fe en L 32, f: Fe en P2, g: Pb en L32, h: Pb en P2, i: Zn en L32, j: Zn en P2, k: As en L32, l: As en P2.	192
Figura II- 37. Biomasa vegetal de <i>Sinapis alba</i> en L32. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	193
Figura II- 38. Biomasa vegetal de <i>Sinapis alba</i> en P2. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	194
Figura II- 39. BCF de <i>Sinapis alba</i> determinado para el Cd. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	195
Figura II- 40. BCF de <i>Sinapis alba</i> determinado para el Cu. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	196
Figura II- 41. BCF de <i>Sinapis alba</i> determinado para el Fe. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	196
Figura II- 42. BCF de <i>Sinapis alba</i> determinado para el Pb. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	197
Figura II- 43. BCF de <i>Sinapis alba</i> determinado para el Zn. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	197

Figura II- 44. BCF de Sinapis alba determinado para el As. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	198
Figura II- 45. Valores porcentaje de extracción de metales en hojas y tallos de Sinapis alba en los tratamientos de L32.....	200
Figura II- 46. Valores porcentaje de extracción de metales en hojas y tallos de Sinapis alba en los tratamientos de P2.....	200
Figura II- 47. Valores porcentaje de extracción de metales en raíces de Sinapis alba en los tratamientos de L32.....	201
Figura II- 48. Valores porcentaje de extracción de metales en raíces de Sinapis alba en los tratamientos de P2.....	201

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO III

Figura III- 1. Zonas de muestreo correspondientes al área de Riotinto: Represa I-II (RI-II), Represa III (RIII) y Represa III suelo (RIIIS).	203
Figura III- 2. pH de los suelos tratados. Los valores con la misma letra no presentan diferencias según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).....	212
Figura III- 3. CE ($dS\ m^{-1}$) de los suelos tratados. Los valores con la misma letra no presentan diferencias según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).....	212
Figura III- 4. Fosfomonoesterasa con Brassica napus para el área de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).....	214
Figura III- 5. β -glucosidasa con Brassica napus para el área de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	214
Figura III- 6. Deshidrogenasa con Brassica napus para el área de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	215
Figura III- 7. Índice GMea con Brassica napus para el área de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	215

Figura III- 8. Fosfomonoesterasa con <i>Sinapis alba</i> para el área de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	217
Figura III- 9. β -glucosidasa con <i>Sinapis alba</i> para el área de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	217
Figura III- 10. Deshidrogenasa con <i>Sinapis alba</i> para el área de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	218
Figura III- 11. Índice GMea con <i>Sinapis alba</i> para el área de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$)	218
Figura III- 12. Biomasa microbiana para los suelos de Riotinto control, con <i>Brassica napus</i> y con <i>Sinapis alba</i> . No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	220
Figura III- 13. As total en los suelos de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	222
Figura III- 14. Fe total en los suelos de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	222
Figura III- 15. Pb total en los suelos de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	224
Figura III- 16. P total en los suelos de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	224
Figura III- 17. Biomasa vegetal <i>Brassica napus</i> para los suelos de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	226
Figura III- 18. Biomasa vegetal <i>Sinapis alba</i> para los suelos de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).	226
Figura III- 19. BCF del As para los suelos de Riotinto con <i>Brassica napus</i> y <i>Sinapis alba</i> . Los valores con la misma letra no presentan diferencias según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	227
Figura III- 20. BCF del Fe para los suelos de Riotinto con <i>Brassica napus</i> y <i>Sinapis alba</i> . Los valores con la misma letra no presentan diferencias según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).	228

Figura III- 21. BCF del P para los suelos de Riotinto con Brassica napus y Sinapis alba. Los valores con la misma letra no presentan diferencias según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).229

Figura III- 22. BCF del Pb para los suelos de Riotinto con Brassica napus y Sinapis alba. Los valores con la misma letra no presentan diferencias según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).229

LISTA DE FIGURAS CAPÍTULO IV

Figura IV- 1. Diagrama de Van Krevelen para los biochar frescos y envejecidos. BEC: Biochar estiércol de conejo, BPC: Biochar purín de cerdo, a: materiales frescos, b: materiales envejecidos.241

Figura IV- 2. Porcentaje de estabilidad del C asociado a los biochar envejecidos. BEC: biochar estiércol de conejo, BPC: biochar purín de cerdo.242

Figura IV- 3. Correlación entre la estabilidad de C y la relación O:C de los materiales envejecidos.242

Figura IV- 4. Curva TG (%) para el BEC300 fresco (BEC300a) y envejecido (BEC300b).243

Figura IV- 5. Curva dTG (% min⁻¹) para el BEC300 fresco (BEC300A) y envejecido (BEC300B).244

Figura IV- 6. Curva TG (%) para el BEC600 fresco (BEC600a) y envejecido (BEC600b).245

Figura IV- 7. Curva dTG (% min⁻¹) para el BEC600 fresco (BEC600A) y envejecido (BEC600B).245

Figura IV- 8. Curva TG (%) para el BPC300 fresco (BPC300a) y envejecido (BPC300b).246

Figura IV- 9. Curva dTG (% min⁻¹) para el BPC300 fresco (BPC300A) y envejecido (BPC300B).246

Figura IV- 10. Curva TG (%) para el BPC450 fresco (BPC450a) y envejecido (BPC450b).247

Figura IV- 11. Curva dTG (% min⁻¹) para el BPC450 fresco (BPC450A) y envejecido (BPC450B).247

LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de Varianza
BEC	Biochar Estiércol de Conejo
BOE	Boletín Oficial del Estado
BPC	Biochar Purín de Cerdo
C-biomasa	Biomasa microbiana
CE	Conductividad Eléctrica
CEC	Commission of the European Communities
CIC	Capacidad de Intercambio Catiónico
C _{oxi}	Carbono orgánico fácilmente oxidable
C _{sol}	Carbono orgánico soluble
CTH	Carbonización hidrotermal
CV	Carbón Vegetal
EC	Estiércol de Conejo
FAO	Food and Agriculture Organization
G	Gallinaza
GAM	Gamonado
HEC	Hidrochar estiércol de conejo
HPC	Hidrochar Purín de Cerdo
JRC	Joint Research Centre- European Commission
L32	Lodo 32
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España
NGR	Nivel Genérico de Referencia
P2	Portmán 2

pH	Potencial de hidrógeno
PNRSC	Plan Nacional de Recuperación de Suelos Contaminados
PORT	Portmán 1
R	Riotinto
UPM	Universidad Politécnica de Madrid
USDA	United States Department of Agriculture
USEPA	United States Environmental Protection Agency

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Contaminación de suelos	1
1.2. Contaminación de suelos por metales.....	2
1.3. Normativa de suelos contaminados en España	6
1.4. Situación de los suelos contaminados.....	7
1.5. Minería en España	11
1.6. Técnicas de remediación de suelos contaminados por metales.....	14
1.7. Efectos de la adición de enmiendas: uso de residuos (biomasa), biochar e hidrochar ..	18
1.8. Biomasa – residuos ganaderos	19
1.8.1. Biochar	21
1.8.2. Biochar como enmienda en suelos.....	29
1.8.3. Hidrochar.....	31
1.8.4. Hidrochar como enmienda en suelos	33
1.9. Fitorremediación.....	35
1.10. Fitoextracción.....	36
1.11. Combinación de la fitoextracción con el uso de biochar e hidrochar	39
1.12. Valorización de residuos a partir de biochar e hidrochar	41
2. JUSTIFICACIÓN.....	43
3. OBJETIVOS	44
3.1. Objetivo general	44
3.2. Objetivos específicos:	44

CAPÍTULO I: EFECTOS DE LA ADICIÓN DE ENMIENDAS ORGÁNICAS Y COMBINACIÓN CON LA FITOEXTRACCIÓN EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE DOS SUELOS MINEROS PROVENIENTES DE LAS ÁREAS DE GAMONEDO Y PORTMÁN.....	45
1. OBJETIVOS	45
1.1. Objetivo general	45
1.2. Objetivos específicos	45
2. MATERIALES Y MÉTODOS	46
2.1. Selección de suelos	46
2.2. Selección del residuo	47
2.3. Especificaciones reactor para preparación de biocharres e hidrocharres	47
2.4. Preparación de biocharres	49
2.5. Preparación de hidrocharres	50
2.6. Selección especies para fitoextracción	51
2.7. Caracterización de materiales.....	51
2.7.1. Conductividad eléctrica (CE), pH y potencial de oxidación–reducción (redox).....	51
2.7.2. Carbono orgánico fácilmente oxidable	51
2.7.3. Carbono orgánico soluble.....	52
2.7.4. Fósforo Olsen	53
2.7.5. Capacidad de Intercambio Catiónico	53
2.7.6. Bases de cambio	54
2.7.7. Fraccionamiento de la materia orgánica mediante Visible Ultravioleta (UV).....	55
2.7.8. Análisis termo-gravimétrico (TG, dTG)	56
2.7.9. Isotermas de adsorción y desorción de nitrógeno	56
2.7.10. Análisis elemental	56

2.7.11.	Porosimetría de Hg.....	57
2.7.12.	Espectroscopía de infrarojos por transformada de Fourier (FTIR).....	57
2.7.13.	Concentración de metales totales y fósforo total	58
2.7.14.	Emisiones de CO ₂	58
2.7.15.	Prueba de germinación de Zucconi	59
2.8.	Experimentos de fitoextracción: realización de las mezclas suelo-enmiendas y montaje de experimentos	60
2.9.	Caracterización de las muestras posterior a la incubación.....	62
2.10.	Actividades enzimáticas.....	62
2.10.1	Fosfomonoesterasa.....	62
2.10.2.	β -glucosidasa	63
2.10.3	Deshidrogenasa.....	63
2.11.	Biomasa microbiana	64
2.12.	Determinación de la biomasa vegetal	65
2.13.	Contenido de metales en plantas y suelos	65
2.13.1.	Factor de bioconcentración	65
2.13.2.	Factor de translocación	66
2.14.	Análisis estadístico	66
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
3.1.	Caracterización de materiales.....	67
3.2.	Caracterización de suelos.....	86
3.3.	Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de <i>Brassica napus</i> en el pH, CE y las propiedades biológicas de los suelos.....	88
3.4.	Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de <i>Brassica napus</i> en el contenido de metales en los suelos y fósforo total.....	98

3.5.	Capacidad de fitoextracción de <i>Brassica napus</i>	107
3.5.1.	Producción de biomasa vegetal de <i>Brassica napus</i>	107
3.5.1.	Factor de bioconcentración (BCF) y translocación (TF) de <i>Brassica napus</i>	108
3.5.2.	Porcentajes de extracción de metales de <i>Brassica napus</i>	118
3.6.	Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de <i>Sinapis alba</i> en el pH, CE y las propiedades biológicas de los suelos.....	121
3.7.	Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de <i>Sinapis alba</i> en el contenido de metales en los suelos y fósforo total.....	128
3.8.	Capacidad de fitoextracción de <i>Sinapis alba</i>	135
3.8.1.	Producción de biomasa vegetal de <i>Sinapis alba</i>	135
3.8.2.	Factor de bioconcentración (BCF) y translocación (TF) de <i>Sinapis alba</i>	137
3.8.3.	Porcentajes de extracción de metales de <i>Sinapis alba</i>	145
4.	CONCLUSIONES	148

TABLA DE CONTENIDO CAPÍTULO II

CAPÍTULO II: EFECTOS DE LA ADICIÓN DE ENMIENDAS ORGÁNICAS Y COMBINACIÓN CON LA FITOEXTRACCIÓN EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE UN SUELO MINERO Y UNA PRESA DE RESIDUOS DE FLOTACIÓN PROVENIENTES DEL ÁREA DE PORTMÁN	151
1. OBJETIVOS	151
1.1. Objetivo general.....	151
1.2. Objetivos específicos	151
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	152
2.1. Selección de los suelos	152
2.2. Selección enmiendas	153
2.3. Selección especies para fitoextracción.....	153
2.4. Caracterización de materiales	153
2.5. Experimentos de fitoextracción: realización de las mezclas suelo–enmiendas y montaje de experimentos	154
2.6. Caracterización de las muestras posterior a la incubación	155
2.7. Análisis estadístico.....	155
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	156
3.1. Caracterización de materiales	156
3.2. Caracterización de los suelos.....	164
3.3. Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de <i>Brassica napus</i> en el pH, CE y las propiedades biológicas de los suelos.....	166
3.4. Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de <i>Brassica napus</i> en el contenido de metales en los suelos	173
3.5. Capacidad de fitoextracción de <i>Brassica napus</i>	177

3.6. Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de <i>Sinapis alba</i> en el pH, CE y las propiedades biológicas de los suelos.....	188
3.7. Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de <i>Sinapis alba</i> en el contenido de metales en los suelos	189
3.8. Capacidad de fitoextracción de <i>Sinapis alba</i>	193
4. CONCLUSIONES	202

TABLA DE CONTENIDO CAPÍTULO III

CAPÍTULO III: EFECTOS DE LA ADICIÓN DE GALLINAZA Y CARBÓN VEGETAL Y COMBINACIÓN CON LA FITOEXTRACCIÓN EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE PRESAS MINERAS DEL ÁREA DE RIOTINTO	204
1. OBJETIVOS.....	204
1.1. Objetivo general.....	204
1.2. Objetivos específicos	204
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	205
2.1. Selección de los suelos.....	205
2.2. Selección enmiendas	206
2.3. Selección especies para fitoextracción.....	206
2.4. Caracterización de materiales	206
2.5. Experimentos de fitoextracción: realización de las mezclas suelo–enmiendas y montaje de experimentos	206
2.6. Caracterización de las muestras posterior a la incubación	207
2.7. Análisis estadístico.....	207
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	208
3.1. Caracterización de materiales	208
3.2. Caracterización inicial de los suelos	210
3.3. Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de <i>Brassica napus</i> y <i>Sinapis alba</i> en el pH, CE y las propiedades biológicas de los suelos	212
3.4. Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de <i>Brassica napus</i> y <i>Sinapis alba</i> en la concentración de metales y fósforo total.	224
3.5. Capacidad de fitoextracción de <i>Sinapis alba</i> y <i>Brassica napus</i>	228
4. CONCLUSIONES	235

TABLA DE CONTENIDO CAPÍTULO IV

CAPÍTULO IV: CARACTERIZACIÓN DE BIOCHARES PROCEDENTES DE RESIDUOS GANADEROS POSTERIOR A SU ENVEJECIMIENTO	236
1. INTRODUCCIÓN.....	236
2. OBJETIVOS.....	239
2.1. Objetivo general.....	239
2.2. Objetivos específicos.....	239
3. JUSTIFICACIÓN.....	239
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	240
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	241
6. ONCLUSIONES	250
CONCLUSIONES GENERALES	251
GENERAL CONCLUSIONS	252
REFERENCIAS	253

RESUMEN

La contaminación del suelo se reconoce como la ausencia de productividad del mismo debido a sustancias tóxicas que sobrepasan los límites de autodepuración. La presencia de metales en los suelos se origina naturalmente por el aporte del material parental, no obstante, las concentraciones posiblemente tóxicas son aquellas que provienen de actividades humanas como la minería metálica. Los metales son persistentes y no biodegradables, por lo cual las técnicas para tratarlos son la contención, confinamiento y descontaminación. La presente tesis doctoral se fundamenta en el uso de dos técnicas de descontaminación: adición de enmiendas y fitoextracción.

Las enmiendas se definen como cualquier materia que mejora las propiedades del suelo, específicamente las enmiendas orgánicas son aquellas que puedan mantener o aumentar el contenido de materia orgánica del suelo y mejorar las propiedades del mismo. De acuerdo a esta perspectiva los residuos se convierten en una opción viable cumpliendo la función como enmienda y a la vez valorizando los desechos de actividades agrícolas y ganaderas. Existen diversas materias primas que pueden ser consideradas (restos vegetales, madera, desechos de cosechas, residuos ganaderos), pero son los residuos ganaderos los de especial interés debido al alto contenido en nutrientes y de carbono orgánico. Comúnmente el estiércol de animales se ha adicionado a los suelos sin ningún tipo de tratamiento térmico, sin embargo, se presentan ciertas desventajas como la presencia de patógenos, producción de gases de efecto invernadero, generación de malos olores e incluso dificultades en el almacenamiento y transporte.

La producción de materiales como el biochar y el hidrochar permiten solventar las desventajas previamente descritas para los residuos ganaderos, reconociendo estos como materiales carbonosos producto del tratamiento térmico de la biomasa. El biochar es el resultado del proceso de pirólisis a altas temperaturas en ausencia o limitada cantidad de oxígeno mientras que el hidrochar se fabrica por carbonización hidrotermal, aplicando presión autógena, bajas temperaturas y permite el uso de biomasa húmeda. Actualmente se reconoce la mejora de la calidad del suelo tras la adición de biochar, debido a la liberación lenta de nutrientes, mayor retención de agua, incremento en la biomasa microbiana, etc. El hidrochar por su parte, es un producto reciente que igualmente se le confieren propiedades esenciales para la remediación de suelos.

La fitoextracción se fundamenta en el uso de las plantas para acumular los metales en la biomasa cosechable y las especies acumuladoras se caracterizan por ser resistentes a elevadas

concentraciones de metales, sin embargo, pueden presentar tasas lentas de crecimiento, así como baja producción de hojas, tallos y raíces. Por tal razón se plantea que la combinación de dicha técnica con suelos enmendados con residuos ganaderos, biocharres e hidrocharres puede llegar a potenciar los resultados, teniendo como finalidad maximizar la reducción de los metales presentes en los suelos.

El objetivo general de la presente tesis doctoral es: analizar los efectos de la adición de enmiendas y de su combinación con la técnica de fitoextracción (*Brassica napus* y *Sinapis alba*) en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de suelos mineros de España así como en la extracción de metales en los suelos seleccionados. Para ello se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. Determinar las propiedades fisicoquímicas de las enmiendas orgánicas.
2. Determinar las propiedades fisicoquímicas de los suelos.
3. Evaluar el efecto de la adición de enmiendas y su combinación con la fitoextracción en el pH, conductividad eléctrica y propiedades biológicas de los suelos.
4. Evaluar el efecto de la adición de enmiendas y de su combinación con la fitoextracción en el contenido en metales de los suelos.
5. Analizar la capacidad de fitoextracción y producción de biomasa de *Brassica napus* y *Sinapis alba* en los suelos testigos y enmendados.

La tesis doctoral se encuentra estructurada en cuatro capítulos siguiendo la organización y recolección de muestras del proyecto: “Tratamiento de suelos contaminados por metales mediante combinación de técnicas de fitorremediación con adición de biochar (CGL2014-58322-R) del programa Retos 2014”. La investigación se basa en el tratamiento de un total de siete suelos y residuos mineros productos de la extracción de Zn y Pb en diferentes áreas de España. Los suelos se enmendaron con nueve materiales diferentes y para los ensayos de fitoextracción se mantuvieron las especies *Brassica napus* (colza) y *Sinapis alba* (mostaza) durante todos los montajes de laboratorio. Las primeras muestras obtenidas durante el marco del proyecto corresponden a los suelos Gamoneda (Cantabria) y Portmán 1 (Murcia) y se enmendaron con estiércol de conejo y sus respectivos biocharres (450 °C y 600 °C) e hidrocharres (190 °C y 240 °C), resultando en el primer capítulo. Para el segundo capítulo, las siguientes muestras obtenidas fueron

del área de Portmán (Murcia) catalogadas como suelo Portmán 2 y lodo 32, tratados con estiércol de conejo, biochares fabricados a partir de estiércol de conejo a 300 °C y 600 °C, además de las mezclas de cada uno de los biochares con el estiércol. En el tercer capítulo, se llevó a cabo la mezcla de los suelos con gallinaza y carbón vegetal, los suelos se obtuvieron del área de Riotinto, diferenciados en dos presas mineras y un suelo aledaño, etiquetadas como RI-II, RIII y RIIS.

El capítulo cuatro se diferencia de los restantes, debido a que hace parte de una estancia de investigación en la Universidad de Edimburgo y se planteó con el fin de determinar la estabilidad del carbono asociado a los biochares e hidrochares. Uno de los beneficios que se atribuye a estas enmiendas es el secuestro de carbono en el suelo a largo plazo, pero dicha propiedad no se puede garantizar a menos que se reconozcan los materiales como estables. Con el fin de conocer el comportamiento de los biochares e hidrochares a través del tiempo, se efectuó un proceso de envejecimiento artificial, el cual consiste en acelerar la oxidación de los materiales que naturalmente se da en varios años. Posteriormente se efectuó el análisis elemental y termogravimétrico de las muestras.

El trabajo laboratorio comprende la caracterización inicial de las enmiendas y de los suelos. Las enmiendas utilizadas para el tratamiento de los suelos, se caracterizaron ampliamente determinando las propiedades fisicoquímicas, así como el análisis elemental, inmediato y termogravimétrico y el contenido en metales totales. Los suelos seleccionados también fueron caracterizados y una vez finalizados los montajes de fitoextracción se determinó: el pH y conductividad eléctrica (CE), actividades enzimáticas, biomasa microbiana, biomasa vegetal y concentración de metales totales en los suelos y en las plantas.

Los resultados mostraron el aumento del pH del suelo al agregar biochares en comparación con la adición de hidrochar, tal es el caso de los experimentos del capítulo I. Al cotejar los efectos en suelos enmendados con dos biochares producidos a diferentes temperaturas (Capítulo II), no se observan diferencias significativas. Por último, en los suelos ácidos de Riotinto, capítulo III, se evidencian los beneficios de adicionar enmiendas con pH alcalinos como el caso de la gallinaza y el carbón vegetal, incrementando el pH de los suelos a valores mayores a 7. La CE aumentó en todos los suelos tras la adición de las enmiendas, no obstante existen variaciones entre los tratamientos, siendo los suelos enmendados con biochares los de mayor CE. La presencia de las

especies vegetales *Brassica napus* y *Sinapis alba*, no genera mayores variaciones en el pH y ni en la conductividad eléctrica del suelo.

A nivel de actividades enzimáticas, la media geométrica de las actividades (GMea) resume el comportamiento general de las tres enzimas (Fosfomonoesterasa, β -glucosidasa y deshidrogenasa). En el capítulo I, se puede observar como la presencia de los hidrochares aumenta las enzimas del suelo como resultado de la degradabilidad de dichos materiales. En el capítulo II, para los dos suelos la adición del biochar producido a 600 °C no tiene diferencias en el GMea con los suelos sin enmendar y en ciertos escenarios es incluso menor, lo cual se asoció a la temperatura de pirólisis y el comportamiento de las estructuras de carbono, encontrándose C lábil a bajas temperaturas y C menos disponible (estructuras aromáticas) a mayores temperaturas. En el capítulo III, las actividades enzimáticas incrementan considerablemente con la adición de la gallinaza, lo que se explica debido al bajo contenido de carbono orgánico de los suelos y que aumenta producto de nuevos aportes de C orgánico.

La biomasa microbiana se encuentra directamente relacionada con las actividades de las tres enzimas, por lo cual se evidencia el aumento de la microbiota asociada al suelo con los hidrochares y la gallinaza y la disminución con el biochar a 600 °C, según los respectivos montajes previamente mencionados. Se reconoce que la biomasa es la medición de los microorganismos presentes en el suelo y la medición de las enzimas representa el sustrato disponible para el crecimiento de dicha biomasa. El comportamiento por ende también se encuentra asociado al carbono disponible en el suelo.

Según la normativa europea y los niveles genéricos de referencia determinados para los diferentes metales por las comunidades autónomas de España, los suelos se encuentran contaminados por As, Pb y Zn, en la mayoría de los casos. Los suelos enmendados en todos los casos reducen la cantidad del metal total presente en el suelo, sin embargo, los resultados con la presencia de las especies vegetales *Brassica napus* y *Sinapis alba* no son evidentes, por lo cual la capacidad de fitoextracción de las plantas se basa en los factores de bioconcentración, translocación, cantidad de metal extraído en cada parte del tejido vegetal y los porcentajes de extracción respecto a los suelos sin enmendar.

Los resultados de los factores de bioconcentración y translocación son puntuales en cada metal y dependen del tipo del suelo, pero a nivel general se puede establecer que los metales se

acumulan en las raíces de las plantas y no existe un transporte de los mismos a la parte superior (hojas y tallos). En este apartado se destacan la presencia de síntomas de toxicidad por As en las plantas, lo que se corrobora con los niveles de extracción. Además, en los suelos de Riotinto se concluye que las propiedades y concentraciones de metales en los suelos inhiben la germinación de las especies, pero que la adición de la gallinaza y el carbón vegetal permiten el crecimiento.

En el capítulo IV, se estableció un menor contenido de C en los biocharres e hidrocharres posterior al envejecimiento, según el análisis elemental. De igual forma el %H y %N disminuyen en las enmiendas envejecidas. La relación H/C aumenta respecto a los biocharres e hidrocharres frescos y la relación C/N disminuye. El rango de la relación H/C deseado para el secuestro de C en suelos fluctúa entre ≤ 0.4 y ≤ 0.6 , todas las muestras superan dicho límite. La estabilidad del C asociado a las enmiendas envejecidas no supera el 18%, exceptuando el caso del BEC600 con un 48.96%.

A lo largo del proyecto de investigación se utilizaron diferentes biocharres, hidrocharres y residuos ganaderos, demostrando la mejora en las propiedades del suelo como: mayor contenido de materia orgánica, pH, CE, biomasa vegetal y biomasa microbiana, incluso el estiércol de conejo y la gallinaza sin tratamiento térmico promovieron el crecimiento de las plantas y la reducción de los metales. De igual forma el uso de los hidrocharres permite evidenciar el incremento en las propiedades biológicas de los suelos y genera información en un tema que actualmente se encuentra en desarrollo y del cual existen vacíos.

La mitigación del cambio climático y el secuestro de carbono son temáticas importantes ambientalmente. Asegurar la estabilidad de los materiales agregados al suelo hace parte del análisis del ciclo de vida de dichas enmiendas. Durante la presente tesis doctoral se han establecido los efectos en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los suelos, así como la variación en el contenido en metales posterior a la adición de enmiendas, crecimiento de especies vegetales e incubación durante períodos de dos meses. No obstante, los efectos pueden fluctuar a través del tiempo, generando la necesidad de un análisis a largo plazo. Como primer acercamiento a este estudio se realizó el envejecimiento de los materiales, metodología novedosa, que artificialmente permiten simular el paso de incluso décadas.

ABSTRACT

Soil contamination is the absence of productivity due to toxic substances that exceeds auto depuration limits. Parental material is the natural source of metal in soils but the amount of metals than can be consider as toxic are the product of human activities, for example metal mining. Heavy metals are persistent and non-biodegradable compounds, which are treated with contention, confinement and decontamination techniques. The present dissertation is based in the use of two decontamination techniques: the use of organic amendments and phytoextraction.

The amendments are generally recognized as any feedstock that can improve soil properties, concretely organic amendments play an important role to maintain or enhance the soil organic matter content and at the same time improve soil properties. In this way, the use of organic waste as amendments become a feasible option and in a extend approach give an extra value to the waste of agricultural activities. Nowadays, there are a several raw materials that can be consider (vegetable and crop residues, hardwood, manure) but animal manure have been particularly contemplate due to the high nutrient and organic carbon content. The addition of animal manure is quite common without thermal treatment however this practice involve disadvantages like: presence of pathogens, greenhouses gases production, odour emissions and problems related with the transport and storage.

The production of biochar and hydrochar allows to solve some of the disadvantages above mentioned. Chars are carbonaceous materials and the solid product of the thermal treatment of biomass. Biochar is produced by pyrolysis process at high temperatures and limited oxygen atmosphere, on the contrary hydrochar is obtained by hydrothermal carbonization with autogenous pressure, relatively low temperatures and wet biomass. Currently, the benefits of biochar are widely investigated and this material improve soil quality by some aspects like: slow nutrient release, high water holding capacity, increase of microbial biomass, among others. Hydrochar is a recently product that also have been mentioned as suitable amendment for soil remediation because of its properties.

Phytoextraction is based on the use of plants in order to accumulate the metal in the harvestable biomass and the accumulator species are able to growth and adapt to high heavy metal concentrations, but with limitations regarding to slow growth rate and low production of leaves, stems and roots. According to this matter, the aim of the combination of amended soils, soils mixed

with animal manure, biochars and hydrochars, and the metal phytoextraction is to maximize the results not only in plant growth but also in the decrease of soil metal amount.

The main objective of the present thesis is to analyze the effects of amendments addition and its combination with the metal phytoextraction (*Brassica napus* and *Sinapis alba*) in the physicochemical and biological properties of mining soils from Spain and to establish the variations in the total metal content of the selected soils. **The specific objectives** are the following:

1. Determine the physicochemical properties of the organic amendments.
2. Determine the physicochemical properties of the selected soils.
3. Assess the effect of the amendments addition and its combination with metal phytoextraction in soil pH, electrical conductivity and biological properties.
4. Assess the effect of the amendments addition and its combination with metal phytoextraction in soil metal content.
5. Analyze the phytoextraction capacity and biomass production of *Brassica napus* and *Sinapis alba* in the non-amended and amended soils.

The thesis was divided in four chapters according to the organization and soil sampling of the project: “Treatment of metal contaminated soils with the combination of phytoremediation techniques and biochar addition (CGL2014-58322-R) of the Retos program 2014”. The experimental design included a total of seven mining soils and waste as a result of Zn and Pb extraction in different areas of Spain. The soils were amended with nine materials and for phytoextraction assays two species were selected *Brassica napus* (rapeseed) and *Sinapis alba* (mustard) for all laboratory trials. The first obtained samples in the project correspond to Gamonedo (Cantabria) and Portmán 1 (Murcia) soils and were amended with rabbit manure and the derived biochars (450 °C and 600 °C) and hydrochars (190 °C and 240 °C), this mesocosm belong to the first chapter. For the second chapter, the following samples acquired were located in the Portmán (Murcia) area, listed as Portmán 2 and Lodo 32 and treated with rabbit manure, two rabbit manure derived biochars at 300 °C and 600 °C and the mixed between each biochar and the rabbit manure. For the third chapter, the soils were selected from the Riotinto area and amended with poultry litter and charcoal. Soils correspond to two tailings dam and one mining soil near to the dams labelled as RI-II, RIII and RIIS respectively.

The fourth chapter is different of the three abovementioned and was produced as a result of the PhD stay in the University of Edinburgh. This chapter involve the analysis of biochar and hydrochar carbon stability. One of the benefits attributed to the amendments was the long-term soil carbon sequestration but in order to guarantee this advantage, the stability of the materials must be assured. With that in mind and with the aim of understand the biochar and hydrochar behavior over time, an artificial ageing process was carried out, which consist in an accelerated oxidation of the materials that naturally occurred during several years. After that the aged samples were characterized with elemental and thermogravimetric analysis.

The laboratory work include the initial characterization of the amendments and the soils. The amendments used for soil treatment, were widely characterized with the determination of physicochemical properties and the elemental, immediate and thermogravimetric analysis and total metal content. The selected soils were also characterized and at the end of the phytoextraction trials the pH, electrical conductivity (EC), enzymatic activities, microbial biomass, vegetable biomass and metal content in soils and plants were measured.

The results showed the increase in soil pH values after the addition of biochar compare to the hydrochar addition, as it can be seen in the first chapter. The presence of two biochars at different temperatures did not exhibited significance variations in soil pH (Chapter II). Finally, in the acid soils of Riotinto, Chapter III, the benefit of alkaline amendments addition like the case of poultry litter and charcoal was marked with the raise of soil pH to values greater than 7. The EC increased in all soils after amendments addition, nonetheless some variations occurred between treatments with the highest values for the amended soils with biochar. The growth of the plant species *Brassica napus* y *Sinapis alba*, did not produce fluctuations in the pH and CE values.

For the enzymatic activities, the geometric mean of enzyme activities (GMea) index include the general behavior for the three selected enzymes (Phosphomonoesterase, β -glucosidase and dehydrogenase). In chapter I, the presence of hydrochars increase the soil enzymes due to the degradability of the materials. In chapter II, for both soils the addition of biochar produced at 600 °C did not showed statistical difference with the soils without amendment and in some scenarios the activities were even lower, these results can be associated to the pyrolysis temperature and the response of carbon structures where the C is more labile at lower temperatures and less labile (aromatic carbon structures) at high temperatures. In the chapter III, enzymatic activities had an

obvious increase with the addition of poultry litter due mainly to low content of organic carbon of soil which increase with new source of this carbon.

The microbial biomass is strongly related with the activities of the three enzymes, for that reason the results established the increase with the addition of the hydrochars and the poultry litter and the decrease with the biochar at 600 °C, according to the respective experiments abovementioned. The microbial biomass is the direct measure of soil microorganism and the enzyme activity represents the substrate available for the growth of the microbiota. In that sense the outcomes of this property were also linked with soil available carbon content.

The selected soils were contaminated by As, Pb and Zn, according to the European normative and to the soil screening levels (SSLs) demanded by Spanish autonomic communities. The amended soils in all cases decrease the amount of total metal content, but the results with the presence of *Brassica napus* and *Sinapis alba* were not clearly leading to the analysis of phytoextraction capacity of the plants by the bioconcentration and translocation factors, amount of extracted metals in each part of the plant and extraction percentages determined respect to the control soils.

The bioconcentration and translocation differ in each metal and depends of the soil type, but as a general trend the metals were accumulated in the roots of the plants and there was not transport of these to the above biomass (leaves and stems). Also another result that can be pointed is the presence of As toxicity symptoms in plants outcomes that were supported by extractions levels. Besides the aforesaid behavior, in Riotinto soils the properties and metal content inhibit the germination of the species but the addition of poultry litter and charcoal allow the plant growth.

In the chapter IV, the C content of the aged biochars and hydrochar was lower according to the elemental analysis. The percentage of H and N diminished in the aged amendments. The H/C ratio increased in the fresh biochars and hydrochars but the C/N ratio diminished. The desirable H/C ratio for soils C sequestration are ≤ 0.4 y ≤ 0.6 and all the samples exceed this range. The C stability associated to the aged samples were less than 18%, except the BEC600 sample with a value of 48.96%.

During the research project different biochars, hydrochars and manure waste have been used and all of them demonstrated the improvement of soil properties, for example, the increase of organic matter content, pH, EC, plant biomass, microbial biomass even the rabbit manure and

poultry litter, without thermal treatment, promoted the plant growth and the reduction of soil metal content. Similarly the use of hydrochars increase soil biological properties and generates data about this material that have several information gaps.

Climate change mitigation and C sequestration are essential for the environment. Ensure the stability of the material added to soils is quite important and play a significant role in life cycle analysis. In the present PhD thesis, the effects of amendments addition, plant growth and incubation, on physicochemical and biological soil properties and the variation of metal content have been established after a period of time of two months. The effects can vary with time, so a long term analysis is needed. As a first step, the aged of biochars and hydrochar samples, a new method, can be used to complete this kind of studies. The ageing process is equivalent to soil oxidation on decadal to centennial timescale.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Contaminación de suelos

La alteración de los bienes y servicios del suelo se conoce como degradación y ésta se puede catalogar como física, química o biológica. La contaminación del suelo se considera una degradación química asociada a la ausencia de productividad debido a sustancias tóxicas que superan los límites de autodepuración. El suelo actúa como un sumidero de contaminantes originados por actividades antropogénicas como las actividades industriales, la minería extractiva y la actividades agrícolas y ganaderas (Jiménez- Ballesta y Navarro-Pedreño, 2017).

Actualmente la industrialización masiva y los avances tecnológicos han incrementado la problemática referente a la contaminación ambiental. En el caso de las actividades mineras, se producen grandes cantidades de residuos vertidos al suelo generando pérdida de tierra cultivable, bosques, pastos y causando, de forma indirecta, la contaminación del aire y del agua. Los suelos mineros son hábitat modificados por los humanos que dificultan el establecimiento y crecimiento de vegetación, además de inhibir los procesos de formación del suelo. Estos suelos se clasifican como Tecnosoles, es decir alterados por el desarrollo antropogénico ya sea industrial o artesanal (Blum *et al.*, 2018), son de origen técnico, los cuales pueden contener artefactos (sustancias sólidas o líquidas), material duro técnico o geomembrana, todos influenciados por el hombre. Básicamente son suelos de material parental hecho o expuesto por la actividad humana y los cuales de forma natural no existirían en la superficie de las tierras. En el concepto se incluyen los: vertederos, lodos, escorias, desechos, escombros de minas y cenizas, pavimentos y sus materiales no consolidados, suelos con geomembrana y suelos producidos artificialmente, reconociéndose comúnmente como suelos urbanos o suelos de minas (FAO, 2015).

En general, los suelos mineros se caracterizan por la presencia de pHs ácidos, baja fertilidad, baja capacidad de retención humedad y estructura reducida. Asimismo a estos, se le atribuye la disminución en la calidad del suelo, bajo contenido de materia orgánica y existencia de erosión, entre otros efectos negativos (Li *et al.*, 2019; L. Liu *et al.*, 2018; Puga *et al.*, 2016). Siendo entonces los suelos mineros, suelos antrópicos producto de la explotación, con alteraciones en los perfiles y consecuente modificación de las propiedades naturales de los mismos (Ussiri *et al.*, 2014).

Los impactos negativos causados por la minería dependen del tipo de explotación, es decir, la posible degradación del entorno depende de si la mina es de carbón, de minería metálica o una cantera (Conesa et al., 2006; Wong, 2003). Además, estas actividades pueden desencadenar una serie de impactos a mayor escala como: desastres ambientales, enfermedades, pérdida de biodiversidad e incluso a nivel económico detrimento del bienestar (Li et al., 2019; Y. Liu et al., 2018; Puga et al., 2016). En el suelo, la minería de carbón afecta la estructura del horizonte A, además de generar variaciones en la materia orgánica y los ciclos biogeoquímicos; también disminuye la capacidad de retención de humedad y de intercambio catiónico, disminuye la fertilidad, biodiversidad y capacidad de recuperación del suelo (Xiao et al., 2014).

En la minería metálica el escenario es similar, sin embargo se generan más problemas ambientales con los desechos de la actividad minera que con la operación como tal, debido al drenaje de sustancias ácidas a suelos aledaños (Fernández-Caliani et al., 2009). Entre los efectos negativos de la minería metálica en suelos, se enmarca: la presencia de metales traza, bajo contenido de nutrientes y materia orgánica y la presencia de una textura y estructura desfavorables. Los metales traza son potencialmente peligrosos en cantidades superiores a las naturales, lo que limita la calidad y función de los suelos e inhibe o dificulta el crecimiento de vegetación (Vega et al., 2004).

1.2. Contaminación de suelos por metales

Los metales pesados se pueden hallar de forma natural en el suelo en niveles considerados como traza, es decir concentraciones usualmente menores a 100 mg kg^{-1} y no se catalogan como tóxicos (Alloway, 1995). Las fuentes de metales pueden ser geogénicas o antropogénicas. Las geogénicas provienen del material parental, ya sean rocas sedimentarias, ígneas o carbón. Las antropogénicas se derivan de las actividades industriales como la minería (Bolan et al., 2014). Los metales se encuentran especiados de diferentes formas, pero en el suelo existen especies dominantes como se indica en la Tabla 1 y que pueden actuar como nutrientes o llegar a ser tóxicos (Sumner, 2000).

En general, los suelos contienen casi todos los metales pesados presentes en la tabla periódica en mayor o menor medida. La concentración total de los metales puede incluir todas las formas de los elementos, es decir, (i) iones ligados a la estructura cristalina de los minerales

primarios y secundarios, (ii) los adsorbidos en las superficies de las arcillas, óxidos y carbonatos, (iii) aquellos unidos a la materia orgánica, (iv) los iones libres y (v) los complejos solubles orgánicos e inorgánicos en la solución del suelo, mientras que los metales biodisponibles por su parte, son una fracción de los metales totales que puede estar disponible para las plantas (Alloway, 2013).

Tabla 1. Clasificación de los metales en los suelos (Sumner, 2000).

Símbolo	Elemento	Especie dominante en el suelo	Efecto en plantas y animales
As	Arsénico	AsO_4^{3-}	Tóxico en plantas y animales
Cd	Cadmio	Cd^{2+}	Tóxico en animales
Co	Cobalto	Co^{2+}	Nutriente en plantas y animales
Cr	Cromo	Cr^{3+} , CrO_4^{2-}	Nutriente en animales, Cr^{VI} es carcinogénico
Cu	Cobre	Cu^{2+}	Nutriente en plantas y animales; tóxico en plantas y animales
Ni	Níquel	Ni^{2+}	Nutriente en plantas y animales; tóxico en plantas y animales
Pb	Plomo	Pb^{2+}	Tóxico en plantas y animales
V	Vanadio	$(\text{H}_n\text{V}_{10}\text{O}_{28})^{(6-n)-}$	Nutriente en animales; tóxico en plantas y animales
Zn	Zinc	Zn^{2+}	Nutriente en plantas y animales; tóxico en plantas y animales

La minería metálica produce la presencia de elementos como el Cd, Zn, Pb, Al, Cu, V, Ni, As, entre otros, por encima de los valores de fondo generando un riesgo para la salud humana, así como para las plantas, animales, ecosistemas y otros medios. La toxicidad para los organismos vivos, en este caso se da por la fracción reactiva de los metales, que suelen ser los que están en forma de iones intercambiables o disueltos (L. Liu et al., 2018; Wuana y Okieimen, 2011).

La concentración de metales contenida en el suelo de forma natural varía de acuerdo al lugar y la composición del material parental por lo cual es difícil determinar un valor único para cada metal en los suelos, sin embargo, se han listado algunos valores de fondo dependiendo del lugar. En la Tabla 2 se observan los datos de valores de fondo para ciertos metales definidos para suelos de Europa y el mundo, siendo estos los de vital importancia para el presente estudio (Kabata-Pendias y Pendias, 2001; Salminen et al., 2005; Sumner, 2000).

Tabla 2. Concentraciones de metales en los suelos- niveles de fondo (mg kg^{-1}).

	Suelos de Europa [*] Salminen et al., 2005	Suelos del mundo ^{**} Kabata-Pendias y Pendias, 2001	Suelos ^{***} Sumner, 2000
As	6 (<27.3)	4.7	6
Cd	0.145 (<14)	1.1	0.35
Co	7.0 (<255)	6.9	8
Cr	22,0 (<234)	42	20
Cu	12,0 (<239)	14	30
Ni	14 (<2.560)	18	50
Pb	15 (<886)	25	19
V	33 (<281)	60	90
Zn	48 (<2.270)	62	70

^{*}Hace referencia a la mediana y los valores máximos de concentración.

^{**}Son los valores promedio para los suelos del mundo.

^{***}Valores medios de metales en suelo sin especificar lugar.

La especiación de los metales está ligada a varios factores como: pH del suelo, potencial de oxidación, contenido de arcillas, contenido de óxidos de Fe/Mn, porcentaje de materia orgánica y por último, la existencia de otros aniones y cationes en la solución de suelo. La solubilidad de los metales, generalmente tiende a aumentar a pH ácidos y disminuir a pH básicos con algunas excepciones (As, Mo, Se y Cr). Adicionalmente en condiciones reductoras el Cd, Zn, Ni, Co, Cu y Pb se convierten en sulfuros insolubles (Liu et al., 2018; Wuana y Okieimen, 2011).

Las formas de encontrar los metales en los suelos varían según su especiación e igualmente depende del metal estudiado. El Pb en forma natural típicamente se conoce como galena (PbS), de igual forma se presenta como Pb^{2+} aunque el Pb^{4+} (forma oxidada) también puede existir. A través del tiempo los sulfuros de Pb se oxidan lentamente y pueden llegar a formar carbonatos o unirse a los minerales de arcilla, a los óxidos de Mn y Fe y a la materia inorgánica. La solubilidad del Pb

se ve influenciada por el encalado, donde su posible precipitación se da por altos valores de pH, promoviendo la formación de hidróxidos, fosfatos o carbonatos e incluso de complejos Pb orgánicos generalmente estables. En el escenario de bajos valores de pH aumenta la solubilidad de este metal pero, sigue siendo más lenta la acumulación en las capas orgánicas del suelo (Riffaldi et al., 1976).

El Cr presenta variedad de estados de oxidación, desde Cr^{2+} a Cr^{6+} , asimismo puede formar complejos catiónicos como el $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$ y aniónicos como el CrO_4^{2-} y CrO_3^{3-} . Es el Cr^{3+} la forma más estable y se encuentra naturalmente como óxido mixto cromita $\text{FeO} \cdot \text{Cr}_2\text{O}_3$ aunque, sin embargo, puede contener Al y Mg. El Cr(III) y Cr (VI) son las formas más comunes, en donde el Cr(VI) es el más tóxico y se encuentra ligado al pH, de hecho valores mayores de 6 producen la formación de CrO_4^{2-} , mientras en el caso del Cr(III) es menos móvil disminuyendo a pH 4 y en valores de pH de 5.5 ocurre la completa precipitación (Alloway, 2013).

En el caso del As se ha demostrado limitada afinidad del metal con los complejos orgánicos del suelo y se encuentran como oxianiones tal es el caso del HAsO_4^{2-} , $\text{H}_2\text{AsO}_4^{2-}$, H_2AsO_3^- y HAs_3^{2-} . El arseniato (AsO_4^{3-}) es la forma más común de As (V) en ambientes aeróbicos, mientras que el As_2O_3 es un compuesto frecuente en muchos minerales (Sadiq, 1997). El Cd se suele presentar como iones de Cd (II) y se asemeja químicamente al Zn. Estos elementos son esenciales para la vida y son frecuentes en la naturaleza. El zinc se suele encontrar como minerales de ZnS y en menor grado como ZnCO_3 , Zn_2SiO_4 , ZnO , ZnSO_4 , ZnFe_2O_4 y $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Kiekens, 1995).

El Ni puede encontrarse en varios estados de oxidación en el suelo, pero es el Ni(II) el más estable en todos los escenarios de condiciones redox y de pH. El Ni puede desplazar otros metales en los complejos metal- enzima y modificar las vías metabólicas. La química del Ni es simple y se basa en el Ni^{2+} . En el suelo el compuesto sólido más común de dicho metal es la ferrita de níquel (NiFe_2O_4). Con respecto al pH, valores por encima de 8 generan la presencia de $\text{Ni}(\text{OH})^+$ y Ni^{2+} mientras que en suelos con pH ácido se pueden encontrar el Ni^{2+} , NiSO_4^0 y NiHPO_4 , siendo estos dependientes de las proporciones de SO_4^{2-} y PO_4^{3-} (Sposito y Page, 1984).

El Cu no suele representar un riesgo pues es un material estable cuando se libera al medio. La única forma potencialmente peligrosa es el Cu iónico Cu(II). El Cu se asocia a varios componentes como la materia orgánica del suelo, óxidos de Fe y Mn, silicatos de arcilla y otros

minerales. En suelos ácidos el Cu biodisponible se encuentra en forma de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ mientras que en suelos de pH neutro o alcalinos las plantas obtienen el Cu en forma de $\text{Cu}(\text{OH})_2^0$ (Baker y Senft, 1995). Por su parte el V durante los procesos de formación del suelo se transforma de V^{3+} a la forma oxidada de V^{5+} , los aniones de este último son solubles en un gran rango de pHs. El Co en el ambiente se encuentra en las formas de Co^{+2} y Co^{+3} , desde el punto de vista geogénico el Co se asocia principalmente a minerales magnesioferreos. El Co puede reemplazar el Fe en los iones óxido e hidróxido. El Co se comporta de forma similar que el Zn y el Ni con mayor solubilidad en ambientes ácidos y por ende mayor lixiviación (Hooda, 2010). Por último, en el caso del Al se ha establecido que a pH menores a 5.5, los complejos orgánicos controlan el comportamiento del Al^{3+} , que suele ser la forma más común en suelos (Brown et al., 2008).

1.3. Normativa de suelos contaminados en España

La normativa referente a los suelos contaminados se ha fortalecido con el tiempo. Inicialmente para el año 1986, solo se contaba con unos límites de concentraciones definidos en la directiva 86/278/EEC a nivel europeo (CEC, 1986). Esta directiva, traspuesta a España según el Real Decreto 1310/1990 (BOE 262- MAPA, 1990), hacía alusión específicamente a la protección del medio ambiente, en particular, de los suelos, en la utilización de lodos de depuradora en la agricultura. Posteriormente la Unión Europea para el año 2002 publicó un comunicado denominado: “*Towards a thematic strategy for soil protection*”, en el cual la Comisión Europea propone un marco de referencia y una evaluación de impacto de los suelos, además se explica la necesidad de acciones futuras y medidas para la protección del suelo (EC, 2002).

El Plan Nacional de Recuperación de Suelos Contaminados (PNRSC) se aprobó en 1995 como primer paso ante la problemática de suelos contaminados en España. Este PNRSC (1995-2005) indicaba las actividades industriales, los espacios contaminados y los emplazamientos potencialmente contaminados, así como las actuaciones a desarrollar (BOE 114-MOPTMA, 1995).

De igual forma en el 2005, se publicó el Real Decreto 09/2005 (BOE 15- MAPA, 2005) el cual definió la utilización del Nivel Genérico de Referencia (NGR) para la evaluación de suelos contaminados, entendido como la concentración de una sustancia contaminante en el suelo que no conlleva un riesgo superior al máximo aceptable para la salud humana o los ecosistemas.

Adicionalmente se tiene la ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados, la cual define los suelos contaminados como: *“Aquel cuyas características han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes químicos de carácter peligroso procedentes de la actividad humana, en concentración tal que comporte un riesgo inaceptable para la salud humana o el medio ambiente de acuerdo a los criterios y estándares que se determine por el Gobierno, y así se haya declarado mediante resolución expresa”* (BOE 181- Jefatura de Estado, 2011).

1.4. Situación de los suelos contaminados

A nivel europeo, se reconocen un aproximado de 2.5 millones de sitios potencialmente contaminados según estimaciones a partir de inventarios realizados en el año 2011. Se calcula que el 14% de dichos lugares se encuentran realmente contaminados y requieren alguna medida de remediación. En los suelos, los contaminantes más frecuentes son los metales pesados con un 35%, seguido por el aceite mineral con 24% y los hidrocarburos aromáticos policíclicos con un 11%. (JRC, 2014). Según Tóth et al. (2016) los niveles permitidos de metales pesados en la Unión Europea para los suelos varía de acuerdo al lugar, sin embargo la legislación finlandesa se considera la mejor opción debido a que contempla los valores medios de la mayoría de los sistemas nacionales de Europa, además de ser aplicados en un contexto internacional para los suelos agrícolas. En esta legislación se establece un valor guía inferior y un valor límite superior (Tabla 3). El más alto, es aplicable para el uso del suelo en el sector del transporte y las industrias mientras que el menor se refiere a otros usos del suelo.

Tabla 3. Valores de metales en suelos según legislación finlandesa (Tóth et al., 2016).

Elemento	Valor inferior (mg kg ⁻¹)	Valor superior (mg kg ⁻¹)
Arsénico	10	50
Cadmio	10	20
Cobalto	100	250
Cromo	200	300
Cobre	150	200
Plomo	200	750
Níquel	100	150
Zinc	250	400
Vanadio	150	250

De acuerdo a estos valores, Tóth et al. (2016) realizaron mapas con el porcentaje de áreas que sobrepasan estos límites y en los cuales se pueden evidenciar que para España existe un intervalo entre 0.1 y 10% de tierras agrícolas que sobrepasan el límite inferior de concentración de metales permitido (Figura 1). En el país las tierras agrícolas que exceden el límite superior son bajas y se concentran únicamente en las comunidades autónomas de Galicia, Castilla y León y Extremadura con porcentajes entre 0.1 y 10% (Figura 2).

Figura 1. Porcentaje de tierras agrícolas con concentraciones de metales superiores al valor inferior (Tóth et al., 2016).

Figura 2. Porcentaje de tierras agrícolas con concentraciones de metales superiores al valor superior (Tóth et al., 2016).

No obstante, en el Plan Nacional de Recuperación de Suelos Contaminados (BOE 114-MOPTMA, 1995) se realizó un inventario de los espacios contaminados y potencialmente contaminados por Comunidad Autónoma en España (Tabla 4), siendo este el único inventario que se tiene hasta la fecha y por el cual se establece la necesidad de una actualización, pues las actividades industriales cada vez son mayores y se deben tener lineamientos de partida con el fin último de proteger o remediar los suelos en caso de ser necesario.

Tabla 4. Inventario nacional de espacios contaminados, actividades industriales y emplazamientos potencialmente contaminados (BOE 114-MOPTMA, 1995).

Comunidad Autónoma	Actividades industriales	Emplazamientos inventariados	Emplazamientos caracterizados
Andalucía	1396	618	31
Aragón	717	321	-
Asturias	394	153	12
Baleares	303	12	2
Canarias	396	222	9
Cantabria	238	77	5
Castilla y León	811	399	21
Castilla-La Mancha	287	397	11
Cataluña	4913	577	40
Valencia	2330	307	32
Extremadura	183	29	4
Galicia	860	524	19
Madrid	2277	222	16
Murcia	469	73	8
Navarra	334	23	6
País Vasco	2059	539	30
La Rioja	153	34	3
Ceuta- Melilla	22	5	1
Total	18142	4532	249

Teniendo en cuenta todo lo anterior, las diferentes Comunidades Autónomas han establecido valores de NGR para metales y metaloides de acuerdo a los tres usos genéricos del suelo: (i) industrial, (ii) urbano y (iii) otros usos. Los otros usos hacen referencia a las actividades agrícolas, forestales y ganaderas (Consejería de Fomento, Ordenación del Territorio y Medio Ambiente- Principado de Asturias, 2014; Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio- Junta de Andalucía, 2015). En la Tabla 5 se presentan los NGR para las Comunidades Autónomas de Andalucía y Asturias debido a su interés para el presente estudio (zonas de muestreo aledañas) y los metales de especial importancia.

Tabla 5. NGR (mg kg^{-1}) en base seca para metales en suelos (Consejería de Fomento, Ordenación del Territorio y Medio Ambiente- Principado de Asturias, 2014; Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio- Junta de Andalucía, 2015).

Elemento	Andalucía			Asturias		
	Uso industrial	Uso urbano	Otros usos	Uso industrial	Uso urbano	Otros usos
Arsénico	40	36	36	200	40	40
Cadmio	750	75	25	200	20	2
Cobalto	250	25	24	300	25	25
Cobre	10000	3130	595	4000	400	55
Cromo (III)	10000	10000	10000	10000	10000	10000
Cromo (VI)	100	20	20	50	5	2
Níquel	10000	1530	1530	6500	650	65
Plomo	2750	275	275	800	400	70
Vanadio	3650	365	50	1505	190	50
Zinc	10000	10000	10000	10000	4550	455

1.5. Minería en España

La contaminación de suelos por metales pesados se da por factores antropogénicos como las actividades mineras. En la península Ibérica se presenta una de las más grandes explotaciones mineras, siendo la faja pirítica ibérica (Figura 3) uno de los depósitos de sulfuro de mayor importancia en el mundo. Estos cuerpos minerales, están compuestos en su mayoría por pirita (FeS_2), calcopirita (CuFeS_2), esfalerita (ZnS), galena (PbS) y arsenopirita (FeAsS) y en una menor proporción por rocas enriquecidas de Cu. Dicha zona comprende áreas de Portugal y España (Riotinto y Tharsis) y se encuentra intensamente explotada desde el año 2500 A.C. Por otro lado, se tiene un sector minero cercano, Huelva, en donde las actividades dieron inicio desde 1970 especializada en la fundición de Cu dando lugar a la lixiviación de metales como el As, Cu, Pb y Zn (Chopin y Alloway, 2007).

Figura 3. Ubicación áreas mineras de Riotinto, Tharsis y Huelva (Chopin y Alloway, 2007).

El precio de algunos metales ha hecho que se vuelvan abrir algunas minas, pero, existen zonas mineras abandonadas como es el caso de la minería de plata de Bustarviejo en la Sierra de Guadarrama que asocia a su explotación minerales de arsénico. De igual forma, en Ciudad Real se efectuó la explotación de mercurio en Almadén o el caso de la minería de sulfuros polimetálicos de Riotinto, entre otras (Sierra Almagrega- Las Herrerías, Linares, etc.) (López, 2006). Adicionalmente a lo largo de la historia minera en España se han presentado eventos puntuales de contaminación, siendo la mina de Aznalcóllar y la bahía de Portmán los más evidentes.

El suceso de contaminación del suelo por actividades mineras más importante, fue el caso de la mina de Aznalcóllar. En donde en el año 1998 se presentó el derrame de un estimado entre 1.3 y 1.9 Mt de residuos provenientes de las balsas mineras de la empresa Boliden Apirsa. Se

trataba de una mina de producción de concentrados de zinc, plata, plomo y cobre de un cuerpo minero de piritita. También se tenían bajas concentraciones de arsénico, cadmio, talio entre otros metales. El resultado del vertimiento terminó en la afectación de 4634 ha de suelo en donde 2600 ha se encontraron completamente cubiertas de dichos residuos mineros. Los suelos correspondían a plantaciones de fruta, suelos agrícolas y campos de pastoreo. La composición de los vertidos se presenta en la Tabla 6 (Eriksson y Adamek, 2000).

Tabla 6. Composición de los residuos mineros (relaves) y del agua asociada en la mina de Aznalcóllar (Eriksson y Adamek, 2000).

Elemento	Relaves (%)	Agua de relaves (mg L ⁻¹)
Zn	1	450
Fe	45	80
Cu	0.2	17
Pb	1	3.5
As	0.6	0.2
S	45	1200

Posterior al incidente se utilizaron técnicas de descontaminación que involucraban la excavación del mismo. Una vez implementadas las técnicas, se analizó la concentración de metales y se llevó a cabo una comparación entre dichas concentraciones y los valores de línea base y límites sensibles para el uso del suelo. El resultado permitió concluir que el único metal que no cumplió con los niveles recomendados fue el As mientras que para los otros metales (Cd, Cu, Pb y Zn) el porcentaje de descontaminación fue superior al 70% (Eriksson y Adamek, 2000; Grimalt et al., 1999).

Otros de los casos de explotación minera más grande de España es la bahía de Portmán, situada en la Sierra de Cartagena-La unión. Esta mina se reconocía por su continua explotación de metales como el Pb y Zn. En el año 1957, la empresa Peñarroya decidió iniciar sus operaciones a gran escala con grandes capacidades de procesamiento (10000 t día⁻¹ de piritita). De igual forma, se implementó un mecanismo de flotación con agua de mar. Los estériles fueron depositados en la parte interna de la bahía generando su consecuente contaminación. La cantidad de estériles vertidos era en promedio unas 8000 t día⁻¹ resultando en la introducción de metales pesados al mar mediterráneo y calculándose unas 70 ha de bahía completamente colmatada. Actualmente se

siguen realizando labores de construcción de balsas mineras. No obstante, la bahía se convirtió en un claro ejemplo de contaminación por el inadecuado manejo de los residuos provenientes de actividades mineras (Benedicto et al., 2008).

1.6. Técnicas de remediación de suelos contaminados por metales

Globalmente se reconocen tres categorías en las técnicas de remediación de suelos: *in situ*, *on site* y *ex situ*. La diferencia se refiere al lugar de tratamiento del suelo. En el primer caso, los contaminantes son extraídos en el lugar donde ocurrió la contaminación, sin realizar ninguna excavación. En el segundo, el tratamiento se lleva a cabo en el lugar y se presenta una excavación, finalizando con el retorno del fragmento de suelo descontaminado a su lugar de origen. Finalmente en la categoría *ex situ*, el suelo es excavado y transportado para su tratamiento en otra área (Anca et al., 2011). Por otra parte, según el proceso que actúa en el contaminante, se diferencian cuatro categorías: (i) la eliminación, la cual no implica una separación entre contaminante y el medio por lo que se suele excavar y separar en un lugar previamente seleccionado y se realiza el tratamiento físico, incluso los procesos naturales pueden favorecer a la disminución en la concentración del contaminante (atenuación natural); (ii) la separación por el contrario puede ser por gravedad, por atracción magnética o por tamizado; (iii) la destrucción es más compleja y se trata de la transformación a componentes menos tóxicos (neutralización) o la eliminación química o biológica y (iv) la contención que trata de evitar la movilización del contaminante mediante el uso de muros pantalla o la ubicación en vertederos adecuados (Anca et al., 2011).

En el caso de la contaminación de suelos por metales, como los suelos mineros, generalmente se consideran tecnologías que impliquen la movilización del metal o la inmovilización en el lugar, con el fin último de estabilizar y evitar la lixiviación a otros medios. Considerando que los metales son compuestos no biodegradables y con múltiples estados de oxidación. En la Tabla 7 se resumen las técnicas aplicadas para el tratamiento de suelos contaminados por metales pesados. No obstante, es importante tener en cuenta que las líneas de investigación en la actualidad se dirigen hacia tecnologías eficientes, pero no destructivas, sin dejar a un lado la rentabilidad económica y los efectos generados al ambiente (residuos); en miras finalmente a procesos ligados a un desarrollo sostenible.

Tabla 7. Tecnologías de tratamiento de suelos contaminados por metales (Chang y Yen, 2006; Ortiz et al., 2007; Yang et al., 2005).

	Proceso	Esquema
Técnicas de contención	<p>En estas técnicas se incluyen el uso de barreras para evitar la migración de los metales, sin necesidad de excavación y son métodos <i>in situ</i>. Las barreras pueden ser verticales basadas en el uso de muros de pantalla a partir de mezclas de cemento y hormigón y/o bentonita formando pilotes. También se tienen las barreras horizontales que se elaboran con material sellante, pero su efectividad aún es cuestionable. En el caso de las barreras de suelo seco el fundamento es la desecación del suelo mediante aire seco que circula por pozos verticales u horizontes y el vapor de agua resultante se almacena en pozos de extracción. El sellado profundo igualmente entra en esta categoría, modificando la estructura del suelo (permeabilidad) con materiales plastificantes en forma de lechadas a profundidades entre 20-30 m. Por ultimo las barreras hidráulicas extraen el agua subterránea por drenes, disminuyendo el nivel freático.</p>	<p>El diagrama muestra una sección transversal del suelo. A la izquierda, una zona oscura irregular está etiquetada como 'Area contaminada'. A la derecha, una estructura vertical gris se extiende desde la superficie hasta una capa más profunda etiquetada como 'Sustrato'. La parte superior de esta estructura es un 'Cap'. Justo debajo de la superficie, la estructura se ensancha y está etiquetada como 'Barrera de lodo'. Más abajo, en la parte inferior de la estructura, hay un punto etiquetado como 'Anclaje'.</p>
Técnicas de confinamiento	<p>Se conocen como estabilización/ solidificación y se basan en la reducción de la movilidad por procesos físicos y químicos. La estabilización hace referencia a la transformación de los contaminantes a compuestos de menor solubilidad o toxicidad. La solidificación es la encapsulación en una estructura sólida. En la estabilización físico-química se agregan estabilizantes que precipitan o inmoviliza ciertos metales por la presencia de un mayor pH. En la vitrificación se somete el suelo a altas temperaturas generando un material vítreo estable. Las temperaturas implementadas varían según sea <i>in situ</i> (1600 -2000 °C) o <i>ex situ</i> (1100 -1400 °C) y se aplican por medio de electrodos en el primer caso o generando una corriente eléctrica en hornos en el segundo caso.</p>	<p>El diagrama muestra una sección transversal del suelo con dos electrodos verticales (etiquetados como 'electrodo') insertados. Una línea con un símbolo de onda representa una corriente eléctrica entre ellos. Entre los electrodos, hay una zona con burbujas y se indica 'gases para su tratamiento'. Debajo de esta zona, hay una 'cubierta porosa fría'. En la parte inferior, se ven burbujas que suben, etiquetadas como 'volátiles', y una zona más profunda etiquetada como 'no volátiles'. A la derecha, una estructura horizontal está etiquetada como 'colector de gases'.</p>

Son tratamientos depuradores que se implementan en suelos permeables y en donde los contaminantes no están totalmente adsorbidos. El **lavado** se incluye en esta categoría en donde inicialmente se realiza una excavación del suelo contaminado, seguido por el tamizaje separando físicamente las partículas gruesas de la tierra fina. Luego el lavado se lleva a cabo con extractantes químicos y como último paso se lava con abundante agua con el fin de eliminar las sustancias orgánicas. Una vez se tiene el suelo limpio se retorna al lugar de origen, siendo entonces una técnica de tratamiento *ex situ*. El **flushing** por su parte es una técnica *in situ* que aplica una solución para trasladar los contaminantes a zonas donde se inyectan o infiltran soluciones acuosas o agua.

La **electrocinética** se fundamenta en la movilización del agua, iones y pequeñas partículas cargadas a través una corriente eléctrica de baja intensidad. Es una técnica *in situ* que requiere de electrodos y se pueden desarrollar diferentes tipos de transporte de los iones ya sea por afinidad al electrodo de carga opuesta (electromigración), por diferencia de potencial (electrolisis), por suspensión (electroforesis) o por movimiento del agua en relación a la superficie cargada de las partículas del suelo (electroósmosis).

La **adición de enmiendas** se realiza *in situ* en los horizontes del suelo agregando sustancias orgánicas o inorgánicas. Sin embargo, la incertidumbre recae en la permanencia del tratamiento pues existen modificaciones en el suelo que pueden ser de corto plazo, como cambios en el pH o más duraderas como el secuestro de metales en las arcillas o complejados por enlaces covalentes. Dichas enmiendas pueden ser de carbonatos, zeolitas, fosfatos, minerales de hierro, bentonitas, hidróxido cálcico, compost o levaduras. Así como el uso de materiales carbonos fabricados a partir de residuos vegetales, agrícolas, industriales, urbanos.

<p>Técnicas de descontaminación- tratamientos biológicos</p>	<p>También conocido como biorrecuperación se trata de la disminución de la toxicidad de los metales mediante la actividad biológica natural y sus procesos metabólicos. Se utilizan microorganismos (bacterias), hongos y plantas. En la biotransformación de metales existe una interacción con los microorganismos en dos vías la transformación de los metales por actividad microbiana y la influencia de los metales sobre la población y funciones de esta biota. Los procesos involucrados para la movilización de metales son: lavado, quelación por metabolitos microbianos y sideróforos, transformaciones redox, metilación y consecuente volatilización. Al igual que se relacionan los procesos de biosorción y acumulación intracelular, y precipitación.</p> <p>La fitorrecuperación o fitorremediación es un término que engloba varias técnicas pero que en esencia es el uso de especies vegetales para extraer, acumular, inmovilizar o transformar los contaminantes. En metales se utiliza fundamentalmente la fitoextracción, fitoestabilización y la fitovolatilización.</p>
<p>Tratamiento térmico</p>	<p>Desorción térmica es un proceso incluido en las técnicas de descontaminación como tratamiento térmico <i>on site</i>. Se puede dividir en dos, desorción a bajas temperaturas y desorción a altas temperaturas. No obstante, en el caso de los metales se aplica únicamente altas temperaturas (320 – 560 °C) siendo entonces una técnica catalogada como tratamiento térmico. Se diferencia de la incineración pues se tienen como finalidad la desorción y no la destrucción.</p>

1.7. Efectos de la adición de enmiendas: uso de residuos (biomasa), biochar e hidrochar

Los suelos cumplen cinco funciones principales: (i) soporte de plantas superiores, (ii) control del agua en el sistema hidrológico, (iii) sistema de reciclaje natural, (iv) hábitat de una variedad de organismos y (v) ecosistema de construcción humano. El suelo proporciona nutrientes a las plantas que les permite crecer y desarrollar sus raíces, al igual que sus propiedades pueden llegar a determinar el tipo de vegetación existente y de forma indirecta, delimita el número y tipo de animales que la vegetación logra mantener. Las características del suelo influyen en el destino del agua, así como sus pérdidas, utilización, contaminación y purificación. Cuando se trata del reciclaje, el suelo transforma los desechos y los cuerpos de animales y plantas en material utilizable para las siguientes generaciones de vida en el ecosistema. La diversidad de los organismos presentes en el suelo puede extenderse desde pequeños mamíferos hasta células microscópicas, siendo entonces el hábitat ideal para un sinnúmero de especies. Finalmente, el suelo representa no solo un material de construcción a nivel de ingeniería, sino que es el pilar de cada carretera o construcción, vital para el desarrollo del ser humano (Brady y Weil, 2008).

La contaminación de suelos limita su calidad y por ende sus funciones; la calidad de los suelos es un concepto amplio y con diferentes aproximaciones, en general se refiere al grado de bienestar del suelo para un uso específico, en la agricultura por ejemplo incluye la productividad y sostenibilidad pero si nos enfocamos a nivel Europeo la definición de calidad se ve estrechamente ligada a los niveles de contaminantes en los suelos y sus efectos para mantener las funciones previamente descritas (Sumner, 2000).

La adición de enmiendas (Figura 4) hace parte de las técnicas de descontaminación de suelos (Tabla 7) que permiten mejorar la calidad del mismo, siendo una técnica no destructiva y ambientalmente amigable. Constituye un proceso con largos períodos de tiempo para obtener los resultados esperados y reducir el riesgo de lixiviación de los contaminantes o el paso de estos a los demás organismos de la cadena trófica. Como propuesta viable se tienen particularmente los materiales orgánicos y ricos en carbono (Beesley et al., 2011). Las enmiendas pueden ser residuos ganaderos, biochar y hidrochar, como es el caso del presente estudio, que se enfoca en el uso de estiércol de animales y la conversión térmica de los mismos para ser agregados a los suelos.

Figura 4. Diagrama esquemático sobre la adición de enmiendas en suelos (Tang et al., 2013).

1.8. Biomasa – residuos ganaderos

La biomasa es el único recurso renovable que se puede transformar en cualquier forma de combustible ya sea sólido, líquido o gaseoso. De igual forma en este término están comprendidos los materiales lignocelulósicos, procedentes de material orgánico vivo como la madera y los residuos agrícolas, además agrupa los residuos sólidos municipales y animales, aunque estos últimos no sean lignocelulósicos (Kambo y Dutta, 2015). Vassilev et al. (2010) realizó la clasificación de los tipos de biomasa que figura en la Tabla 8.

Tabla 8. Clasificación de la biomasa (Vassilev et al., 2010).

Biomasa	Subgrupos, variantes y especies
Madera y leña	Coníferas o deciduas; angiospermas o gimnospermas; suaves o blas; tallos, ramas, follaje, cortezas, astillas, aserrín y diversas especies de maderas.
Herbácea y agrícola	Anual y perenne, basada en el campo o en el proceso. Como el césped, flores, pajas y otros residuos.
Acuática	Algas marinas o de agua dulce, macroalgas o microalgas, pastos marinos, kelp.
Residuos animales y humanos	Huesos, huesos de desechos de alimentos, gallinaza y estiércol de animales, etc.

Contaminada y desechos industriales (semi-biomasa)	Residuos sólidos urbanos, madera demolida, lodos de depuradora, residuos de hospitales, lodos de pulpa de papel, fibra, madera contrachapada, paletas y cajas de madera, traviesas de ferrocarril, etc.
--	---

En otras investigaciones también se establece la clasificación de la biomasa en dos grupos. La biomasa de cultivo (cultivos energéticos: i.e. *Miscanthus* y césped) y la biomasa de residuos. La segunda, es la de real importancia para el presente estudio y se incluyen los residuos agroforestales, ganaderos, orgánicos (desechos alimenticios), lodos de depuradora y residuos sólidos urbanos (Kambo y Dutta, 2015).

Típicamente, la biomasa contiene principalmente (i) celulosa $(C_6H_{10}O_5)_x$, (ii) hemicelulosa $(C_5H_8O_4)_m$ y (iii) lignina $[C_9H_{10}O_3(COH_3)_{0.9-1.7}]_n$ (Figura 5). No obstante, la composición depende de la materia prima, siendo estos compuestos los más comunes en biomasa de plantas y árboles. Específicamente se establece que los porcentajes de celulosa en la madera varían entre 39 a 54% mientras que en los residuos provenientes de actividades agrícolas es de 24 a 50%. La hemicelulosa tiene bajas proporciones con intervalos de 11 a 36% en la madera y 22 a 35% en los restos de cultivos (maíz, cáscaras de olivo, trigo). Por último, la madera tiene un contenido en lignina de 17-30% mientras que en los desechos de cultivos agrícolas es de 7-29% (Kambo y Dutta, 2015; Nizamuddin et al., 2017).

Habitualmente la estabilidad térmica y la solubilidad en el agua entre dichos componentes también difieren. La hidrólisis en la lignina comienza a partir de los 600 °C en condiciones ambientales, siendo estable en la madera y altamente insoluble en agua. El rompimiento de la hemicelulosa es sencillo debido a su estructura amorfa y se puede degradar en agua alrededor de los 160 °C y en condiciones estándares alrededor de los 200-300 °C. La celulosa por su parte no es soluble en agua, pero puede ser hidrolizada en agua subcrítica a alrededor de los 180 °C y en condiciones estándar a 300-400 °C (Kambo y Dutta, 2015). Considerando los diferentes tipos de biomasa, los residuos ganaderos se han posicionado como una herramienta viable. Esta biomasa contiene incluso mayor contenido en nutrientes que los residuos de cultivos o restos vegetales (Shinogi, 2004) y las cantidades de producción son cada vez más altas.

La Tabla 9 muestra algunas propiedades físicas y químicas de los diferentes residuos ganaderos que se han utilizado en algunas investigaciones. Los residuos ganaderos destacan por la

presencia de pH alcalinos o cerca a la neutralidad, altas concentraciones de carbono, gran proporción de materia volátil y elevado contenido de cenizas en la mayoría de las materias primas, siendo este último factor esencial respecto a los rendimientos de producción debido a que a los mayores porcentajes de cenizas van ligados a altos rendimientos. Por lo cual, dependiendo del objetivo de trabajo se selecciona la materia prima para la producción de los biocharres e hidrocharres y su consecuente adición al suelo.

Figura 5. Representación estructural de biomasa lignocelulósica (Kambo y Dutta, 2015).

1.8.1. Biochar

El término biochar tiene su origen en poblaciones antiguas localizadas en la Amazonia que llamaban a la mezcla de este material con el suelo “*Terra preta*” estableciendo la funcionalidad de dicho compuesto carbonoso como enmienda (Lehmann y Joseph, 2009a). Desde este momento comenzó a surgir interés por los beneficios aportados y las posibles líneas de investigación produciéndose un concepto más estructurado. El biochar según IBI (International Biochar Initiative) se define como un material sólido obtenido de la conversión termoquímica (pirólisis) de la biomasa en un ambiente limitado de oxígeno (< 1%) y que se usa en aspectos como el secuestro de carbono (mitigación del cambio climático), manejo ambiental, enmienda del suelo y remoción de contaminantes (Lehmann et al., 2011; Liu et al., 2017). Las temperaturas de pirólisis para crear este compuesto carbonoso son usualmente menores a 700 °C, generándose de esta forma un material estable, con una estructura de poro bien desarrollada, una amplia área de superficie y propiedades de adsorción idóneas (Liu et al., 2017).

Tabla 9. Propiedades de los residuos ganaderos según el tipo de materia prima. MV: materia volátil, CF: carbono fijo.

Materia prima	pH	Conductividad (dS m ⁻¹ 25 °C)	%C	%H	%N	%S	%O	%MV	%CF	%Cenizas
Purín de cerdo (Gascó et al., 2018)	7.64	0.31	34.26	4.83	2.67	21.18	0.48	39.4	19.4	41.2
Estiércol de ganado (Cely et al., 2015)	8.8	0.26	36.53	5.77	2.10	-	40.93	64.66	20.67	14.66
Estiércol de gallina (Cely et al., 2015)	5.8	0.43	40.57	5.75	2.58	-	30.86	64.85	14.92	20.24
Purín de cerdo (Cely et al., 2015)	9	0.12	24.09	4.56	2.99	-	21.14	41.72	11.06	47.22
Estiércol ganado lechero (Cantrell et al., 2012)	8.3	0.56	46.52	5.49	2.29	0.25	33.20	80.7	4.5	14.8
Gallinaza (Cantrell et al., 2012)	8.2	1.25	42.15	5.23	3.67	0.58	34.80	74.3	42.3	18.3
Estiércol de pavo (Cantrell et al., 2012)	7.0	1.04	40.45	5.04	3.43	0.48	30.23	74.0	5.7	20.3
Estiércol de gallina (Tortosa Masiá et al., 2007)	-	-	60.5	6.8	6.2	1.20	25.3	47.8	14.4	37.8
Estiércol de ganado lechero* (Wang et al., 2012)	7.56	0.35	-	-	-	-	-	62.49	16.57	14.42
Estiércol de gallina (Heilmann et al., 2014)	-	-	41.28	6.65	5.03	0.95	30.19	-	-	15.9
Purín de cerdo (Heilmann et al., 2014)	-	-	42.24	5.93	4.88	0.88	30.97	-	-	15.1
Estiércol de vaca (Heilmann et al., 2014)	-	-	41.57	5.93	3.94	0.41	36.15	-	-	12.0

*Mezclado con restos de eucalipto (1:1).

El proceso por el cual se obtiene el producto sólido carbonoso conocido como biochar es la pirólisis, siendo entonces el proceso térmico de la biomasa que permite la transformación de la misma en un nuevo producto y además implica la producción de energía (Al Arni, 2018). La pirólisis se puede clasificar en pirólisis rápida, lenta y flash dependiendo básicamente del tiempo de residencia y la temperatura. Como resultado se obtienen en todos los casos tres productos: sólido (biochar), líquido (bio-aceite) y gaseoso (syngas: CO, CO₂, H₂ y C₁-C₂) (Ahmad et al., 2014).

La pirólisis lenta produce cantidades aproximadamente iguales de los tres productos, en ella se dan largos tiempos de residencia y tasas de calentamiento lentas. En estas condiciones se obtienen altos rendimientos de biochar si la biomasa contiene altos contenidos de lignina y cenizas. Teniendo en cuenta adicionalmente que se considera un proceso simple y económico, aplicable a pequeña escala, por ejemplo para la producción de biochar en granjas (Qambrani et al., 2017).

En general, el rendimiento del biochar disminuye con el aumento de la temperatura, mientras la proporción de syngas aumenta. De acuerdo a esto, se ha establecido que durante la pirólisis lenta existe mayor producción de material sólido (biochar) debido a que los vapores pirolizados se mantienen por un largo periodo de tiempo en el reactor a bajas temperaturas favoreciendo las reacciones que dan lugar al producto. A diferencia de esto, la pirólisis rápida se caracteriza por cortos periodos de operación, altas tasas de calentamiento y temperaturas moderadas (Qambrani et al., 2017). Se utiliza cuando se quiere obtener un gran contenido de líquido (Cha et al., 2016), siendo este casi el 75% mientras que los gases corresponden al 13% y el biochar al 12%. El biochar que se obtiene en este caso, se trata de un material con estructuras principalmente aromáticas y recalcitrantes (Qambrani et al., 2017).

La pirólisis rápida a temperaturas bajas genera componentes de biochar parcialmente pirolizados en comparación con la pirólisis lenta. Por último la pirólisis flash, aunque genera los mayores porcentajes de char, se ve limitado por escalamiento y por factores económicos siendo una tecnología limitante (Kuppusamy et al., 2016) (

Figura 6). De acuerdo a los argumentos previamente descritos cuando se habla de la producción de biochar se asocia comúnmente con la pirólisis lenta siendo los rendimientos de la parte sólida altos, entre otras ventajas, en el uso como enmienda en suelos.

Figura 6. Tecnologías termoquímicas que transforman la biomasa en biochar y recursos energéticos renovables (bio-aceite y syngas). a) Temperatura de pirólisis, b) tiempo de residencia, g) % de gas producido, s) % sólido producido (biochar), L) % de líquido producido (bio-aceite) (Kuppusamy et al., 2016). Las leyendas encontradas al lado de cada proceso hacen referencias a las ventajas.

La pirólisis de residuos como método de valorización permite el adecuado tratamiento de desechos provenientes de animales y plantas, específicamente disminuyendo la contaminación ambiental asociados a estos (Ahmad et al., 2014). Además, permite reducir el peso y volumen generados por los procesos agrícolas, al igual que puede contribuir de forma indirecta en la mitigación del cambio climático a partir de la disminución en las emisiones de metano, reducción en el uso de energía procedente de las industrias debido al reciclaje y disminución de los desechos, recuperación de la energía procedente de los residuos y por último en algunos casos puede evitar el gasto energético en el transporte de residuos a largas distancias (Lehmann y Joseph, 2009a).

A nivel energético, el biochar podría ser utilizado como materia para la producción de energía, siendo una fuente verde, sin embargo, no podría proveer la demanda energética existente actualmente en Europa la cual sigue en aumento. En zonas puntuales como zonas rurales de África, Asia y Sur América es viable para alcanzar una producción eficiente de energía (Demirbas, 2004).

En cuanto a la mitigación del cambio climático, el biochar contribuye disminuyendo la velocidad de liberación de CO₂ proveniente de la descomposición de la biomasa vegetal, ya que en el ciclo biológico normal de las plantas la captura de CO₂ y su posterior transformación a carbono orgánico a través de la fotosíntesis es idónea. No obstante, en el momento que las plantas se descomponen ese CO₂ capturado vuelve a ser liberado de forma rápida. Cuando esa biomasa vegetal pasa por el proceso de pirólisis resultando en biochar, se convierte en un material más estable y la liberación de dióxido de carbono es más lenta (Oliveira et al., 2017).

Existen varias aplicaciones del biochar de acuerdo a sus características, lo cual lo hace un material de vital importancia como herramienta sostenible. Una de ellas, es el uso de biochar en la producción agrícola específicamente mejorando los rendimientos de cultivo; el mecanismo que permite este beneficio se basa en el efecto encalante que tiene el biochar al ser agregado al suelo, aumentando el pH del mismo (Jeffery et al., 2011). Igualmente, el biochar puede considerarse como medio de cultivo, dependiendo de la materia prima utilizada (Steiner y Harttung, 2014), o incluso llegar a mezclarse con la turba para obtener mejores resultados (Méndez et al., 2015).

Otra de las aplicaciones de este material es la remediación de suelos, debido a la mejora de las propiedades físicas, químicas y biológicas del mismo, así como a la inmovilización de metales, siendo una de las áreas ampliamente investigadas (Cárdenas- Aguiar et al., 2017; Lu et al., 2015;

Sohi et al., 2009) y sobre la cual se profundizará más adelante, resaltando todos los beneficios del biochar como enmienda en suelos. En la Figura 7 se muestran de forma general las propiedades químicas y físicas del biochar, además de considerar los aspectos básicos con relación a la remediación ambiental y en la interacción de dicho material con los suelos.

Figura 7. Características del biochar (Oliveira et al., 2017).

Las materias primas son variadas: estiércol de animales, residuos de procesamiento de alimentos, residuos sólidos urbanos, residuos de cosechas, entre muchos otros (Cantrell et al., 2012; Enders et al., 2012). Los biocharres provenientes de residuos ganaderos generalmente poseen mayor contenido de nutrientes y cenizas en comparación con los producidos a partir de restos vegetales (Chan et al., 2008; Kim et al., 2009; Shinogi, 2004). De igual forma con estos materiales disminuye el riesgo de lixiviación de nutrientes como el fósforo (Chan et al., 2008). En la Tabla 10 se muestran algunas propiedades de biocharres procedentes de residuos ganaderos y las variaciones de acuerdo a la temperatura de pirólisis utilizada y el tiempo de residencia.

Tabla 10. Propiedades de biocharres fabricados a partir de residuos ganaderos. MV: materia volátil, CF: carbono fijo.

Materia prima	Condiciones de pirólisis (T °C-horas)	pH	Conductividad (dS m ⁻¹ 25 °C)	%C	%H	%N	%S	%O	%MV	%CF	%Cenizas
Purín de cerdo (Gascó et al., 2018)	300-1	8.0	0.13	29.73	3.33	1.92	21.51	0.51	33.6	19.4	47.0
	450-1	7.8	0.16	29.70	2.98	1.81	12.57	0.45	22.5	22.8	54.7
	600-1	8.7	0.08	29.04	1.41	1.36	4.82	0.29	8.6	23.5	68.2
Estiércol ganado (Cely et al., 2015)	300-1	8.0	0.31	48.20	4.83	2.88	-	23.89	47.31	32.50	20.20
	500-1	10.2	0.39	43.59	2.17	2.21	-	8.38	13.20	43.15	43.65
Gallinaza (Cely et al., 2015)	300-1	8.1	0.52	47.71	3.49	5.45	-	8.60	23.87	41.38	34.75
	500-1	10.6	0.66	45.46	1.71	3.24	-	11.56	11.96	50.01	38.03
Purín de cerdo (Cely et al., 2015)	300-1	7.8	0.10	31.89	4.08	3.17	-	10.51	31.25	18.50	50.25
	500-1	8.2	0.06	22.00	1.05	1.81	-	1.25	6.50	19.62	73.88
Estiércol ganado lechero (Cantrell et al., 2012)	350-2	9.2	0.54	55.80	4.29	2.60	0.11	18.73	53.5	23.2	24.2
	700-2	9.9	0.70	56.67	0.94	1.51	0.15	4.13	27.7	34.7	39.5
Gallinaza (Cantrell et al., 2012)	350-2	8.7	1.41	51.07	3.79	4.45	0.61	15.63	42.3	27.0	30.7
	700-2	10.3	2.22	45.91	1.98	2.07	0.63	10.53	18.3	25.5	46.2

Materia prima	Condiciones de pirólisis (T °C-horas)	pH	Conductividad (dS m⁻¹ 25 °C)	%C	%H	%N	%S	%O	%MV	%CF	%Cenizas
Estiércol de pavo (Cantrell et al., 2012)	350-2	8.0	0.65	49.28	3.60	4.07	0.55	15.40	42.1	23.1	34.8
	700-2	9.9	0.98	44.77	0.91	1.94	0.41	5.80	20.8	29.2	49.9
	300-1,5	7.53	0.54	43.8	3.65	2.84	0.748	20.75	31.4	34.2	28.21
Purín de cerdo (Liu et al., 2017)	500-1,5	7.97	0.59	44.4	2.18	2.32	0.605	10.1	14.9	40.2	40.40
	700-1,5	8.98	0.92	45.2	1.17	1.34	0.748	8.80	7.62	44.9	42.74
Estiércol de vaca (Zhao et al., 2013)	500-4	10.2	-	-	-	-	-	-	17.2	14.7	67.5
	200-4	8.22	-	-	-	-	-	-	50.7	12.6	35.7
Purín de cerdo (Zhao et al., 2013)	350-4	9.65	-	-	-	-	-	-	27.4	34.7	37.2
	500-4	10.5	-	-	-	-	-	-	11.0	40.2	48.4
	600-4	10.8	-	-	-	-	-	-	10.7	19.2	69.6
Estiércol de ganado lechero* (Wang et al., 2012)	350	7.39	0.50	-	-	-	-	-	34.54	36.82	28.65
	450	10.03	0.41	-	-	-	-	-	24.65	36.98	38.37
	550	10.53	0.39	-	-	-	-	-	16.65	42.30	38.49

*Mezclado con madera de eucalipto (1:1).

1.8.2. Biochar como enmienda en suelos

En el caso específico del biochar se reconocen numerosos beneficios al ser agregado al suelo. El biochar puede mejorar el contenido de carbono orgánico, aumentar la capacidad de retención de humedad, aireación y saturación del suelo. Además la actividad microbiana, crecimiento de especies vegetales y el secuestro de carbono (Agegnehu et al., 2016). De igual forma se han reportado beneficios en cuanto a la disminución de la lixiviación de nutrientes (Sohi et al., 2009) y aumento en la capacidad de intercambio catiónico (Lehmann et al., 2011).

El pH del biochar suele ser entre neutro y alcalino, por lo cual al ser agregado al suelo aumenta los valores de esta variable. Investigaciones realizadas por Houben et al. (2013) establecen que la adición de biochar procedente de material vegetal aumentó el pH en un suelo contaminado por metales pesados incluso en los tratamientos con menor proporción del material aplicado. De igual forma Beesley et al. (2010) encontraron cambios en el pH entre el suelo control con un 5.45 y el suelo enmendado con biochar proveniente de madera con un pH de 7.56. Siendo entonces el biochar esencial en el tratamiento de suelos ácidos.

Las variaciones en la CE fueron evidenciadas por Chan et al. (2008) en donde el uso de un biochar a base de gallinaza aumentó la CE de 0.11-0.13 dS m⁻¹ en el suelo control a 0.28-0.29 dS m⁻¹ con la máxima concentración de biochar. El contenido de carbono en dicha investigación también se vio favorecido pasando de un valor inicial de 2% a 3.60% con la adición de biochar de gallinaza a 450 °C y de 1.9% a 3.20% con biochar generado a 550 °C. El contenido de nitrógeno aumentó al igual que la CIC con la adición biochares demostrando la capacidad de este material para mejorar la calidad del suelo. Por otro lado, si se habla de la capacidad de retención de agua en el suelo, esta aumenta al adicionarse biochar en 18% según valores datados en otras investigaciones (Ahmad et al., 2014; Glaser et al., 2002).

La interacción del biochar con los metales pesados presentes en el suelo hace que sea considerado como una enmienda inmovilizadora de metales. Según Park et al. (2013), el uso de dos biochares (estiércol de aves y desechos vegetales) reduce la biodisponibilidad de Pb y Cd en dos suelos (naturalmente y artificialmente contaminado), mediante el mecanismo de sorción. Otras investigaciones han establecido la capacidad del biochar de reducir el Cd y Zn solubles en suelo contaminado. Zhang et al. (2013) realizan una compilación de las investigaciones relacionadas con

este tema y referencia los efectos en la movilidad de los metales pesados y la biodisponibilidad de los mismos, como se muestra en la (Tabla 11).

Tabla 11. Efectos de la aplicación de biochar en la movilidad y biodisponibilidad de los metales pesados en el suelo (Zhang et al., 2013).

Efecto	Materia prima	Temperatura de producción	Metal	Referencia
Reduce la movilidad del metal	Bambú	No disponible	Cd	Ma <i>et al.</i> (2007)
	Madera dura	450 °C	As, Cd, Cu, Zn	Beesley <i>et al.</i> (2010); Beesley y Marmioli (2011)
	Madera dura	450 °C	As, Cd, Cu, Pb, Zn	Beesley y Dickinson (2011)
	Madera	200 y 400 °C	Cd, Zn	Debela <i>et al.</i> (2012)
Reduce la biodisponibilidad del metal	Tallos de algodón	450 °C	Cd	Zhou <i>et al.</i> (2008)
	Madera dura	400 °C	As	Hartley <i>et al.</i> (2009)
	Eucalipto	550 °C	As, Cd, Cu, Pb, Zn	Namgay <i>et al.</i> (2010)
	Gallinaza y residuos verdes	550 °C	Cd, Cu, Pb	Park <i>et al.</i> (2011)
	Gallinaza	550 °C	Cr	Choppala <i>et al.</i> (2012)
	Lodos de depuradora	500 °C	Cu, Ni, Zn, Cd, Pb	Méndez <i>et al.</i> (2012)
	Paja de arroz	No disponible	Cu, Pb, Cd	Jiang <i>et al.</i> (2012)
	Madera de roble	400 °C	Pb	Ahmad <i>et al.</i> (2012)

Investigaciones realizadas en cuanto a los metales totales también establecen la capacidad del biochar de reducir la concentración total de por ejemplo: Cd, Pb, Zn (Lu et al., 2018); As (Chen et al., 2018) y Cu, Zn, Pb, Cd y Mn (Li et al., 2019). No obstante, la interacción de los metales con el biochar puede variar entre cada metal, dependiendo factores como: (i) tipo de suelo enmendado, (ii) materia prima del biochar, (iii) temperatura de pirólisis, (iv) metal objetivo y (v) la cantidad de biochar agregado (Kuppusamy et al., 2016).

Los beneficios del biochar como se han mencionado son numerosos, sin embargo, existe cierta incertidumbre acerca de la estabilidad de este material en el tiempo. Se conoce que al adicionar biochar al suelo, este sufre un proceso de envejecimiento natural y que las propiedades varían en comparación con el material fresco (Cross y Sohi, 2013). Estos cambios pueden llegar a influir en la adsorción de metales si se considera la remediación a largo plazo. Por lo cual, se posicionan nuevas líneas de investigación que se basan en la producción de biochar envejecido, mediante técnicas químicas, con el fin de establecer si el uso de dicha enmienda perdura en el tiempo (Jing et al., 2018).

1.8.3. Hidrochar

La carbonización hidrotermal (HTC), proceso por el cual se obtiene el hidrochar, es un tratamiento térmico que permite darle un valor agregado a la biomasa al convertirla en un material carbonoso. En este proceso se ven involucradas un conjunto de reacciones como hidrólisis, deshidratación, descarboxilación, condensación, polimerización y aromatización. La presencia de agua en la HTC, evita el consumo adicional de energía en etapas de secado de la materia prima, al igual que actúa como reactivo, solvente o catalizador facilitando el rompimiento de estructuras de biomasa lignocelulósica (Gao et al., 2016). Usualmente, la HTC se encuentra dividida en: directa y catalítica, en donde para la primera se mezclan únicamente el agua y la biomasa mientras que en la segunda se necesita de un catalizador (Nizamuddin et al., 2017). Hace algunas décadas este término ya había sido expuesto como método para simular la carbonización natural pero hasta hace 5 a 10 años ha incrementado la atención hacia la valorización de los residuos (Mäkelä et al., 2015).

La HTC además no se limita a las típicas biomásas lignocelulósicas. Se pueden trabajar materias primas como celulosa, glucosa, residuos agrícolas, estiércol de animales, desechos alimenticios, lodos de depuradoras e incluso residuos de la acuicultura o de algas (Gascó et al., 2018; Méndez et al., 2019). Al igual que la pirólisis, de la HTC resultan tres productos: sólido, líquido y gaseoso. Siendo la parte sólida el hidrochar, la líquida el bio- aceite mezclado con agua y la gaseosa principalmente CO₂ (Wang et al., 2018).

Los hidrochares se producen a bajas temperaturas y presiones menores a 1 MPa, generalmente en un rango de temperatura entre 180 a 260 °C (Ghanim et al., 2017) ó 150 a 350 °C para Silva et al. (2016), provistos siempre de agua. El tiempo de preparación es variable y puede

oscilar entre algunos minutos (5 min) e incluso horas (Ghanim et al., 2017). La materia prima recomendable para generar este tipo de producto es aquella que tenga alto contenido de humedad, debido a que se reduce el consumo de energía, aunque no tiene requerimientos específicos.

Las propiedades de los hidrocharres dependen en gran medida de la temperatura de reacción, el tiempo de permanencia en el proceso y de la materia prima base para su producción siendo en general materiales con varios campos de aplicación (Figura 8) y potencialmente utilizables como carbón activo, adsorbente, enmienda de suelo, carbón negro, combustible sólido y materia prima para la pirólisis por sus propiedades no tóxicas y con bajo contenido de sulfuros (S. Guo et al., 2016). Los beneficios del hidrochar lo hacen sostenible debido a que puede llegar a disminuir el CO_2 del ciclo del carbono, también puede ser utilizado como biocombustible y por ende disminuir de igual manera las emisiones de CO_2 . Puede reducir las grandes cantidades de residuos provenientes de actividades antropogénicas y cuando se trata de la migración del carbono puede inmovilizar el CO_2 en carbono recalcitrante (Wang et al., 2018).

Figura 8. Conceptos referentes a la producción, aplicación e impacto del hidrochar (Wang et al., 2018).

Al igual que los biocharres, los hidrocharres también pueden fabricarse a partir de materias primas como restos vegetales (Kalderis et al., 2014), residuos ganaderos (Liu et al., 2017), residuos municipales (Danso-Boateng et al., 2015), etc. Los hidrocharres provenientes de residuos ganaderos han sido estudiados como parte de la mitigación ante problemas ambientales y aspectos relacionados con la recuperación de fósforo. El hidrochar tiene un valor calorífico igualable al del carbón natural, además de ser un absorbente potencial para contaminantes orgánicos (Heilmann et al., 2014; Oliveira et al., 2013; Sun et al., 2011). En la Tabla 12 se muestran algunas propiedades de hidrocharres procedentes de residuos ganaderos.

1.8.4. Hidrochar como enmienda en suelos

La información referente a los efectos del hidrochar como enmienda en suelos es poca en comparación a la cantidad de investigaciones realizadas con diferentes biocharres. Se reconoce que los hidrocharres pueden aumentar la cantidad de agua retenida en los suelos debido al incremento del volumen de poro total y la disminución de la densidad aparente. Estos resultados se refieren a suelos arenosos donde la disponibilidad de agua es baja. Sin embargo, los suelos con alta capacidad de retención de agua y materia orgánica no presentan mayores cambios al adicionar este tipo de materiales (Fang et al., 2018). La alta retención de humedad por parte del hidrochar favorece también el crecimiento de plantas, en donde el punto de marchitamiento en suelos enmendados con hidrochar es 24% más alto que en suelos mezclados con biocharres (Gascó et al., 2018).

Otros autores han reportado los beneficios del hidrochar en la biomasa microbiana de los suelos (Bargmann et al., 2014a). Incluso al comparar este tipo de materiales con los biocharres, se observa un incremento evidente en la actividad debido principalmente a la presencia de componentes de carbono lábil, siendo estos menos estables. Por tanto, los hidrocharres proveen una fuente de carbono fácilmente accesible para los microorganismos. Igualmente, existe mayor actividad enzimática lo que se relaciona con el aumento de la microbiota asociada al suelo pues se genera un mayor requerimiento de sustrato (enzimas) para sobrevivir (Fang et al., 2018; Kambo y Dutta, 2015). Bargmann et al. (2014b) afirman que la adición de hidrochar puede llegar a reducir el nitrógeno mineral en el suelo y que se da principalmente debido a materiales con altas relaciones de C:N, alto contenido de carbono orgánico soluble y bajo contenido de N mineral concluyendo en la necesidad de estudios para este material y su uso como enmienda en suelos.

Tabla 12. Propiedades de hidrochares fabricados a partir de residuos ganaderos. MV: materia volátil, CF: carbono fijo.

Materia prima	Condiciones de HTC(T °C-horas)	pH	Conductividad (dS m ⁻¹ 25 °C)	%C	%H	%N	%S	%O	%MV	%CF	%Cenizas
Purín de cerdo (Gascó et al., 2018)	200-2	8.35	0.020	33.77	4.22	2.49	0.55	14.96	34.2	21.7	44.0
	220-2	7.05	0.016	26.59	3.10	1.85	0.52	11.94	30.1	13.9	56.0
	240-2	7.77	0.011	25.77	2.98	1.86	0.41	10.40	27.9	13.5	58.6
Purín de cerdo (Liu et al., 2017)	180-1,5	5.43	0.147	43.3	4.26	2.09	0.531	19.6	44.2	20.6	30.22
	240-1,5	5.76	0.092	46.9	4.07	2.47	0.567	16.5	35.8	31.3	29.49
	300-1,5	5.99	0.051	46.4	3.52	2.67	0.498	11.5	26.8	35.4	35.41
Gallinaza (Ghanim et al., 2016)	250-2	7.37	-	51.36	4.61	5.05	0.40	8.38	39.3	30.49	30.21
Purín de cerdo (Oliveira et al., 2013)	180-4	-	-	54.4	6.2	4.4	-	26.9	-	-	-
Purín de cerdo (Ekpo et al., 2016b)	250-1	-	-	55.7	6.1	2.7	0.1	16.9	57.7	21.8	18.5
Estiércol de gallina (Ekpo et al., 2016b)	250-1	-	-	59.9	6.5	4.9	nd	12.6	59.3	22.8	16.0

nd: no detectado.

1.9. Fitorremediación

La fitorremediación consiste en el uso de las plantas y su microbiota asociada para la extracción de contaminantes (sustancias orgánicas e inorgánicas). Esta técnica es relativamente reciente y las investigaciones llevadas a cabo sobre el tema comenzaron hace dos décadas, con el inicio del concepto propuesto por Chaney en 1983. Dicho término deriva del griego *phyto* que significa planta y el latín *remedium* que se refiere a remover un mal (Ali et al., 2013)

La vegetación utilizada se basa en las denominadas especies hiperacumuladoras, que son capaces de absorber altas concentraciones de contaminantes. Son plantas con capacidad de almacenar metales 50 e incluso 100 veces más que la vegetación habitual y por tanto, alcanzado porcentajes de acumulación de dichos compuestos entre 1% - 5% en proporción de su peso seco (Lee, 2013). Autores como Baker y Brooks (1989) establecen ciertos valores específicos para determinar plantas bioacumuladoras respecto a los metales que acumule, siendo para el Cd de 100 mg kg⁻¹ de peso seco, mientras que para el Cu, Co, Cr, Ni y Pb la concentración aumenta a 1000 mg kg⁻¹ y para el Mn y Zn es aún mayor con 10000 mg kg⁻¹.

Las desventajas de la fitorremediación son: (i) tratamiento de suelos con una capa de contaminación poco profunda, (ii) limitaciones en la tasa de crecimiento y producción de biomasa de las plantas hiperacumuladoras, (iii) dificultad en la movilización de los iones metálicos más fuertemente unidos al suelo, (iv) aplicabilidad reducida a lugares de baja y media contaminación, (v) el tiempo es un factor determinante en el cual aspectos como el clima y las temporadas pueden afectar el crecimiento de la planta, (vi) la toxicidad de los contaminantes hacia las plantas puede influir en su supervivencia y (vii) posible transferencia de contaminación a niveles superiores de la cadena trófica (Ali et al., 2013; Lee, 2013).

Por su parte entre las ventajas se pueden evidenciar: (i) técnica respetuosa con el ambiente, (ii) bajo coste de operación, con una reducción entre 50% a 80% respecto a métodos actuales, (iii) aplicación tanto in situ como ex situ, (iv) amplia gama de contaminantes a tratar, (v) posibilidad de recuperación de los metales y (vi) prevención la erosión y los lixiviados de los contaminantes (Lee, 2013; Odjegba y Fasidi, 2007).

La Tabla 13 muestra diferentes técnicas de fitorremediación con una breve descripción de las técnicas usadas para contaminantes orgánicos e inorgánicos.

Tabla 13. Técnicas de fitorremediación. Tomado y modificado de: Paz-Ferreiro et al. (2014).

Técnica	Descripción
Fitoextracción	Las plantas acumulan los contaminantes en la biomasa cosechable
Fitofiltración	Almacenamiento por parte de las plantas de los contaminantes de aguas contaminadas
Fitoestabilización	Limita la movilidad y biodisponibilidad de sustancias contaminantes por la prevención de migración o inmovilización
Fitovolatilización	Modificación de los contaminantes a formas volátiles seguido de su liberación a la atmosfera
Fitodegradación	Degradación de xenobióticos orgánicos por la acción enzimática de las plantas (tejidos)
Rizodegradación	Degradación de xenobióticos orgánicos en la rizósfera por microorganismos rizosféricos
Fitodesalinización	Eliminación de sales en exceso de suelos salinos por halotipos

1.10. Fitoextracción

La fitoextracción, fitoestabilización y la fitovolatilización son técnicas que se suelen utilizar para tratar suelos contaminados por metales. La fitoextracción elimina los metales (Cd, Cd, Pb, Zn, Ni, Cr, Co), metaloides (As, Se) e incluso radionucleidos (^{90}Sr , ^{137}Cs , ^{238}U) (Lee, 2013) y se fundamenta en el uso de plantas bioacumuladoras, las cuales se encargan de extraer el contaminante del suelo y acumularlo en sus tejidos superiores, es decir hojas y tallos (Paz-Ferreiro et al., 2014). Existen ciertas características que deben poseer las plantas para ser consideradas como viables en este proceso como se indica en la Figura 9 (Paz-Ferreiro et al., 2014). El mecanismo de hiperacumulación incluye varios procesos. El primero de ellos es el transporte de los metales a través de la membrana plasmática o las células de las raíces. En segundo lugar la carga y la translocación en el xilema y por último la distribución y secuestro de los metales en toda la planta (Yang et al., 2005).

Figura 9. Características de las especies vegetales usadas para fitoextracción.

Algunas propiedades del suelo pueden influir en la acumulación de metales por parte de las plantas como son la CIC, el pH, la materia orgánica, el estado de oxidación del metal, entre otros (Paz-Ferreiro et al., 2014). Existen aproximadamente 450 plantas hiperacumuladoras de metales pesados, relacionadas con la extracción de Ni, Cd, Cu, Pb, As, Zn (Bhargava et al., 2012). No obstante, el Ni es el metal con mayor número de reportes de especies bioacumuladoras siendo alrededor de 320. Para metales como Cd, Co, Zn, Pb y Cu también se han listado ciertas plantas (Bhargava et al., 2012; Conesa et al., 2006; Rossi et al., 2002). Las variaciones dependen de la biología de la planta, su nivel de tolerancia a determinados niveles de concentración de metal, así como su capacidad de acumulación (Ali et al., 2013; Bhargava et al., 2012). En la Tabla 14 se muestran algunas especies hiperacumuladoras de diferentes metales y las diferentes investigaciones que lo han establecido.

De igual forma, actualmente se han registrado varios estudios sobre el potencial de *Brassica napus*, comúnmente conocida como colza, en cuanto a la acumulación de Cd, Pb y Zn (Houben et al., 2013; Marchand et al., 2016; Souhila et al., 2016), al igual que se ha investigado la extracción de metales para la mostaza blanca *Sinapis alba* (Kloss et al., 2014; Malagoli et al., 2014). Especies de interés en el presente trabajo de investigación.

Tabla 14. Plantas que hiperacumuladoras de metales (Bhargava et al., 2012).

Met al	Especies hiperacumuladoras reportadas	Especies de plantas que acumulan metales específicos	Familia	Referencia
Ni	320	<i>Berkheya coddii</i>	Asteraceae	Robinson et al. (1997); Moradi et al. (2010)
		<i>Alyssum serpyllifolium</i> , <i>A. bertolonii</i>	Brassicaceae	Becerra-Castro et al. (2009); Barzanti et al. (2011)
		<i>Sebertia acuminata</i>	Sapotaceae	Jaffre et al. (1976); Perrier (2004)
		<i>Phidiasia lindavii</i>	Acanthaceae	Reeves et al. (1999)
		<i>Bornmuellera kiyakii</i>	Brassicaceae	Reeves et al. (2009)
Cu	34	<i>Ipomea alpina</i>	Convolvulaceae	Cunningham y Ow (1996)
		<i>Crassula helmsii</i>	Crassulaceae	Küpper et al. (2009)
		<i>Commelina communis</i> <i>Haumaniastrum robertii</i>	Commelinaceae	Wang y Zhong (2011)
Co	34		Lamiaceae	Brooks (1998)
		<i>Crotalaria cobalticola</i>	Fabaceae	Oven et al. (2002)
Se	20	<i>Astragalus bisulcatus</i>	Fabaceae	Galeas et al. (2007)
		<i>Stanleya pinnata</i>	Brassicaceae	Freeman et al. (2010); Hladun et al. (2011)
		<i>Thlaspi caerulescens</i>	Brassicaceae	Kupper y Kochian (2010)
Zn	18	<i>Arabis gemmifera</i> , <i>A. paniculata</i>	Brassicaceae	Kubota y Takenaka (2003); Tang et al. (2009)
		<i>Sedum alfredii</i>	Crassulaceae	Sun et al. (2005)
		<i>Arabidopsis halleri</i>	Brassicaceae	Zhao et al. (2000)
		<i>Picris divaricata</i>	Asteraceae	Du et al. (2011)
		<i>Sesbania drummondii</i>	Fabaceae	Sahi et al. (2002); Sharma et al. (2004)
Pb	14	<i>Hemidesmus indicus</i>	Apocynaceae	Chandra Sekhar et al. (2005)
		<i>Arabis paniculata</i>	Brassicaceae	Tang et al. (2009)
		<i>Plantago orbignyana</i>	Plantaginaceae	Bech et al. (2011)
		<i>Austromyrtus bidwillii</i>	Myrtaceae	Bidwell et al. (2002)
		<i>Phytolacca americana</i>	Phytolaccaceae	Pollard et al. (2009)
Mn	9	<i>Viotia neurophylla</i>	Proteaceae	Fernando et al. (2006)
		<i>Gossia bidwillii</i>	Myrtaceae	Fernando et al. (2007)
		<i>Maytenus founieri</i>	Celastraceae	Fernando et al. (2008)
		<i>Thlaspi caerulescens</i>	Brassicaceae	Basic et al. (2006)
Cd	4			Dahmani-Muller et al. (2000); Bert et al. (2002)
		<i>Arabidopsis halleri</i>	Brassicaceae	
		<i>Bidens pilosa</i>	Asteraceae	Sun et al. (2009)
Cr	No disponible	<i>Salsola kali</i>	Amaranthaceae	Gardea-Torresday et al. (2005)
		<i>Leersia hexandra</i>	Poaceae	Zhang et al. (2007)
		<i>Gynura pseudochina</i>	Asteraceae	Mongkhonsin et al. (2011)
TI	No disponible	<i>Iberis intermedia</i>	Brassicaceae	Leblanc et al. (1999)
		<i>Brassica oleracea</i>	Brassicaceae	Al-Najar et al. (2005)

1.11. Combinación de la fitoextracción con el uso de biochar e hidrochar

La fitoextracción es una alternativa viable, pero con algunas limitaciones como se comentaba anteriormente. Una de estas es la presencia de fitotoxicidad en áreas de contaminación elevada, como lo pueden llegar a ser los suelos mineros. Ante dicho escenario la adición de biochar puede potencializar el crecimiento de la planta reduciendo la fitotoxicidad (Houben et al., 2013). Este cambio se debe principalmente a la disminución en la biodisponibilidad y movilidad de los metales por parte del biochar. De igual forma, las especies acumuladoras presentan señales de estrés como causa de la ausencia o baja cantidad de nutrientes en el suelo.

Según investigaciones llevadas a cabo en suelos enmendados con biochar (Cárdenas-Aguar et al., 2017; Rodríguez-Vila et al., 2015), este material puede aumentar la fertilidad del suelo a través de la mejora en el contenido de nutrientes y materia orgánica, por lo cual de forma directa el biochar evita el detrimento de las plantas. En general, el incremento del crecimiento vegetal por parte del biochar se debe a varios factores: incremento de la retención de humedad, mejora de las propiedades biológicas y de la CIC, beneficios en los ciclos de nutrientes y modificación del pH del suelo (Paz-Ferreiro et al., 2014). En suelos con pH ácidos las especies tienden a tener un menor desarrollo, siendo entonces otro beneficio al combinar dichas técnicas, pues el biochar aumenta el pH de los suelos a alcalinos o cercanos a la neutralidad (Li et al., 2018). Incluso el biochar puede reducir la sensibilidad de las plantas hacia los patógenos, ya que modifica la microbiota del suelo posibilitando la presencia de microorganismos que protegen las plantas (Paz-Ferreiro et al., 2014).

La información relativa a la combinación de la fitoextracción con hidrochar es poco frecuente y las líneas de investigación sobre este material no se basan en esta perspectiva. No obstante, trabajos de revisión como el realizado por Reza et al. (2014) hacen referencia a los rendimientos en la producción de biomasa vegetal al adicionar hidrochar a suelos y establecen que no existen cambios o incluso en ciertos casos se pueden llegar a obtener efectos negativos, estableciendo una posible fitotoxicidad de dichos materiales. Otros autores sugieren que la toxicidad puede disminuirse mediante un pretratamiento como el lavado o incluso el almacenamiento (envejecimiento) (Busch et al., 2012). Los efectos del hidrochar también pueden deberse a la dosis utilizada y el tiempo de duración de los experimentos.

Teniendo en cuenta que la interacción entre el hidrochar y las especies acumuladoras es desconocida, se destaca la necesidad de investigación sobre dicho tema en particular, pues los esfuerzos se encuentran enfocados en el biochar y su efecto de potencialización en la extracción de metales por parte de las plantas. La Tabla 15 resume investigaciones llevadas a cabo sobre la combinación de fitoextracción y uso de biochar de diferentes materias primas.

Tabla 15. Investigaciones sobre la combinación de fitoextracción y adición de biochar.

Biochar	Tipo de suelo	Metal	Especie acumuladora	Referencia
Residuos sólidos urbanos	Xerofluvent típico	Cu	<i>Lepidium sativum</i> <i>Sinapis alba</i> <i>Lolium</i> sp.	Cardenas–Aguiar et al., 2017
Gallinaza y eucalipto	Antrosol	Cd	<i>Amaranthus tricolor</i> .	Lu et al., 2015
Sauce (<i>Salix</i> sp)	Arcilloso	As	<i>Lolium perenne</i>	Gregory et al., 2014
Paja (<i>Miscanthus</i>)	Franco arenoso y limoso	Cd, Zn, Pb	<i>Brassica napus</i> L.	Houben et al., 2013b
Paja de maíz	Ferrosol típico	Cd, Zn	<i>Sedum plumbizincicola</i>	Li et al., 2018
Madera de roble	Suelo minero	Co, Cu, Ni, Pb, Zn	<i>Brassica juncea</i> L.	Rodríguez- Vila et al., 2015
Astillas de madera	Planosol, Cambisol, Chernozem	Al, Cd, Cu, Pb, Mn, As, B, Mo, Se	<i>Sinapis alba</i> L.	Kloss et al., 2014
Mezcla de madera	Cambisol	Cd, Zn, Pb	<i>Noccaea caerulescens</i>	Rees et al., 2016
Mezcla de madera	3 suelos	As	<i>Miscanthus x giganteus</i>	Hartley et al., 2009
Residuos de poda de huertos, trozos de árboles, estiércol mezclado con residuos vegetales	Tecnosol	Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Tl, Zn	<i>Anthyllis vulneraria subsp. polyphylla</i> Dc. <i>Nyman</i> <i>Noccaea rotundifolium</i> L. <i>Moench subsp. cepaeifolium</i> <i>Poa alpina</i> L. subsp. <i>alpina</i>	Fellet et al., 2014

1.12. Valorización de residuos a partir de biochar e hidrochar

En la Unión Europea se calcula un total de 1.4 billones de toneladas de residuos ganaderos que pueden ser utilizados para su procesamiento (Foged et al., 2011). España se posiciona en el tercer lugar de mayor producción de biomasa con: 6.4 millones de cabezas de ganado, siendo el 7% del total para la UE, 22.7 millones de ovejas (19%), 2.9 millones de cabras (22%), 24.8 millones de cerdos, 158.2 millones de aves de corral, 2.4 millones de conejos y 292000 caballos (Gómez et al., 2010). En el país no existe como tal un estimado de residuos ganaderos generados por año, sin embargo, Cueto-García (2016) realizó una aproximación de las deyecciones producidas anualmente por la actividad ganadera resultando en un volumen 121 t año⁻¹, considerando en esta estimación las siguientes especies: bovino de carne, bovino de leche, ovino, caprino, porcino, conejos, aves (gallinas ponedoras), aves (reproductoras de carne) y equino. En este caso, la mayor cantidad de cabezas se contempla en las aves (gallinas ponedoras) y la mayor cantidad de deyecciones totales (t año⁻¹) se da en el bovino de carne y el porcino (Tabla 16). No obstante, los residuos ganaderos dependen de factores claves como la raza de la especie, la edad, el peso medio del animal, el tipo de alimentación, el régimen de explotación y tipo de cama, sexo del animal y estado fisiológico del animal.

Tabla 16. Estimación de deyecciones producidas en España anualmente (Cueto-García, 2016).

Especie	Número de cabezas	Deyecciones /cabeza (ton año ⁻¹)	Total (ton año ⁻¹)
Bovino de carne	5,380,616	10	53,806,160
Bovino de leche	853,239	14	11,945,346
Ovino	15,431,804	1	15,431,804
Caprino	2,704,229	1	2,704,229
Porcino	26,983,205	1	26,983,205
Conejos	6,120,114	0.05	306,005.7
Aves (gallinas ponedoras)	38,408,780	0.05	1,920,439
Aves (gallinas de carne)	4,280,000	0.05	214,000
Equino	629,048	12	7,548,576
Total	100,791,035	39.15	120,859,765

Las concentraciones excesivas de los desechos de animales han llevado a que el uso de estos como fertilizantes no sea suficiente para su manejo. Sin contar con las desventajas de los sistemas agrícolas intensivos que ocasionan la lixiviación de nutrientes como nitrógeno y fosforo generando a su vez situaciones como la contaminación de cuerpos de agua (eutroficación), emisiones de gases de efecto invernadero (metano) y producción de malos olores (Cao y Harris, 2010; Cely et al., 2015; Gascó et al., 2018); sumado a las dificultades que se presentan con el transporte y almacenamiento de la materia prima.

Por tanto, la transformación de biomasa en componentes potencialmente utilizables (valorización de residuos) se ha posicionado en una de las técnicas más sostenibles y limpias (S. Guo et al., 2016). La solución a las limitaciones se basa en el uso de un tratamiento térmico de la biomasa como lo son: la torrefacción, pirólisis, gasificación, digestión anaeróbica, fermentación, carbonización hidrotermal, entre otros. Dando así un uso ambiental a los materiales resultantes y ayudando aliviar los problemas en el manejo de los residuos agrícolas e incluso utilizar estos como un recurso eficiente de energía (Goyal et al., 2008; Saxena et al., 2009). La conversión por procesos térmicos como es el caso específicamente de la pirólisis y la carbonización hidrotermal, de los cuales resultan productos como biochar y hidrochar respectivamente, no son la excepción y sus usos se extienden incluso a los suelos, siendo estos, materiales carbonosos aprovechables como enmiendas. Además de poseer beneficios como: reducción de la movilidad y biodisponibilidad de algunos metales, útil para la remediación de suelos mineros; secuestro de carbono, esencial en la lucha contra el cambio climático; maximización de la capacidad de extracción de especies acumuladoras de metales, importante en la fitoextracción, entre otras ventajas como se ha enunciado a lo largo del documento (Houben et al., 2013; Nakason et al., 2016).

2. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo hace parte de las investigaciones llevadas a cabo por el grupo de Valorización recursos de la Universidad Politécnica de Madrid. Durante los últimos años las líneas de estudio del grupo se basan en la transformación térmica de los residuos con el fin de obtener materiales aprovechables como enmiendas orgánicas para tratamientos de suelos. Previo a la remediación de suelos mineros, se efectuaron experimentos con suelos artificialmente contaminados. Específicamente el planteamiento de la presente tesis se desarrolló gracias a los resultados obtenidos con la contaminación artificial de un suelo con Cu (1000 mg kg^{-1}) y el montaje de experimentos combinando la fitoextracción y uso de biochar procedente de residuos sólidos urbanos. En este caso se estableció el potencial del biochar, producido a 500°C , para inmovilizar Cu móvil además de potenciar el crecimiento de especies vegetales como *Sinapis alba* y un mejor desarrollo de las raíces en el césped *Lolium* sp (Cárdenas- Aguiar et al., 2017).

Los beneficios del biochar han sido documentados por varias investigaciones, así como los efectos causados al adicionarse al suelo. No obstante, continuamente se menciona la importancia de la materia prima y el tipo de suelo. De acuerdo a esto y teniendo en cuenta las revisiones bibliográficas, las líneas de investigación se dirigieron hacia escenarios más reales, como los suelos mineros. Adicionalmente, considerando el mayor contenido de cenizas y nutrientes provenientes de biochares derivados de residuos ganaderos y la accesibilidad a estos, se seleccionó el uso de materiales como estiércol de conejo y gallinaza, siendo estos la materia prima. La selección de las especies vegetales utilizadas para la fitoextracción también fue en parte el producto de los resultados obtenidos en los anteriores experimentos y la documentación que establece los potenciales de dichas plantas (*Brassica napus* y *Sinapis alba*) en la acumulación de metales. Por tanto, la presente tesis doctoral se enmarca como parte del proyecto “Tratamiento de suelos contaminados por metales mediante combinación de técnicas de fitorremediación con adición de biochar (CGL2014-58322-R)” del programa Retos 2014. Los suelos corresponden a diferentes zonas mineras de España, remediándose un total de siete suelos y modificando los tratamientos y enmiendas utilizadas como se detallará en cada uno de los capítulos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Analizar los efectos de la adición de enmiendas y de su combinación con la técnica de fitoextracción (*Brassica napus* y *Sinapis alba*) en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de suelos mineros de España así como en la extracción de metales en los suelos seleccionados.

3.2. Objetivos específicos:

1. Determinar las propiedades fisicoquímicas de las enmiendas orgánicas.
2. Determinar las propiedades fisicoquímicas de los suelos.
3. Evaluar el efecto de la adición de enmiendas y su combinación con la fitoextracción en el pH, conductividad eléctrica y propiedades biológicas de los suelos.
4. Evaluar el efecto de la adición de enmiendas y de su combinación con la fitoextracción en el contenido en metales de los suelos.
5. Analizar la capacidad de fitoextracción y producción de biomasa de *Brassica napus* y *Sinapis alba* en los suelos testigos y enmendados.

CAPÍTULO I: EFECTOS DE LA ADICIÓN DE ENMIENDAS ORGÁNICAS Y COMBINACIÓN CON LA FITOEXTRACCIÓN EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE DOS SUELOS MINEROS PROVENIENTES DE LAS ÁREAS DE GAMONEDO Y PORTMÁN

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

Analizar los efectos de la adición de biocharres, hidrocharres y estiércol de conejo y de su combinación con la técnica de fitoextracción (*Brassica napus* y *Sinapis alba*) en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de dos suelos mineros provenientes de las áreas de Gamonedo (Cantabria) y Portmán (Murcia) así como en la extracción de metales en los suelos seleccionados.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar las propiedades fisicoquímicas de las enmiendas orgánicas: biocharres, hidrocharres y estiércol de conejo.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas de los dos suelos: Gamonedo y Portmán.
- Evaluar el efecto de la adición de enmiendas y combinación con la fitoextracción en el pH, conductividad eléctrica (CE) y propiedades biológicas de los suelos (actividades enzimáticas y biomasa microbiana).
- Evaluar el efecto de la adición de enmiendas y de su combinación con la fitoextracción en el contenido en metales de los suelos.
- Analizar la capacidad de fitoextracción (factor de bioconcentración y translocación) y producción de biomasa de *Brassica napus* y *Sinapis alba* en los suelos testigos y enmendados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección de suelos

Los suelos seleccionados corresponden al muestreo realizado en el marco del proyecto “Tratamiento de suelos contaminados por metales mediante combinación de técnicas de fitorremediación con adición de biochar (CGL2014-58322-R)” del programa Retos 2014. De las muestras obtenidas se seleccionaron dos suelos. El primero de estos, corresponde al área de Gamonedo (GAM) localizada en la latitud: $43^{\circ} 19' 57.9573''$ N y longitud: $4^{\circ} 5' 2.8573''$ O, en el municipio de Cartes, junto a la localidad de Mijarojos, perteneciente a la comunidad autónoma de Cantabria (Figura I- 1).

Figura I- 1. Área de Gamonedo.

En segunda instancia se seleccionó el área de Portmán (PORT) ubicada en las siguientes coordenadas: Latitud: $37^{\circ} 35' 24.1593''$ N y Longitud: $0^{\circ} 51' 39.6248''$ O, en el municipio de La Unión-Cartagena, perteneciente a la comunidad autónoma de Murcia y reconocida en el marco del proyecto como suelo Portmán 1 (Figura I- 2). Las dos áreas corresponden a zonas de acumulación

de residuos mineros producto de la explotación principalmente de Zn y Pb. Las muestras se tamizaron por debajo de 2 mm.

Figura I- 2. Área de Portmán.

2.2. Selección del residuo

El residuo seleccionado corresponde a estiércol de conejo (EC) obtenido de una granja ubicada en el campo de prácticas de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (ETSIAAB) perteneciente a la Universidad Politécnica de Madrid (UPM). Este material se sometió a secado al aire durante un mes y luego su posterior tamizaje por una luz de paso de 2 mm.

2.3. Especificaciones reactor para preparación de biochar e hidrochar

El equipo utilizado para la preparación de los biochar e hidrochar, se trata de un reactor piloto para convertir biomasa a altas temperaturas y presiones (Figura I- 3) de DEMEDE S.L. Consta de un reactor de alta presión (hidrochar) y uno de alta temperatura (biochar). El reactor

Válvula de seguridad (tarada 330 bar), RD01: Disco de ruptura (presión de disparo 372 - 427 bar), VFM01: Medidor de flujo volumétrico de gas a la salida de V02, FIC 01: Lazo de control de caudal a la entrada por MFC01, FI 02: Medida de flujo volumétrico de gas por VFM01, PIC 01: Lazo de control de presión en el reactor por MFC01, TIC 01: Lazo de control de temperatura de horno, TI 02: Medidor de temperatura en el interior de R01, TIC 03: Lazo de control de temperatura de Mv02 y Filt02, TIC 04: Lazo de control de temperatura producto de salida a V01, TI 05: Medidor de temperatura en interior de V01, TI 06: Medidor de temperatura en interior de V02.

2.4. Preparación de biochar

A partir del EC se obtuvieron dos biochar a diferentes temperaturas. El tratamiento térmico del EC se realizó mediante un proceso de pirólisis lenta, en el cual 500 g de residuo seco se ubicaron en el reactor de alta temperatura (Figura I- 4), dando inicio al proceso de transformación de la biomasa. La velocidad de calentamiento fue de $3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta alcanzar los $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el primer biochar (BEC450). Para el segundo biochar se realizó el mismo proceso y con la misma velocidad, sin embargo, la máxima temperatura alcanzada fue de $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ (BEC600). La diferencia de temperatura entre los dos termopares fue de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el flujo de nitrógeno manejado fue de $0.5\text{ L de N}_2\text{ min}^{-1}$. Una vez alcanzadas las temperaturas finales, éstas se mantuvieron durante 1 h. Luego las muestras se molieron y tamizaron por debajo de 2 mm y por último se almacenaron en recipientes plásticos para su posterior caracterización.

Figura I- 4. Reactor utilizado para la elaboración de biochar e hidrochar (DEMEDE S.L.).

2.5. Preparación de hidrocharres

La preparación de los hidrocharres se llevó a cabo con el reactor de alta presión previamente citado en las especificaciones. En este se utilizó una solución de 1 L de EC húmedo con un 30% de contenido sólido en un recipiente de teflón que se introdujo en el reactor Hastelloy C-276 (Figura I- 5a). Una vez situada la muestra en el reactor, se cerraron los conductos de gas (entrada y salida) y se verificó el correcto funcionamiento de los sensores, cerrado de válvulas y engrasado de las piezas metálicas. En este caso los termopares trabajaron con una diferencia de temperatura de 20 °C, dando inicio al proceso de carbonización hidrotermal. Este proceso se realizó a dos temperaturas finales diferentes, la primera temperatura fue de 190 °C y la segunda de 240 °C. La temperatura final se mantuvo durante 6 h en el reactor, resultando dos hidrocharres HEC190 y HEC240 respectivamente. Los cuales posteriormente fueron filtrados (Figura I- 5 b, c), secados a 90 °C durante 24 h y tamizados a 2 mm.

Figura I- 5. Preparación de hidrocharres. a: Autoclave Hastelloy, b: proceso de filtrado, c: Parte sólida retenida.

2.6. Selección especies para fitoextracción

Las especies seleccionadas para los ensayos de fitoextracción corresponden a la especie *Brassica napus* comúnmente conocida como colza y a la mostaza blanca *Sinapis alba*. La selección de estas plantas se realizó debido a su potencial como especies acumuladoras y resistentes a la presencia de metales en los suelos según previa revisión bibliográfica (Cárdenas-Aguilar et al., 2017; Dhiman et al., 2016; Souhila et al., 2016). En los dos suelos se utilizaron las mismas especies y los mismos tratamientos.

2.7. Caracterización de materiales

La determinación de las propiedades físicas y químicas del EC, biochares e hidrochares y suelos se realizaron por triplicado. Los equipos y materiales utilizados hacen parte del laboratorio de Edafología de la escuela ETSIAAB. No obstante, algunas variables fueron analizadas por otros centros de investigación. A continuación, se enumeran todos los parámetros analizados con su respectivo procedimiento.

2.7.1. Conductividad eléctrica (CE), pH y potencial de oxidación–reducción (redox)

Con el fin de medir la CE, pH y el potencial de oxidación-reducción (redox) de los materiales, se conservó una relación de 4 g L⁻¹ para las enmiendas orgánicas y una 1:2.5 para suelos. Para lo cual primero en un recipiente de plástico, se pesaron 0.2 g de muestra de enmiendas y se adicionaron 50 mL de agua destilada y en el caso de los suelos se pesaron 10 g y 25 mL de agua. La mezcla se agitó durante una hora en agitador de vaivén. Posteriormente se llevó a cabo la medición con el conductímetro (Crison 222), pHmetro (Crison micro-pH 2000) y el medidor redox pH 60 DHS XS para el potencial de oxidación (Thomas, 1996).

2.7.2. Carbono orgánico fácilmente oxidable

Se pesaron 0.05 g de muestra para el EC, biochares e hidrochares y 1 g en el caso de los suelos (GAM y PORT) en un erlenmeyer de 250 mL. A continuación, se agregaron 10 mL de dicromato potásico (K₂Cr₂O₇) 1 N, y se adicionaron 20 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) al 95%, dejando en reposo por 30 min. Posteriormente, se enrasó a un volumen de 100 mL con agua destilada y se preparó para su valoración con sal de Möhr ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O) 0.5 N,

agregando previamente 10 gotas de ortofenantrolina como indicador (Nelson y Sommers, 1996). El mismo procedimiento se realizó en el caso del blanco, sin agregar la muestra, únicamente los reactivos también por triplicado. El contenido en C orgánico fácilmente oxidable se expresa en porcentaje mediante la ecuación [1]:

$$\%C_{oxidable} = 10 \times \left(1 - \frac{V_m}{V_B}\right) \times \left(\frac{\frac{12}{4000}}{P_m}\right) \times 100\% \quad [1]$$

Donde:

$C_{oxidable}$ = Carbono orgánico fácilmente oxidable

V_m = Volumen valoración muestra (mL)

V_B = Volumen valoración blanco (mL)

P_m = Peso muestra (g)

2.7.3. Carbono orgánico soluble

Se pesaron 5 g de la muestra y se diluyeron en 200 mL de agua destilada, agitando durante una hora. Después se filtró la muestra en matraces de 250 mL y se obtuvieron tres réplicas por muestra de 50 mL cada una, se ubicaron en baño de arena durante 24 h. Con la muestra completamente seca se repitió el proceso previamente descrito para el $C_{oxidable}$ según Nelson y Sommers (1996), obteniendo los resultados con la siguiente fórmula [2]:

$$\%C_{Soluble} = 10 \times \left(1 - \frac{V_m}{V_B}\right) \times \frac{\frac{12}{4000}}{P_m} \times \frac{V_d}{V_r} \times 100\% \quad [2]$$

Donde:

$C_{Soluble}$ = Carbono orgánico soluble

V_m = Volumen valoración muestra (mL)

V_B = Volumen valoración blanco (mL)

P_m = Peso muestra (g)

V_d = Volumen de dilución (200 mL)

V_r = Volumen replica (50 mL)

Al igual que para el $C_{oxidable}$ se utilizaron blancos con los reactivos (dicromato potásico y ácido sulfúrico) que fueron valorados con sal de Möhr.

2.7.4. Fósforo Olsen

Inicialmente, se preparó el patrón para lo cual se disolvieron 0.439 g de fosfato de potasio monobásico en agua destilada hasta 100 mL, obteniendo el patrón de 1000 ppm, a partir de esta solución se prepararon patrones de: 20 y 10 ppm. Posteriormente, se pesó 1 g de muestra y se adicionaron 20 mL de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) a pH 8.5 y una punta de espátula de carbón activo. Se agitó por 30 min y se filtró.

Después, del filtrado se tomó 1 mL de la muestra en tubos de ensayo y 4 mL de agua destilada para cada una, siendo el volumen total de 5 mL. Adicionalmente se agregó 5 mL de nitrovanadatolibdato. Después de 30 minutos se desarrolló el color y se midió la concentración coloretricamente a 430 nm con el espectrómetro visible ultravioleta Shimadzu UV-1203 (Watanabe y Olsen, 1965). El contenido en fósforo biodisponible ($mg\ kg^{-1}$) se calculó con la siguiente fórmula [3]:

$$P\ (mg\ kg^{-1}) = P_{ppm} \times 20 \times 5\ [3]$$

Donde:

P = Fósforo Olsen en las muestras

P_{ppm} = Fósforo en el extractante obtenido en el espectrómetro (ppm)

Los números 20 y 5 hacen referencia a los 20 mL de extractante y el 5 a la dilución aplicada durante el proceso.

2.7.5. Capacidad de Intercambio Catiónico

Se utilizó el método ISO 23470 modificado, en el cual se pesaron 0.5 g de las muestras de biochar, hidrochar y residuo, se agregaron 25 mL de extractante Cohex $[Co(NH_3)_6]Cl_3$ y se dejaron en reposo durante 24 h. Para los suelos se pesaron 2.5 g. Adicionalmente, se prepararon patrones de Co de 20 ppm, 10 ppm y 5 ppm. Una vez culminado el tiempo de agitación, se filtraron las muestras y se realizó una dilución 1:40 con agua destilada, se analizaron las muestras con un espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer 2280 a una longitud de onda de 240.73 nm. Para

la calibración, el blanco corresponde a agua destilada y los patrones a las soluciones de 5, 10 y 20 ppm mientras que para las muestras el blanco es el extractante Cohex (ISO 23470, 2007).

La CIC se calculó con la siguiente fórmula [4]:

$$CIC (cmol\ kg^{-1}) = \frac{(ppm_b - ppm_m) \times V}{P_m \times M} \times 100 \times a \times d \quad [4]$$

Donde:

ppm_b = Concentración del blanco (ppm)

ppm_m = Concentración muestra (ppm)

P_m = Peso muestra (g)

M = Peso atómico del cobalto 58.93 ($g\ mol^{-1}$)

V = Volumen añadido de extractante cohex (25 mL)

a = Valencia del Co

d = Dilución aplicada (40 mL)

2.7.6. Bases de cambio

Para determinar el contenido en Ca, K y Na, se utilizó la misma dilución preparada para la CIC. Por lo cual los cambios realizados respecto al procedimiento anterior, se refieren a los patrones que para cada elemento se trabajó con diferentes concentraciones, longitudes de onda y lámparas de absorción (Tabla I- 1) (ISO 23470, 2007).

Tabla I- 1. Longitudes de onda (λ) y patrones utilizados para cada uno de los elementos de las bases de cambio.

Elemento	Longitud de onda (nm)	Patrones (ppm)
Calcio (Ca)	422.67	5 y 10
Potasio (K)	766.5	10 y 20
Sodio (Na)	589.00	10 y 20

Los resultados se expresan de acuerdo al elemento a considerar, así [5, 6, 7]:

$$Ca \text{ (cmol kg}^{-1}\text{)} = \frac{ppm_m * V}{P_m * M \text{ (Ca)}} * 100 * a * d \text{ [5]}$$

$$Na \text{ (cmol kg}^{-1}\text{)} = \frac{ppm_m * V}{P_m * M \text{ (Na)}} * 100 * a * d \text{ [6]}$$

$$K \text{ (cmol kg}^{-1}\text{)} = \frac{ppm_m * V}{P_m * M \text{ (K)}} * 100 * a * d \text{ [7]}$$

Donde:

ppm_m = Concentración muestra para cada elemento (ppm)

M = Peso atómico del elemento (g mol^{-1})

a = Carga catiónica del elemento

2.7.7. Fraccionamiento de la materia orgánica mediante Visible Ultravioleta (UV)

Para este procedimiento se pesó 0.5 g de muestra y se agregaron 25 mL de hidróxido sódico (NaOH) 0.5 N. La mezcla se agitó durante 2 h y se filtró para luego medir en el espectrómetro ultravioleta visible Shimadzu UV-1203 a tres longitudes de onda (λ): 280, 472 y 664 nm. Las muestras correspondientes a los hidrochares (HEC190 y HEC240) se diluyeron con una relación 1:4 con agua destilada, debido a que superaban los límites de detección para las correspondientes longitudes de onda. A partir de las lecturas en las diferentes longitudes de onda se determinaron las siguientes relaciones:

$$Q_{2/6} = \frac{A_{280}}{A_{664}} \text{ [8]}$$

$$Q_{4/6} = \frac{A_{472}}{A_{664}} \text{ [9]}$$

$$Q_{2/4} = \frac{A_{280}}{A_{472}} \text{ [10]}$$

El ratio $Q_{2/6}$ [8] representa la relación entre el material no humificado y el fuertemente humificado, $Q_{4/6}$ [9] se denomina como índice de humificación mientras que el $Q_{2/4}$ [10] hace referencia a la proporción entre ligninas y otros materiales en el inicio de la humificación (Zbytniewski y Buszewski, 2005). La letra A hace referencia a las absorbancias en cada λ .

2.7.8. Análisis termo-gravimétrico (TG, dTG)

El análisis termo-gravimétrico se realizó en una termobalanza Labsys Setaram. El peso de la muestra varió entre 40-50 mg y fue sometida a un tratamiento térmico hasta 850 °C en una atmosfera de aire con un flujo de 40 mL min⁻¹ y una velocidad de calentamiento de 15 °C min⁻¹ (Méndez et al., 2014). A partir de este análisis se obtuvieron las curvas TG y dTG. De igual forma se obtuvo el porcentaje de cenizas de las muestras como [11]:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\%TG_{650^{\circ}C}}{\%TG_{150^{\circ}C}} [11]$$

A partir del análisis termo-gravimétrico también se obtienen las pérdidas de peso (P) durante las siguientes franjas de temperatura: de los 25 a los 150 °C primera pérdida debido a la humedad (P1), entre los 200 y 400 °C segunda pérdida debido a la combustión de la materia orgánica (P2) y la tercera entre los 400 y 600 °C (P3) igualmente asociada a la materia orgánica. La relación P3/P2 se denomina como índice de termoestabilidad e indica la cantidad de materia orgánica más estable respecto a la menos estable (Gascó et al., 2012).

2.7.9. Isotermas de adsorción y desorción de nitrógeno

Las isotermas de adsorción y desorción de nitrógeno para las enmiendas se determinaron con un equipo 77 K Micromeritics Tristar 3.00 con el cual se obtuvo el area de superficie de Brunauer-Emmett-Teller (S_{BET}) que hace referencia al area total superficial disponible por unidad de masa del sólido. Este parámetro está relacionado con la capacidad de sorción de compuestos organicos y la actividad microbiana (M. Guo et al., 2016).

2.7.10. Análisis elemental

El contenido de C, H, N y S se determinó mediante combustión seca con un analizador LECO CHNS 932. El porcentaje de oxígeno y las relaciones de H/C, O/C y (O+N) /C se hallaron con las siguientes fórmulas [12, 13, 14, 15, 16]:

$$\% O = 100\% - (\%C + \%H + \%N + \%S + \%Cenizas) [12]$$

$$H/C = \frac{\%H}{\%C/_{12}} [13]$$

$$O/C = \frac{\%O/_{16}}{\%C/_{12}} [14]$$

$$(O + N)/C = \frac{(\%O/16 + \%N/14)}{\%C/12} \quad [15]$$

A partir de los datos del análisis elemental también se determinó el poder calorífico superior (PCS) e inferior (PCI), según el modelo planteado por Grummel y Davis (1933 En: Channiwala y Parikh, 2002; Hosokai et al., 2016) indicado para carbones y los productos de procesos de combustión incompleta (*chars*), fabricados por el hombre como es el caso de los biochars e hidrochars. Existen diferentes correlaciones para determinar los poderes caloríficos y algunas fórmulas integradas sin embargo las constantes en la ecuación utilizada son proporcionales al contenido en hidrogeno no de oxigeno como en otros casos. Las ecuaciones utilizadas fueron [16, 17]:

$$PCS (MJ kg^{-1}) = (0.0152 \cdot \%H + 0.9875) \cdot \left(\frac{\%C}{3}\right) + \%H - \left(\frac{\%O - \%S}{8}\right) \quad [16]$$

$$PCI (MJ kg^{-1}) = (1.52m_H + 98.8) \cdot \left(\left(\frac{m_C}{3}\right) + m_H - \left(\frac{(m_O - m_S)}{8}\right)\right) - 22.0 \cdot m_H \quad [17]$$

En este caso m_H , m_C , m_O , m_S son las concentraciones de H, C, O, S en proporción, no en porcentaje.

2.7.11. Porosimetría de Hg

La porosimetría de Hg se determinó con un equipo AutoPore IV 9500 – Micromeritics. Esta técnica permite trabajar con un rango de porosidad entre 3.5 nm y 500 μm determinándose el volumen de los macro (V_{macro}), meso (V_{meso}) y microporos (V_{micro}). El principio se basa en conocer el tamaño de poro a través de la tensión superficial del Hg y su ángulo de contacto con el poro asumiendo que es una partícula cilíndrica. Las presiones utilizadas son altas para asegurar resultados coherentes de la porosidad accesible (Giesche, 2006).

2.7.12. Espectroscopía de infrarojos por transformada de Fourier (FTIR)

Para las FTIR se utilizó un espectrofotómetro Bruker Vector 22 con el fin de obtener la composición química de las muestras. En este caso se da la interacción con radiación electromagnética a diferentes longitudes onda y el rango de frecuencia de infrarojos, la transformación de los datos se hace por la ecuación de Fourier (Jaggi, 2006).

2.7.13. Concentración de metales totales y fósforo total

Con el fin de conocer la concentración de metales totales y fósforo total se realizó una digestión ácida de los materiales (KULeuven, 2014a). Inicialmente se pesó 0.3 g de muestra en tubos de ensayo y se agregaron 10 mL de agua destilada. Posteriormente se adicionaron 3 mL de ácido clorhídrico concentrado al 35% (HCl) y 1 mL de ácido nítrico al 65% (HNO₃) y se ubicaron en baño maría precalentando el equipo a 60 °C con una velocidad de 2 °C min⁻¹. Una vez alcanzada dicha temperatura se programaron tres rampas: a) desde 60 °C a 120 °C durante una hora con una velocidad de 1 °C min⁻¹, b) de 120 °C a 140 °C con una velocidad de 2 °C min⁻¹ y c) 140 °C durante dos horas. Finalizado dicho proceso se filtraron las muestras en matraces aforados de 25 mL y se completó el volumen con agua destilada. La medición de los metales se llevó a cabo con la metodología de espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS).

2.7.14. Emisiones de CO₂

La respiración del EC, biochar y residuo se realizó mediante la incubación de las muestras a 20 °C durante 59 días. Se pesaron 10 g de material y se ubicaron en recipientes herméticos de vidrio con dos vasos de precipitado. La muestra se humedeció hasta alcanzar un contenido de humedad de capacidad de campo. Uno de estos con 25 mL de hidróxido sódico (NaOH) 0,3 N y el otro con 15 mL de agua destilada (mantenimiento de humedad).

En la fase inicial de incubación se llevaron a cabo diariamente medidas de CO₂ absorbido a través de la valoración del NaOH con ácido clorhídrico (HCl) 0,3 N previa adición de 10 mL de cloruro bario (BaCl₂) y 2 gotas de fenolftaleína (indicador). Con el avance del proceso de incubación, las mediciones se realizaron 3 veces por semana. La cantidad de CO₂ absorbido es equivalente a la cantidad de NaOH consumido, precipitando primero el carbonato con BaCl₂ y valorando el remanente de NaOH con HCl. Se mantuvo un blanco sin muestra, únicamente se ubicaron los vasos de precipitado con NaOH y agua (Gascó et al., 2016, 2012). La fórmula utilizada [18]:

$$CO_2 \text{ desprendido} = \frac{[V_b - V_m] \times N \times 6}{P_m} [18]$$

Donde:

V_b = Volumen HCl gastado en el blanco (mL)

V_m = Volumen HCl gastado en la muestra (mL)

N = Normalidad HCL

P_m = Peso seco muestra (g)

2.7.15. Prueba de germinación de Zucconi

Los ensayos de fitotoxicidad se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Zucconi et al. (1985), en donde se pesaron 10 g de muestra y se adicionaron 100 mL de agua destilada (relación 1:10). Se agitaron por una hora y se filtraron depositándolos por último en matraces erlenmeyer de 250 mL. Se agregaron 10 mL del extracto en placas de Petri con papel de filtro y 10 semillas de berro de jardín (*Lepidium sativum*) para cada muestra y sus respectivas replicas (Figura I- 6), almacenándolas en una incubadora a 25 °C en completa oscuridad. Adicionalmente se realizaron tres blancos en donde las alícuotas de 10 mL correspondieron a agua destilada.

Figura I- 6. Montaje prueba de germinación de Zucconi.

Pasadas 96 h de incubación se llevó a cabo el conteo de las semillas y medición de la raíz, obteniendo de esta manera el índice de germinación [19].

$$\%IG = \left(\frac{S_m}{S_b} \times \frac{LT_m}{LT_b} \right) \times 100 \text{ [19]}$$

Donde:

IG = Índice de germinación

S_m = Número de semillas germinadas en la muestra

S_b = Número de semillas germinadas en el blanco

LT_m = Promedio de la longitud total de la raíz en la muestra (cm)

LT_b = Promedio de la longitud total de la raíz en el blanco (cm)

La clasificación de la toxicidad se realizó mediante el índice de germinación, de acuerdo a la escala (Tabla I- 2) propuesta por Zucconi et al. (1985) y Emino y Warman (2004):

Tabla I- 2. Escala para el índice de germinación.

Índice de germinación	Clasificación
<50	Alta fitotoxicidad
50-80	Moderada fitotoxicidad
80-100	No fitotoxicidad
>100	Fitoestimulante

2.8. Experimentos de fitoextracción: realización de las mezclas suelo-enmiendas y montaje de experimentos

La Figura I-7 muestra el esquema del montaje de las macetas, inicialmente se adicionó una capa de grava de 100 g en todos los casos, seguido de 300 g de la correspondiente mezcla. El suelo se trató con un 10% en peso de las diferentes enmiendas, es decir, las mezclas se realizaron con un 10% de enmienda y un 90% de suelo, teniendo en cuenta que en el suelo testigo no se adicionó ningún tipo de enmienda. Las mezclas se llevaron a cabo siguiendo los tratamientos listados en la

Tabla I- 3. Se utilizaron 10 semillas para cada maceta y cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado. De igual forma se efectuó el montaje de los suelos control es decir las mismas mezclas anteriormente mencionadas, pero sin semillas para los dos suelos. Todos los tratamientos se llevaron a capacidad de campo y se determinó el peso inicial de las macetas con esta humedad. El total de las macetas se mantuvieron durante dos meses en una incubadora a 20 °C con ciclos de

12 h de luz y 12 h de oscuridad. El peso inicial se alcanzó diariamente mediante riego con agua destilada.

Tabla I- 3. Mezclas utilizadas para el montaje de los experimentos.

Tratamientos colza (C)					
Muestra	Suelo (g)	Enmienda (g)	Muestra	Suelo (g)	Enmienda (g)
GAM+C	300	-	PORT+C	300	-
GAM+BEC450+C	270	30g BEC450	PORT+BEC450+C	270	30g BEC450
GAM+BEC600+C	270	30g BEC600	PORT+BEC600+C	270	30g BEC600
GAM+HEC190+C	270	30g HEC190	PORT+HEC190+C	270	30g HEC190
GAM+HEC240+C	270	30g HEC240	PORT+HEC240+C	270	30g HEC240
GAM+EC+C	270	30g EC	PORT+EC+C	270	30g EC
Tratamientos mostaza (M)					
Muestra	Suelo (g)	Enmienda (g)	Muestra	Suelo (g)	Enmienda (g)
GAM+M	300	-	PORT+M	300	-
GAM+BEC450+M	270	30g BEC450	PORT+BEC450+M	270	30g BEC450
GAM+BEC600+M	270	30g BEC600	PORT+BEC600+M	270	30g BEC600
GAM+HEC190+M	270	30g HEC190	PORT+HEC190+M	270	30g HEC190
GAM+HEC240+M	270	30g HEC240	PORT+HEC240+M	270	30g HEC240
GAM+EC+M	270	30g EC	PORT+EC+M	270	30g EC

Figura I- 7. Esquema montaje de experimentos (ej: GAM).

2.9. Caracterización de las muestras posterior a la incubación

Transcurridos los dos meses de incubación se caracterizaron las muestras mediante la determinación de: pH y CE, propiedades biológicas y contenido en metales de las plantas y suelos. Para las propiedades biológicas se analizaron las actividades enzimáticas y la biomasa microbiana y con el fin de determinar la capacidad de fitoextracción de *Brassica napus* y *Sinapis alba*, se registró la biomasa vegetal obtenida y se calcularon el factor de bioconcentración y translocación.

2.10. Actividades enzimáticas

Se analizó la actividad enzimática de la fosfomonoesterasa, β -glucosidasa y deshidrogenasa. Para la fosfomonoesterasa se utilizó el método de Tabatabai y Bremner (1969). La β -glucosidasa se determinó mediante el procedimiento propuesto por Tabatabai (1982) y por último la deshidrogenasa la cual se llevó a cabo mediante la metodología de Camiña et al. (1998) (En: García- Izquierdo et al., 2003).

2.10.1 Fosfomonoesterasa

La metodología se basa en la medición por espectrofotometría del p-nitrofenol liberado en una solución tampón de p-nitrofenilfosfato (pH 6.5). Las muestras se realizaron por triplicado. Inicialmente se pesó 1 g de cada muestra en tubos de ensayo. Luego se adicionaron 4 mL de Tampón Universal Modificado (MUB) y 1 mL de p-nitrofenilfosfato 0.025 M (substrato), seguido de agitación manual e incubación a 37 °C en un baño de agua con agitación constante durante 1 h. Terminado este paso las muestras se trasladaron a un baño de agua fría provisto de hielo, con el fin de detener la reacción enzimática. Adicionalmente se añadieron 1 mL de cloruro cálcico (CaCl_2) 0.5 M, 4 mL de hidróxido sódico (NaOH) 0.5 M y se agitó nuevamente el contenido. Finalizando con el filtrado de las muestras y medición en el espectrómetro visible ultravioleta Shimadzu UV-1203 a una longitud de onda (λ) de 400 nm (García- Izquierdo et al., 2003).

El blanco de las muestras se efectuó con las mismas condiciones de incubación, pero únicamente con los reactivos y en lugar del sustrato agua destilada. Para el análisis de la enzima se empleó una recta de calibrado a partir de patrones de p-nitrofenol (producto): 0, 25, 50, 100 μg

mL⁻¹. El proceso se realizó de la misma manera que en las muestras, pero reemplazando el sustrato por el producto (García- Izquierdo et al., 2003).

Se utilizó la misma fórmula [20] para la obtención de valores de las tres enzimas:

$$AE = \frac{C}{P_m \times G \times T} \quad [20]$$

Donde:

AE = Actividad para la respectiva enzima ($\mu\text{mo (g h)}^{-1}$)

C = Cantidad de producto (ρ -nitrofenol o INTF) de la muestra ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

P_m = Peso molecular del producto (ρ -nitrofenol= 139 $\mu\text{g } \mu\text{mol}^{-1}$ o INTF= 471.3 $\mu\text{g } \mu\text{mol}^{-1}$)

G = Peso de muestra en base seca (g)

T = Tiempo de incubación (h)

2.10.2. β -glucosidasa

En este caso también se mide el ρ -nitrofenol pero por la acción de la β -glucosidasa posterior a la incubación en medio tamponado (pH 6.0). Primero se pesó 1 g de muestra y se agregaron 4 mL de solución MUB-HCl y 1 mL de ρ -nitrofenil β -D-glucopiranosido 25 mM. El HCl se utilizó con el fin de modificar el pH. Luego de la agitación manual, se incubaron a 37 °C durante 1 h en un baño de agua con agitación constante. La reacción enzimática transcurrido el tiempo de incubación se detuvo, seguido de la adición de 1 mL de CaCl_2 0.5 M y 4 mL de extractante THAM (tris-hidroximetil-aminometano)- NaOH (pH 12) 0.1 M. El contenido de los tubos de ensayo se filtró y se midió la actividad a una λ de 400 nm. La recta de patrón empleada fue la misma que para la fosfomonoesterasa, además de realizar un blanco de reactivos (García- Izquierdo et al., 2003). La determinación se realizó por triplicado.

2.10.3 Deshidrogenasa

La actividad deshidrogenasa se determinó con iodonitrotetrazolio formazán (INTF) y su reducción por parte del 2- ρ -iodofenil-3- ρ -nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT). Para lo cual se pesó 1 g de muestra por triplicado y se añadieron 1.5 mL Tris (tris-hidroximetil-aminometano)-HCl (pH 7.5) 1 M y 2 mL de INT (sustrato) 0.5%. La incubación se llevó a cabo durante 2 h en oscuridad

en un baño de agua con agitación continua. Pasado este tiempo, se agregaron 10 mL de etanol: DMF (dimetilformamida) 1:1, posterior agitación, reposo durante 10 min y filtrado. La medición en el espectrómetro visible ultravioleta Shimadzu UV-1203 se efectuó a 490 nm. También se valoró un blanco de reactivos y la recta de calibrado se desarrolló con patrones de producto INTF: 0, 15, 50, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El proceso se efectuó siguiendo el procedimiento de las muestras, reemplazando el sustrato por el producto (García- Izquierdo et al., 2003).

2.11. Biomasa microbiana

La biomasa microbiana se determinó mediante el método indirecto de fumigación con cloroformo. Se pesaron 5 g para las muestras fumigadas y 5 g para las no fumigadas. Posteriormente, las muestras fumigadas se ubicaron en un desecador provisto de cloroformo y se efectuó vacío durante 30 min, con el fin de saturar la atmosfera del reactivo. Una vez generadas las condiciones se mantuvieron durante 24 h. Las muestras no fumigadas se encontraban en una atmósfera normal. Transcurrido el tiempo, las muestras se trasladaron a recipientes de plástico, agregando 25 mL de sulfato de potasio (K_2SO_4) 0.5 M, se agitaron durante 30 min y se filtraron (Paz-Ferreiro et al., 2012; Vance et al., 1987).

Con el extracto resultante se tomaron alícuotas de 5 mL y se colocaron en tubos de ensayo, llevando a sequedad a 105 °C. Luego, se adicionaron 5 mL de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 0.1 N y 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) 96% y se calentaron a 105 °C durante 90 min. Luego las muestras se valoraron (fumigadas y no fumigadas) empleando sal de Mohr 0.02 M, adicionado 5 gotas de ortofenantrolina como indicador. Se realizó un blanco de valoración únicamente con los reactivos (Paz-Ferreiro et al., 2012; Vance et al., 1987). La biomasa se obtuvo con las siguientes fórmulas:

$$\%C_{oxidable} = 10 \times \left(1 - \frac{V_m}{V_B}\right) \times \left(\frac{\frac{12}{4000}}{P_m}\right) \times 100 \quad [21]$$

$$\%C_{oxidable} = \%C_{oxidable} \times 5 \quad [22]$$

$$Ec = \%C_{oxidable \text{ Fumigado}} - \%C_{oxidable \text{ No fumigado}} \quad [23]$$

$$C - biomasa (\mu\text{g g}^{-1}) = \frac{Ec}{K_{Ec}} \quad [24]$$

Las variables de la fórmula 21 son las mismas indicadas para el carbono fácilmente oxidable. Pero en la fórmula 22 se considera el volumen de alícuota (5 mL). El E_c hace referencia a la diferencia de contenido en carbono de las muestras fumigadas y no fumigadas. El K_{Ec} es el coeficiente utilizado comúnmente para suelos enmendados con materiales orgánicos ($K_{Ec}=0.45$) (Paz-Ferreiro et al., 2012; Vance et al., 1987). Resultando finalmente en la C- biomasa [24].

2.12. Determinación de la biomasa vegetal

Se determinó el peso húmedo de las hojas, tallos y raíces para cada uno de los tratamientos. Posteriormente, se llevó a sequedad a 80 °C durante 24 h con el fin de determinar el peso seco. Luego cada una de las partes fue macerada por separado para su posterior análisis.

2.13. Contenido de metales en plantas y suelos

Para la determinación de la concentración de metales totales se realizó una digestión ácida de los materiales (KULeuven, 2014a). En el caso de la biomasa vegetal (hojas, tallos y raíces) se llevó a cabo con 3 mL de ácido clorhídrico diluido (1 mL de ácido clorhídrico al 35%: 1 mL de agua destilada) y 1 mL de ácido nítrico concentrado (65%) (KULeuven, 2014b). Seguido de una etapa de calentamiento que consistió en tres rampas de temperatura. La primera con una temperatura máxima de 60 °C y una velocidad de calentamiento de 3 °C min⁻¹. La segunda entre 60 °C y 120 °C con la misma velocidad. La tercera entre 120 °C a 140 °C con un ritmo de 1 °C min⁻¹. Al alcanzar los 140 °C las muestras se mantuvieron durante 2 h en dicha temperatura.

Por último, se realizó el filtrado en matraces aforados de 25 mL y se completó el volumen con agua destilada. Para el análisis de contenido en metales totales se utilizó la Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS). En los suelos control y enmendados se implementó la misma metodología, pero en este caso se adicionó HCl concentrado. La razón de esta variación se debe a la protección del tejido vegetal en la extracción de metales en las plantas mientras que en los suelos se puede utilizar directamente el HCl al 35%.

2.13.1. Factor de bioconcentración

A partir de las concentraciones de metales totales en el tejido vegetal y en los suelos se determinó el factor de bioconcentración (BCF) el cual proporciona información sobre la extracción

del metal y se cataloga como una medida de la eficiencia en la retención de metales pesados. Este parámetro indica el contenido de metales retenido en el tejido vegetal y el almacenamiento del mismo en la parte aérea de la planta (Diwan et al., 2010; Pachura et al., 2016; Rahman et al., 2013). Cuando los valores de BCF son mayores a 1 ($BCF > 1$) indican que la especie es hiperacumuladora (Ghori et al., 2016). En el presente trabajo de investigación se determinaron dos BCF el primero (BCF-1) corresponde a la relación del contenido del metal en la parte aérea de la planta con el contenido en el suelo mientras que el segundo BCF (BFC-2) hace mención a la proporción del metal únicamente en las raíces con la del suelo. Bajo las siguientes fórmulas [25, 26]:

$$BCF - 1 = \frac{[Metal_{Hojas}]_{mg\ kg^{-1}} + [Metal_{Tallos}]_{mg\ kg^{-1}}}{[Metal_{Suelo}]_{mg\ kg^{-1}}} [25]$$

$$BCF - 2 = \frac{[Metal_{Raíces}]_{mg\ kg^{-1}}}{[Metal_{Suelo}]_{mg\ kg^{-1}}} [26]$$

2.13.2. Factor de translocación

En cuanto al factor de translocación (TF) se reconoce como la capacidad de la planta de trasladar el contenido de metal de las raíces a la parte aérea (tallos y hojas). Los valores altos sugieren una buena fitoextracción y se calcula con la siguiente fórmula (Diwan et al., 2010; Pachura et al., 2016):

$$TF(\%) = \frac{[Metal_{Hojas}]_{mg\ kg^{-1}} + [Metal_{Tallos}]_{mg\ kg^{-1}}}{[Metal_{Raíces}]_{mg\ kg^{-1}}} \times 100 [27]$$

2.14. Análisis estadístico

El análisis estadístico se utilizó para determinar la existencia de diferencias significativas en las diferentes variables analizadas. Proceso realizado a través del programa STATGRAPHICS Centurion XVI.II. Se determinó la existencia de diferencias con un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Duncan para conocer específicamente entre que tratamientos se dieron las variaciones. Teniendo en cuenta que dichas variaciones se representan por letras seguidas de los valores medios y desviaciones, en donde letras iguales muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de materiales

La caracterización de los materiales de partida permite identificar las diferencias de las propiedades físicas y químicas después de realizar el tratamiento térmico de la materia prima (Tabla I- 4). En primer lugar, se tiene que el pH aumentó en el caso de los biocharres. Caso contrario sucede en los hidrocharres, en donde se convirtieron en materiales con pH cercanos a la neutralidad posterior a la carbonización hidrotermal. Dicho cambio se encuentra relacionado con la temperatura, en donde el incremento por encima de los 300 °C produce un incremento en el contenido en cenizas, igualmente los valores altos de pH se asocian con la pérdida de grupos carboxílicos e hidroxilos durante el proceso de pirólisis (Hwang et al., 2007). En los hidrocharres debido a que las temperaturas de producción son menores, se da la descomposición de la celulosa y hemicelulosa (200- 300 °C) generando la producción de ácidos orgánicos y sustancias fenólicas, disminuyendo por ende el pH (Abe et al., 1998; Cao y Harris, 2010).

Los valores de pH para los biocharres se aproximaron a los expuestos por Lehmann y Joseph (2015) para materiales de partida como gallinaza, estiércol de pavo, purín de cerdo y estiércol de ganado con pH que varían entre 8.95 y 9.80. Otras investigaciones han reportado valores de 9.9 y 10.3 para biocharres con una temperatura de 700 °C provenientes de desechos de aves (Cantrell et al., 2012). De igual forma resultados similares fueron encontrados por Cely et al. (2015) para residuos ganaderos, donde en la gallinaza se pasa de un pH sin tratamiento térmico de 5.8 ± 0.1 a un pH de 10.6 ± 0.1 después de la pirólisis a 500 °C y para el estiércol de ganado bovino ocurre la misma tendencia con un pH inicial de 8.8 ± 0.5 y luego al producir un biochar de esta materia prima a 500 °C el pH es de 10.2 ± 0.1 . Song y Guo (2012) también describieron un aumento en el pH con la temperatura en gallinaza de 9.5 a 11.5 lo que está relacionado con el mayor contenido de cenizas y sus componentes principales K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , y CO_3^{2-} y la reducción del contenido en grupos carboxílicos e hidroxilos con la temperatura de pirólisis (Hwang et al., 2007).

Algunos trabajos realizados con hidrocharres a partir de estiércol de cerdo indican que, a temperaturas de producción entre 180 y 240 °C, los valores de pH son de 5.43 y 5.76 respectivamente. Sin embargo se debe considerar la materia prima utilizada para el presente trabajo pues el EC, tiene un pH alcalino de 9.20 ± 0.06 y en el caso del purín de cerdo, el pH de la biomasa

inicial es menor por eso los hidrochares de purín de cerdo pueden llegar a ser materiales ácidos (Liu et al., 2017), pero no es el caso de los hidrochares fabricados en el presente estudio.

La conductividad eléctrica por su parte presentó menores valores en los hidrochares en comparación con el EC y los biochares; lo que se encuentra asociado a la solubilización de sales durante el proceso de carbonización hidrotermal (Reza et al., 2014, 2013). La tendencia es similar a los resultados obtenidos por Liu et al. (2017) en el purín de cerdo, en los biochares se reporta una CE entre 0.586 ± 0.033 a $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0.919 ± 0.050 a $700\text{ }^{\circ}\text{C}$ mientras que reduce en los hidrochares a valores que oscilan entre 0.147 ± 0.005 y 0.092 ± 0.008 para las temperaturas de 180 y $240\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabla I- 4. Propiedades físicas y químicas del EC, biochares e hidrochares. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$). CE: conductividad eléctrica; C_{oxi} : carbono orgánico fácilmente oxidable; C_{sol} : carbono orgánico soluble; CIC: capacidad de intercambio catiónico; P_{redox} : potencial oxidación-reducción; P_{olsen} : fósforo Olsen, P total: fósforo total.

	EC	BEC450	BEC600	HEC190	HEC240
pH	$9.20 \pm 0.06c$	$10.28 \pm 0.07d$	$10.32 \pm 0.07d$	$7.29 \pm 0.31a$	$7.84 \pm 0.05b$
CE (dS m⁻¹)	$0.62 \pm 0.01c$	$0.60 \pm 0.00c$	$0.60 \pm 0.03c$	$0.40 \pm 0.06b$	$0.26 \pm 0.02a$
C_{oxi} (%)	$20.13 \pm 0.13c$	$11.28 \pm 0.07b$	$4.42 \pm 0.22a$	$25.04 \pm 0.79e$	$22.24 \pm 1.21d$
C_{sol}(%)	$1.72 \pm 0.03e$	$0.29 \pm 0.05b$	$0.02 \pm 0.00a$	$1.41 \pm 0.03d$	$0.95 \pm 0.01c$
CIC(cmol_c kg⁻¹)	$98.71 \pm 0.50e$	$63.06 \pm 0.65d$	$50.65 \pm 1.27c$	$39.23 \pm 0.90b$	$18.88 \pm 2.60a$
P_{redox} (mv)	338.67 ± 7.02	419.67 ± 19.5	325.67 ± 13.28	378.67 ± 15.82	291.67 ± 19.04
P_{olsen} (g kg⁻¹)	$4.70 \pm 0.01e$	$1.52 \pm 0.03c$	$1.82 \pm 0.01d$	$0.98 \pm 0.02b$	$0.88 \pm 0.01a$
P total (g kg⁻¹)	$13.74 \pm 0.01a$	$17.25 \pm 0.12c$	$16.74 \pm 0.26b$	$16.60 \pm 0.31b$	$13.66 \pm 0.16a$
Cenizas (%)	40.36	54.96	67.29	49.88	53.80
Ca (cmol_c kg⁻¹)	$19.94 \pm 0.07c$	$9.98 \pm 0.09b$	$6.05 \pm 0.31a$	$35.06 \pm 2.07e$	$26.55 \pm 0.52d$
Na (cmol_c kg⁻¹)	$26.49 \pm 0.13e$	$17.58 \pm 0.29c$	$21.21 \pm 0.28d$	$11.75 \pm 0.68b$	$7.67 \pm 0.16a$
K (cmol_c kg⁻¹)	$61.03 \pm 1.18d$	$50.6 \pm 0.84c$	$60.8 \pm 0.98d$	$27.57 \pm 0.56b$	$16.39 \pm 0.07a$

Se encontró menor concentración de Coxi en las muestras BEC450 y BEC600 con $11.28 \pm 0.07\%$ y $4.42 \pm 0.22\%$ respectivamente. Valores superados notoriamente por el EC e incluso por los hidrochares. Dichas diferencias se deben a la presencia de estructuras de carbono más estables

tras el proceso de pirólisis que no son oxidadas por el dicromato para el caso de los biochares, mientras en el proceso de HTC el carbono es lábil. Además si se tiene en cuenta las variaciones con la temperatura en cada uno de los procesos, se puede establecer que las mayores temperaturas están asociadas a concentraciones de Coxi bajas, debido a la formación de estructuras carbono más estables y aromáticas (Calvelo Pereira et al., 2011; Kang et al., 2012). En cuanto al Csol la tendencia es igual al Coxi. Los porcentajes son menores para los biochares que en el caso hidrochares por la formación de estructuras más lábiles en el caso de la HTC que en el caso de la pirólisis.

La CIC es la propiedad de los materiales de para retener cationes. Tras el tratamiento térmico del residuo, se produjo una disminución de la CIC. La CIC del EC de $98.71 \pm 0.50 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ disminuyó hasta $50.65 \pm 1.27 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ en el biochar BEC600 y hasta $18.88 \pm 2.60 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ para el hidrochar HEC240 (Tabla I- 4). Este comportamiento se relaciona con la remoción de grupos funcionales orgánicos (mayor materia volátil) y la descomposición de la lignina y la celulosa al aumentar la temperatura de pirólisis (Gaskin et al., 2008; Kloss et al., 2012). Al comparar la CIC del BEC450 y BEC600, se obtienen valores similares que con el estiércol de aves $53.8 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ mientras que el dato reportado para el estiércol de ganado vacuno es más bajo con $34.2 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ (Lehmann y Joseph, 2009b). En el caso del purín de cerdo (Gascó et al., 2018), los valores son menores teniendo en cuenta que la CIC del residuo es de $13.82 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ y en las enmiendas es de $10.93 - 13.41 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ en biochares y de $13.41 - 14.66 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ en hidrochares. Las diferencias se atribuyen al tipo de materia prima.

La cantidad de fósforo biodisponible fue mayor en el EC en comparación con los biochares e hidrochares. En los hidrochares, las concentraciones no superaron 1 g kg^{-1} y en los biochares, aun siendo algo mayores no superaron, los 2 g kg^{-1} (Tabla I- 4). Según los datos recopilados por Lehmann y Joseph (2009b), el porcentaje de fósforo disponible en comparación el fósforo total para los biochares varía ente 0.4 a 34%. Si se hace la relación en nuestro caso, los porcentajes son de 8.80 y 10.87% para el BEC450 y BEC600 respectivamente. Estos porcentajes disminuyen en el caso de los hidrochares con 5.90% para el HEC190 y 6.44% para el HEC240 de acuerdo con los resultados obtenidos por Ekpo et al. (2016a) que observó una reducción del P con la temperatura de extracción. La disponibilidad del P se ve influenciada por los cationes presentes (Al, Fe, Ca, y Mg) y también fluctúa dependiendo de la materia prima (Wang et al., 2012).

La concentración de las bases intercambiables (Ca, Na y K) fueron menores en los biocharres al comparar con el EC. A diferencia de esto, en los hidrocharres el contenido de Ca aumentó con valores de $35.06 \pm 2.07 \text{ cmol}_e \text{ kg}^{-1}$ en el HEC190 y $26.55 \pm 0.52 \text{ cmol}_e \text{ kg}^{-1}$ en el HEC240. Mientras que el Na y K disminuyeron considerablemente. El comportamiento de estas bases coincide con los resultados obtenidos por Gascó et al. (2016) en donde al comparar el purín cerdo con su respectivos biocharres a 300 y 500 °C el contenido es similar o incluso disminuye. Sobre las variaciones en los hidrocharres referentes a las bases intercambiables no existe mayor información disponible, por lo cual se requieren estudios basados en los cambios en el Ca, Na y K posterior al proceso de HTC.

El contenido de cenizas en el EC fue de 40.36 % y aumentó con la temperatura de pirólisis. Donde la muestra BEC600 presentó el mayor porcentaje de cenizas con 67.29% mientras que los hidrocharres mostraron porcentajes menores. Los resultados obtenidos para purín de cerdo por Gascó et al. (2018) son similares. Donde a partir de un 41.2% de cenizas se aumenta a 54.7% y 68.2% para los biocharres a 450 y 600 °C respectivamente. A diferencia de esto, en los hidrocharres los valores fueron de 44.0% para 200 °C y 58.6% para 240 °C. Dicho comportamiento se debe a que en el hidrochar, parte de las cenizas se pueden encontrar en la fracción líquida mientras que el biochar se mantienen en la fracción sólida (Fang et al., 2018) lo cual también se relaciona con el pH siendo los hidrocharres materiales más ácidos. Esta propiedad tiene gran importancia en cuanto a la utilidad del material pues dependiendo de la finalidad conviene el uso de una enmienda o de la otra. Siendo entonces los hidrocharres ideales como combustibles y buenos precursores de carbón activo y el biochar como enmienda en suelos por su efecto encalante. Sin embargo, existen otras variables a considerar y como se ha mencionado previamente depende de la materia prima con la que se trabaje y las condiciones de preparación (temperatura, tratamiento térmico, tiempo de residencia, etc).

Los valores de metales totales se encuentran enunciados en la Tabla I- 5. La concentración de Cd es baja en todos los materiales siendo en los biocharres ligeramente más alto que en los hidrocharres y EC. No obstante, la máxima concentración es de $0.33 \pm 0.02 \text{ mg kg}^{-1}$ para el BEC600. En cuanto al V, que no es un metal usualmente caracterizado en las enmiendas, al igual que el Cd sus concentraciones son bajas. El Cr, por su parte, tiene un considerable aumento después de los tratamientos térmicos aplicados, en donde para los biocharres, los valores son de 9.88 ± 0.26

mg kg⁻¹ y 8.48 ± 0.40 mg kg⁻¹ para el BEC450 y BEC600 respectivamente y para los hidrocharres 8.96 ± 0.11 mg kg⁻¹ para el HEC190 y 8.91 ± 0.10 mg kg⁻¹ para HEC240.

Respecto al Fe, las concentraciones son altas, pero no hay diferencias estadísticamente significativas entre los hidrocharres y el EC, mientras en los biocharres sí. Adicionalmente, se registraron valores de Co similares en todas las enmiendas exceptuando el caso de las muestras BEC450 y HEC240. La concentración de Ni aumenta después de la pirólisis y carbonización hidrotermal. En el Cu la tendencia permite agrupar contenidos similares del metal en los materiales BEC450, BEC600 y HEC240, a diferencia de esto en el HEC190 se observó el máximo valor con 78.45 ± 0.08 mg kg⁻¹ mayor al EC (66.28 ± 0.93 mg kg⁻¹). El contenido en Zn del EC y HEC240 fueron iguales y aumento para las demás enmiendas. Por otro lado, en el As se establecieron pocas diferencias entre las muestras y bajas concentraciones que no superan los 1.3 mg kg⁻¹. Por último, en el caso del Al, el contenido del metal es alto en el EC, aumenta con los biocharres y disminuye en el HEC190 y en el Pb no existen diferencias estadísticas entre las diferentes temperaturas aplicadas a los biocharres y la de los hidrocharres.

Tabla I- 5. Concentración metales totales en el EC, biocharres e hidrocharres. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan (p= 0.05).

	EC	BEC450	BEC600	HEC190	HEC240
Cd (mg kg⁻¹)	$0.23 \pm 0.02a$	$0.29 \pm 0.02b$	$0.33 \pm 0.02c$	$0.24 \pm 0.02a$	$0.26 \pm 0.00a.b$
V (mg kg⁻¹)	$5.35 \pm 0.09a$	$6.85 \pm 0.16c$	$6.10 \pm 0.17b$	$5.26 \pm 0.14a$	$6.06 \pm 0.04b$
Cr (mg kg⁻¹)	$0.97 \pm 0.00c$	$9.88 \pm 0.26b$	$8.48 \pm 0.40a$	$8.96 \pm 0.11a$	8.91 ± 0.10
Fe (g kg⁻¹)	$3.13 \pm 0.07a$	$4.33 \pm 0.10c$	$3.82 \pm 0.18b$	$3.13 \pm 0.03a$	$3.17 \pm 0a$
Co (mg kg⁻¹)	$2.09 \pm 0.07a$	$2.55 \pm 0.05c$	$2.12 \pm 0.02a$	$2.16 \pm 0.04a$	$2.27 \pm 0.02b$
Ni (mg kg⁻¹)	$4.34 \pm 0.23c$	$8.35 \pm 0.19b$	$6.29 \pm 0.47a$	$9.61 \pm 0.66b$	$8.41 \pm 0.33b$
Cu (mg kg⁻¹)	$66.28 \pm 0.93a$	$73.40 \pm 0.12b$	$71.25 \pm 2.20b$	$78.45 \pm 0.08c$	$70.99 \pm 0.13b$
Zn (g kg⁻¹)	$0.55 \pm 0.01a$	$0.70 \pm 0.03d$	$0.62 \pm 0.05c$	$0.64 \pm 0.04b$	$0.55 \pm 0a$
As (mg kg⁻¹)	$1.21 \pm 0.05a$	$1.29 \pm 0.01a$	$0.96 \pm 0.00a$	$0.88 \pm 0.02a$	$1.05 \pm 0.01a$
Al (g kg⁻¹)	$2.00 \pm 0.07a$	$3.36 \pm 0.13c$	$4.16 \pm 0.07d$	$1.98 \pm 0.11a$	$2.22 \pm 0.07b$
Pb (mg kg⁻¹)	$6.05 \pm 0.24b$	$7.27 \pm 0.27c$	$6.85 \pm 0.32c$	$4.60 \pm 0.20a$	$4.63 \pm 0.13a$

En la legislación se han determinado los límites de concentración permitidos de metales pesados para los fertilizantes, clasificando estos compuestos como A, B o C, de acuerdo a su contenido de Cd, Cu, Ni, Pb y Cr. De acuerdo a lo anterior, los presentes biocharres hidrocharres y EC no sobrepasan los rangos delimitados en la clase A para el Cd, Ni, Pb y Cr pero en el caso del Cu las enmiendas se posicionan como parte del grupo B (BOE 164- MPR, 2013). En cuanto a la normativa para sustratos de cultivo, los rangos siguen estableciendo los materiales en el grupo A para la mayoría de metales, exceptuando el caso del Cu (grupo B) y se adiciona el Zn (grupo A) que en la reglamentación de los fertilizantes no estaba reportado (BOE 170- MPR, 2010).

Algunas investigaciones también han determinado la concentración de metales pesados en residuos como el purín de cerdo (Song et al., 2017), específicamente en hidrocharres provenientes de dicha materia prima (Tabla I- 6). Realizando la respectiva comparación con los hidrocharres en el presente estudio se puede establecer que los valores de Cd son menores, pero las fluctuaciones no son altas. De igual forma sucede para el Cr que en el presente trabajo es de aproximadamente 9 mg kg^{-1} mientras que en los hidrocharres de purín fluctúa entre $6\text{-}7 \text{ mg kg}^{-1}$ exceptuando el caso del hidrochar a 240°C - 8 h con $10.52 \pm 0.07 \text{ mg kg}^{-1}$. En cuanto al Zn las concentraciones son más bajas para el EC y sus enmiendas (Tabla I- 5), sin embargo en las dos investigaciones se considera uno de los metales con mayores proporciones y el Cu varía notoriamente pero es importante aclarar que depende de la naturaleza de la materia prima.

Tabla I- 6. Concentración de metales totales (mg kg^{-1}) en hidrocharres de purín de cerdo (PC). Modificado de: Song et al., 2017.

Muestra	Cu	Zn	Cr	As	Cd	Pb
PC	1027 ± 26	2418 ± 24	6.42 ± 0.47	ND	0.06 ± 0	ND
180°C -5h	1380 ± 3	3486 ± 6	6.62 ± 0.02	ND	0.33 ± 0.02	2.83 ± 0.33
180°C -8h	1383 ± 2	3572 ± 6	6.47 ± 0.02	ND	0.31 ± 0	2.70 ± 0.1
200°C -5h	1413 ± 1	3501 ± 18	7.17 ± 0.03	0.45 ± 0.60	0.31 ± 0.02	2.28 ± 0.24
200°C -8h	1460 ± 3	3584 ± 15	7.64 ± 0.02	ND	0.31 ± 0.01	2.21 ± 0.07
240°C -5h	1651 ± 0	4039 ± 10	7.83 ± 0.03	ND	0.34 ± 0.03	3.04 ± 0.12
240°C -8h	1663 ± 3	4067 ± 3	10.52 ± 0.07	ND	0.36 ± 0.01	2.80 ± 0.16

ND: No detectado.

En la Tabla I- 7 se observa la concentración en metales en biocharres a partir de diferentes materias primas. Con esta información se puede evidenciar que la concentración en metales varía según sea la materia prima utilizada. Las comparaciones con la presente investigación concluyen que los valores de Cd se asemejan a los encontrados en los biocharres de gallinaza y estiércol de aves de corral. El Cu y Zn también se posicionan como los metales con mayor concentración mientras el As al igual que en las diferentes investigaciones es bajo.

Tabla I- 7. Concentración de metales totales (mg kg⁻¹) en biocharres a partir de residuos animales.

Muestras	Cd	Cu	Zn	As	Pb	Cr	Fe	Ni
Biochar gallinaza (Lu et al., 2015)	<0.001	96.0	614	2.1	8.2	-	-	-
Biochar purín de cerdo a 450 °C (Gascó et al., 2018)	31	115	992	-	146	32	11089	179
Biochar purín de cerdo a 600 °C (Gascó et al., 2018)	39	161	1322	-	150	36	14875	215
Biochar de estiércol de aves (Marchand et al., 2016)	<0.5	362	1100	0.57	<2	183	6320	75.1

A nivel general no existe una tendencia de comportamiento para cada metal y es importante considerar la concentración de metales totales que se tienen en los materiales si se quieren utilizar como enmiendas. Los metales totales en los biocharres son inherentes en su estructura y se derivan de su residuo de origen. Estos se acumulan y concentran en las cenizas durante el proceso de pirólisis. La mayoría de estudios han encontrado que las concentraciones de metales pesados en biocharres están por debajo de los límites requeridos para adición de compost en suelo. Así mismo existe un bajo riesgo de lixiviación de los metaloides y en este caso se debe evitar: (i) el uso de materia prima que se encuentre contaminada e (ii) introducir toxicidad adicional cuando se trata de descontaminar suelos (Lehmann y Joseph, 2015).

El análisis elemental permite evidenciar que el porcentaje de C aumentó en los biocharres y los hidrocharres siendo en estos últimos las concentraciones más altas con el incremento de la temperatura (Tabla I- 8). La presencia de mayor contenido de C en los hidrocharres comparado con el EC (biomasa) se debe a las reacciones de deshidratación y descarboxilación, en donde el H y O se transforman en H_2O y CO_2 en la parte sólida, de igual forma el tipo de C es diferente, siendo en los hidrocharres un C más alifático debido al tratamiento de la carbonización hidrotermal (Fang et al., 2018). De igual forma los biocharres también presenta mayor porcentaje de C que en el EC y se puede dar debido a que en la pirólisis las reacciones de polimerización generan estructuras de C térmicamente estables (Spokas et al., 2012).

Al cotejar los resultados de C con los rangos obtenidos para biocharres de residuos ganaderos (31.8 – 58.1%) los valores son más bajos, sin embargo se debe considerar la biomasa utilizada pues en dichas investigaciones se tienen en cuenta: gallinaza, estiércol de pavo, abono porcino, estiércol de vacas lecheras y de ganado en general (Lehmann y Joseph, 2015). Cantrell et al. (2012) encontraron que en los biocharres de gallinaza el porcentaje de C disminuye moderadamente con la temperatura hasta un 51.07% (350 °C) y hasta 45.91% (700 °C). En los biocharres de estiércol de pavo también se presentó esta tendencia a 350 °C es de 49.28% y a 700 °C es de 44.77%. Estos resultados son similares a los obtenidos para el BEC450 y BEC600 (Tabla I- 8).

Los valores encontrados en la literatura para los hidrocharres ratifican el potencial de este material para aumentar el contenido de carbono. Reza et al. (2014) recopiló el cambio entre datos de 45-51% a 55-72% después de la carbonización en residuos agrícolas como la paja, gallinaza, residuos de repollo, astillas de madera (Oliveira et al., 2013) y bagazo de caña (Chen et al., 2012) preparados a 180 °C, entre otros. En hidrocharres provenientes de purín de cerdo según Song et al. (2017), el C pasa de 41.97% a una temperatura de 180 °C durante 8 h a 47.83% a 240 °C en el mismo tiempo. Mientras en las muestras HEC190-6 h el %C es de 29.49% y en HEC240-6 h es de 29.93%, no obstante, si existe un ligero incremento.

Los otros componentes del análisis elemental tienen un comportamiento invertido en los biocharres ya que la aplicación de pirólisis disminuye el porcentaje de H, N y O con respecto al EC. De acuerdo a esto, se conoce que el aumento de la temperatura en pirólisis produce pérdida de las sustancias fácilmente descomponibles, compuesto y elementos volátiles (i.e. O, H, N, S)

(Kim et al., 2012). En los hidrocharres no existen diferencias perceptibles en contenido de N respecto al EC y % O también disminuye asociado igualmente a las elevadas temperaturas.

Las relaciones atómicas muestran una proporción H/C alta para el EC en comparación con las enmiendas, siendo considerablemente más bajo en los biocharres que en los hidrocharres e incluso a mayor temperatura dicha variable disminuye. En la relación O/C se registra igualmente un descenso desde 1.25 a 0.21 en el BEC600, siendo este el menor valor. Cuando se considera el nitrógeno ((N+O)/C) se evidenció menor relación en las muestras de biocharres e hidrocharres a mayor temperatura (BEC600 y HEC240) incluso la transformación térmica de la biomasa produce este efecto (Tabla I- 8).

Teniendo en cuenta lo anterior, el análisis elemental permite evidenciar los efectos de la temperatura en la química de las enmiendas. A nivel general, el contenido de C aumenta al aumentar la temperatura, caso contrario sucede con el H y O, los cuales disminuyen. Las causas pueden ser la organización del C en estructuras organizadas en capas y el espaciamiento entre ellas (área de superficie). Dicho espacio aumenta con el aumento de la temperatura, además en el caso de los biocharres existe un cambio notorio, en el cual se inicia con la presencia de estructuras de C en su mayoría aromáticas y una menor proporción de grupos alquilo-O y alquilo-C en las temperaturas alrededor de los 350 °C y cuando se alcanzan temperaturas > 500 °C estos grupos alquilo se transforman en arilo-C, generando por ende bajos ratios H/C, mientras que los hidrocharres producidos a 250 °C están dominados en su mayoría por restos alquílicos (Cao et al., 2011).

Tabla I- 8. Análisis elemental del EC, biocharres e hidrocharres.

Muestra	%C	%H	%N	%S	%O	H/C	O/C	(N+O)/ C	PCS (MJ kg ⁻¹)	PCI (MJ kg ⁻¹)
EC	20.37	3.11	1.94	0.32	33.91	1.83	1.25	1.33	4.66	3.97
BEC450	23.75	1.47	1.56	0.35	17.91	0.74	0.57	0.62	6.54	6.22
BEC600	23.41	1.08	1.45	0.37	6.41	0.55	0.21	0.26	7.63	7.39
HEC190	29.49	3.38	2.00	0.42	14.83	1.38	0.38	0.44	9.79	8.99
HEC240	29.93	3.10	2.00	0.42	10.76	1.24	0.27	0.33	10.27	9.54

Las relaciones atómicas se ven en el diagrama de Van Krevelen (Figura I- 8) concluyendo que los biocharres e hidrocharres tienen bajos ratios de H/C y O/C en comparación con el EC. Las relaciones atómicas se utilizan comúnmente para describir el grado de carbonización de los materiales, en donde los valores menores de H/C y O/C indican alto contenido de estructuras de carbono aromático y por ende más estable, estos ratios disminuyen con la temperatura de pirólisis y de CHT. Dicho diagrama permite reconocer las reacciones de desmetanización, deshidratación y descarboxilación. La producción de metano se da a temperaturas menores a los 300 °C, mientras que la pérdida de agua se da entre 300 y 450 °C e incluso hasta los 600 °C. Por último la producción de ácidos carboxílicos y carbonilos y CO₂ se da en la franja de temperatura entre los 450 a 600 °C. En la producción de hidrocharres los procesos predominantes son la descarboxilación y la deshidratación, teniendo entonces los hidrocharres estructuras aromáticas menos condensadas que los biocharres y por ende relaciones H/C en los hidrocharres mayores a 1 a diferencia de los biocharres que son menores que 1 (Gascó et al., 2018). Adicionalmente se debe considerar que la tasa de la reacción desde la descarboxilación a la deshidratación es más alta en la carbonización hidrotermal (Libra et al., 2011). La diferencia entre las muestras HEC190 y HEC240 también puede indicar la pérdida de los grupos funcionales oxigenados en la superficie de los hidrocharres al aumentar la temperatura, lo cual puede aumentar su hidrofobicidad (Fang et al., 2018). Otros autores también reportan el aumento del ratio H/C en hidrocharres comparado con biocharres fabricados a partir de lodos de depuradora (Paneque et al., 2017).

Figura I- 8. Diagrama de Van Krevelen para el EC, biocharres e hidrocharres.

Los poderes caloríficos calculados permiten evidenciar mayores PCS para los hidrochares respecto a los demás materiales, al igual que los PCI. El aumento de la temperatura en la pirólisis y en la carbonización aumenta dichas variables. El mayor valor de PCS, se calculó para el HEC240, siendo de 10.27 MJ kg^{-1} , diferente a otras investigaciones que reportan un valor de 17.8 MJ kg^{-1} para un hidrochar producido a partir de cascarilla de arroz a 300°C y tiempo de residencia de 6h (Kalderis et al., 2014). Las diferencias se deben a las materias primas utilizada sin embargo en los dos estudios se establece un aumento del PCS tras la carbonización.

El análisis ultravioleta (Tabla I- 9) se llevó a cabo con el fin de conocer el fraccionamiento de la materia orgánica (Eykelbosh et al., 2015; Iqbal et al., 2015). Los resultados muestran que la relación entre los materiales no humificados y los que están fuertemente humificados ($Q_{2/6}$) es menor en la biomasa (EC) obteniéndose los valores mayores para los dos biochares siendo también mayor la relación $Q_{2/6}$ para los dos hidrochares. El índice de humificación ($Q_{4/6}$) alcanzó su pico en el EC con 4.83 ± 0.09 y se observó que en los hidrochares disminuye a valores de 4.09 ± 0.08 para el HEC190 y de 3.82 ± 0.04 para el HEC240. El menor dato fue de 1.34 ± 0.04 en el BEC600, lo cual se corresponde con el comportamiento del $Q_{2/6}$. La información sobre la relación entre las ligninas y su relación con otros materiales en los inicios de la humificación se determinó mediante el $Q_{2/4}$. Este parámetro en los hidrochares no presenta diferencias estadísticamente significativas. Por lo contrario, en el BEC600 es alto (1.65 ± 0.12) y en menor grado en el BEC450 (0.72 ± 0.03). Los bajos valores de $Q_{2/6}$ y $Q_{4/6}$ se relacionan con el alto nivel de condensación aromática por ende indican la alta humificación de la materia orgánica (Gascó et al., 2012; Li et al., 2017).

Tabla I- 9. Fraccionamiento de la materia orgánica mediante UV- visible para el EC, biochares e hidrochares. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Muestras	$Q_{2/6}$ (A280/A664)	$Q_{4/6}$ (A472/A664)	$Q_{2/4}$ (A280/A472)
EC	$0.95 \pm 0.01a$	$4.83 \pm 0.09e$	$0.20 \pm 0.01a$
BEC450	$1.87 \pm 0.07c$	$2.88 \pm 0.14b$	$0.72 \pm 0.03c$
BEC600	$2.35 \pm 0.04c$	$1.34 \pm 0.04a$	$1.65 \pm 0.12d$
HEC190	$1.74 \pm 0.03b$	$4.09 \pm 0.08d$	$0.42 \pm 0.00b$
HEC240	$1.66 \pm 0.01b$	$3.82 \pm 0.04c$	$0.42 \pm 0.01b$

Las curvas de análisis termogravimétrico (TGy dTG) del EC, biochares e hidrochares se encuentran representadas en las Figura I- 9 a la Figura I- 13. El primer pico, entre 25-150°C, corresponde a la pérdida de humedad siendo menor en el BEC450 (Figura I- 10) y HEC240 (Figura I- 13) mientras que la pérdida de peso es mayor para el EC indicando una mayor retención de humedad (Figura I- 9). La segunda parte de la curva hace referencia a la pérdida de peso entre 200 °C y 600 °C haciéndose más visibles las diferencias entre los diferentes materiales. Esta región hace referencia a la combustión de la materia orgánica (Pietro y Paola, 2004) y presenta dos zonas bien diferenciadas. La primera banda corresponde a la combustión de la materia orgánica menos evolucionada (celulosa y hemicelulosa principalmente) que finaliza alrededor de los 350 °C. Posteriormente a temperaturas entre 375 °C y 600 °C, la pérdida de peso se debe a la combustión de la materia orgánica más evolucionada, es decir más humificada, que presenta estructuras aromáticas de alto peso molecular (Gascó et al., 2018; Méndez et al., 2011).

En los biochares, las pérdidas de peso son menores en la primera zona mientras que en la segunda zona es mayor, esto se relaciona con la presencia de estructura de C aromáticas estables resultado del proceso de pirólisis (Figura I- 10 y Figura I- 11). Por el contrario en HEC190 aunque es mayor la pérdida de peso de materia orgánica evolucionada los valores son cercanos a la pérdida de peso por celulosa y hemicelulosa (Figura I- 12). En el caso del HEC240 se observó que el aumento de la temperatura de la carbonización produce valores mayores de pérdida de peso en la segunda zona (Figura I- 13), lo cual se atribuye a las reacciones de polimerización/ condensación que tienen lugar en la HTC.

Entre 550 y 600 °C podría existir contribución por la descomposición de las arcillas y por encima de los 600 °C se descomponen minerales como los carbonatos (Gascó et al., 2018). Los resultados concuerdan con el comportamiento de las curvas a estas temperaturas (>600 °C) en donde es mayor para los biochares, pues los carbonatos se quedan retenidos en las cenizas mientras que en los hidrochares no, debido a las reacciones de descarboxilación (formación de CO₂) y la solubilización de los carbonatos en la fracción líquida que se dan en la HTC. Al igual que concuerda con los valores de pH y el porcentaje en cenizas que son más altos después de la pirólisis (Tabla I- 4), pero en los hidrochares tienden a disminuir. Estudios realizados que incluyen el análisis termo - gravimétrico han cotejado los resultados con el análisis químico de los materiales. Por ejemplo Xu y Chen (2013) realizaron la determinación de los porcentajes de hemicelulosa,

celulosa y lignina en cuatro biomásas: paja de arroz, salvado de arroz, estiércol de gallina y estiércol de vaca. Concluyendo que los porcentajes de los contenidos lignocelulósicos coinciden con las curvas TG y dTG. Lo cual supondría que a mayor contenido de la materia orgánica menos evolucionada, las pérdidas de peso serían mayores en la franja de los 200 °C a 350 °C mientras que si el contenido en estos tres compuestos es bajo, las pérdidas de peso también lo serían.

Figura I- 9. Curvas TG y dTG para el EC.

Figura I- 10. Curvas TG y dTG para el BEC450.

Figura I- 11. Curvas TG y dTG para el BEC600.

Figura I- 12. Curvas TG y dTG para el HEC190.

Figura I- 13. Curvas TG y dTG para el HEC240.

En la Tabla I- 10 se especifican las pérdidas de peso obtenidas de las curvas del análisis termo-gravimétrico. Como se mencionaba anteriormente el P1 corresponde a la pérdida de peso entre 25 a150 °C (pérdida de humedad). Mientras las P2 y P3 hacen referencia al intervalo de temperatura entre 200 a 600 °, siendo la P1 la descomposición de materia orgánica menos evolucionada y la P2 la más evolucionada. La relación P3/P2 se conoce también como índice de termoestabilidad (Gascó et al., 2012). De acuerdo a esto, la muestra BEC600 (5.47) presentó mayor contenido de materia orgánica estable seguido del BEC450 (4.24). El EC posee alto contenido de materia orgánica inestable en comparación con los otros materiales (0.89).

Tabla I- 10. Perdidas de peso (P) obtenidas del análisis termo – gravimétrico para el EC, biochares e hidrochares.

Muestras	P1	P2	P3	P2/(P2+P3)	P3/(P2+P3)	P3/P2
EC	7.02	29.15	25.84	0.53	0.47	0.89
BEC450	0.14	9.48	40.17	0.19	0.81	4.24
BEC600	2.14	5.56	30.44	0.15	0.85	5.47
HEC190	5.19	23.21	24.23	0.49	0.51	1.04
HEC240	0.1	20.06	26.37	0.43	0.57	1.31

En los hidrocharres, el índice de termoestabilidad (P2/P3) también es bajo (1.04 y 1.31). Lo cual concuerda con lo explicado sobre las estructuras aromáticas en los biocharres y las menos estables en los hidrocharres producidas por los respectivos tratamientos térmicos usados (pirólisis y HTC). El P3/P2 permite entonces completar el estudio térmico y es un parámetro confiable y usado continuamente (Gascó et al., 2012).

En el caso del EC, la S_{BET} es menor en comparación con las otras enmiendas (Tabla I- 11). Los hidrocharres tienen unas áreas superficiales mayores. Sin embargo, otras investigaciones establecen que el hidrochar típicamente tiene un área superficial más baja que el biochar (Dieguez-Alonso et al., 2018; Kambo y Dutta, 2015; Sun et al., 2014). Los biocharres tienen una S_{BET} entre 4.67 y 4.82 $m^2 g^{-1}$ para el BEC600 y BEC450 respectivamente. La baja área superficial que presentan los biocharres se debe principalmente a la biomasa utilizada (EC) que tiene un alto contenido en ceniza 40.46% (Tabla I- 4), a que las temperaturas utilizadas para la producción del biochar son bajas (600 °C) y a que los periodos de tiempo de residencia son cortos (1 h), unido a la ausencia de activación química que permita el aumento de dicha superficie. Con respecto al tamaño de poro, se debe destacar el alto volumen de macroporos obtenido para los hidrocharres. En los biocharres también se encuentra una mayor macroporosidad en comparación a la meso y micro, sin embargo, las proporciones son bajas si se compara con la dominancia de macroporosidad en hidrocharres. Los resultados obtenidos por Gascó et al. (2018) también registran alta porosidad para hidrocharres producidos a 220 y 240 °C a partir de purín de cerdo.

Tabla I- 11. Área superficial S_{BET} y porosimetría del EC, biocharres e hidrocharres. V_{micro} : Volumen de microporos; V_{meso} : Volumen de mesoporos; V_{macro} : Volumen de macroporos.

Muestras	$S_{BET} (m^2 g^{-1})$	$V_{micro} (cm^3 g^{-1})$	$V_{meso} (cm^3 g^{-1})$	$V_{macro} (cm^3 g^{-1})$
EC	1.1666	0.000177	0.02685	0.49131
BEC450	4.8241	0.000191	0.04379	0.90560
BEC600	4.6717	0.000372	0.03709	0.65347
HEC190	14.2089	0.083643	0.08277	119.482
HEC240	14.9601	0.102282	0.13623	153.749

La Figura I-14 muestra el espectro FTIR de los diferentes materiales. La banda de los 3400 cm^{-1} está relacionada con la presencia de grupos –OH en grupos carboxilo e hidroxilo. Se produce

una reducción de $-OH$ tras el tratamiento por pirólisis y HTC con respecto al residuo de partida. Sin embargo, esta región es más evidente en los biocharres comparado con los hidrocharres debido a las temperaturas de pirólisis y a las reacciones de deshidratación y descarboxilación que se dan en la HTC. En los 2800 y 3000 cm^{-1} tiene lugar la señal de los grupos alifáticos. En los biocharres, las reacciones de condensación y polimerización juegan un rol importante en esta banda, debido a que la intensidad disminuye con el aumento de la temperatura de operación. A diferencia de esto en los hidrocharres se observa la presencia de estos grupos incluso después de la HTC generando un ligero aumento en la intensidad de dicha banda (Figura I- 14). Lo que se puede cotejar con las variaciones de las relaciones atómicas H/C y O/C (Tabla I- 8).

Figura I- 14. Análisis FTIR del EC, biocharres e hidrocharres.

Peng et al. (2016) también coincidieron con la presencia de grupos alifáticos CH_n en la banda de 2800-3000 cm^{-1} y que se obtuvieron posterior a la carbonización de los materiales. Se puede inferir que en los hidrocharres existe mayor cantidad de estructuras de carbono lábil mientras

en los biocharres son aromáticas. De igual forma se establece que en los 1640 nm, es más débil con la pirólisis mientras que en los 1450 nm es más intenso debido a la aromaticidad. Estos autores también señalan la presencia de grupos éter y alcoholes alifáticos en celulosa/ hemicelulosa y de P-O en los fosfatos.

La Figura I- 15 muestra las emisiones de CO₂ para el EC, biocharres e hidrocharres. Las mayores emisiones de CO₂ se producen en el EC a través del tiempo, siendo el valor máximo de 61.20 mg kg⁻¹. Este valor se reduce notablemente posterior al tratamiento térmico de la biomasa, especialmente en el caso de la pirólisis con porcentajes de reducción entre 88.68% y 93.45% para los biocharres. En los hidrocharres también se observa una disminución en menor proporción que los biocharres con porcentajes de reducción de 58.99% para el HEC190 y de 68.81% para el HEC240 (Figura I- 15). Lo que demuestra los efectos positivos en la mitigación de emisiones de CO₂ producidos por los biocharres e hidrocharres. Estadísticamente no existen diferencias significativas entre las emisiones de los dos biocharres, asimismo los valores de los hidrocharres son iguales. Estudios realizados por Zimmerman et al. (2011) demuestran dichos beneficios en los biocharres y lo comparan con las diferencias una vez han sido agregados a los suelos. También se enfatiza en la importancia de conocer los efectos a largo plazo en la mineralización del carbono orgánico que tiene el biochar en la materia orgánica del suelo.

A nivel general los resultados establecen la importancia del grado de alteración térmica en la evolución del CO₂ en cortos periodos de tiempo, al igual que se relaciona con el índice de termoestabilidad de los materiales (Tabla I- 10). En donde los biocharres tienen un índice de termoestabilidad más alto y por ende la cantidad de CO₂ es menor al contener estructuras de C aromáticas mientras que en los hidrocharres el índice de termoestabilidad es menor y contienen estructuras de C lábiles, al igual que aumenta el Coxi asociado a los hidrocharres (Tabla I- 4) (Calvelo Pereira et al., 2011; Cely et al., 2015; Gascó et al., 2012). El análisis FTIR también permite dilucidar este comportamiento debido a la presencia de mayor proporción de estructuras alifáticas en los biocharres como se mencionó previamente (Figura I-14) comparado con los hidrocharres. Otras investigaciones han encontrado que los biocharres de madera y de lodos de destintado (Cely et al., 2014) reducen las emisiones de CO₂, al igual que biocharres provenientes de lodos de depuradoras (Méndez et al., 2013).

Figura I- 15. Emisiones CO₂ para el EC, biochares e hidrochares. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

La Figura I- 16 muestra los resultados de la prueba de germinación de Zucchini (Figura I- 16) establecen que todos los materiales tienen un alto grado de fitotoxicidad, exceptuando el caso del BEC600 que tiene una moderada fitotoxicidad según la escala propuesta por Zucchini et al. (1985) y Emino y Warman (2004): El índice de germinación para el EC fue 20.10 ± 2.19 mientras que en el caso del BEC600 aumentó a 65.46 ± 2.19 . Lo cual indica que el tratamiento térmico de la biomasa a 600 °C reduce la fitotoxicidad del material aun cuando sigue siendo moderadamente fitotóxico. En los hidrochares el IG presentó valores de 7.22 ± 1.46 y 12.37 ± 0.0 para el HEC190 y HEC240 respectivamente (Figura I- 16). Investigaciones previas sustentan que el hidrochar puede tener varias sustancias tóxicas para los organismos y que puede llegar a la inhibición del crecimiento de especies vegetales como el berro. Además, se plantea la degradación biológica de estas sustancias a través del tiempo y en mezcla con el suelo. Por lo cual no se debe considerar como un efecto negativo la fitotoxicidad del hidrochar evaluado únicamente en el material. Referente a los biochares se relaciona el efecto positivo con el contenido en cenizas (Busch et al., 2013), lo cual concuerda con lo obtenido en el presente estudio pues el BEC600 presentó el mayor porcentaje de cenizas entre todas las enmiendas con 67.29% (Tabla I- 4).

Figura I- 16. Índice de germinación para el EC, biochares e hidrochares. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

3.2. Caracterización de suelos

La Tabla I- 12 muestra las características fisicoquímicas de los suelos GAM y PORT. Para GAM se registró un pH ácido con un valor de 5.67 ± 0.11 , por el contrario, el pH para PORT fue de 8.16 ± 0.03 siendo en este caso alcalino. Los valores de conductividad son menores para PORT al igual que su C_{oxi} . La CIC es superior en PORT con un valor de $23.89 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ y las bases de cambio tienen un comportamiento independiente siendo el Na mayor en PORT que en GAM y en el caso del K sucede lo contrario. El fósforo total en GAM es de $862.07 \pm 33.46 \text{ mg kg}^{-1}$, valor alto en comparación con el fósforo encontrado en PORT de $337.34 \pm 9.11 \text{ mg kg}^{-1}$. Algunas investigaciones han reportado el aumento de As en pH básicos (Bolan et al., 2014; Lomaglio et al., 2017). Comportamiento que se mantiene en el presente estudio con una media de As de $151.38 \pm 6.23 \text{ mg kg}^{-1}$ en PORT que posee un pH alcalino. Por el contrario, en GAM la concentración de As es menor con $60.96 \pm 2.94 \text{ mg kg}^{-1}$ producto del pH ácido de dicho suelo. Dichos autores también reportan la disminución de Cd, Pb, Zn en suelos alcalinos. Corroborado en los datos de metales presentados en la Tabla I- 12, siendo entonces las concentraciones de Cd, Zn y Pb bajas en PORT, con valores de $3.03 \pm 0.23 \text{ mg kg}^{-1}$, $2234.44 \pm 60.8 \text{ mg kg}^{-1}$ y $2738.12 \pm 184.24 \text{ mg kg}^{-1}$ respectivamente,

cotejado con GAM. Aun cuando se evidencian diferencias entre los metales para los dos suelos, los datos más elevados en los dos casos corresponden al Fe, Zn, Al y Pb.

Tabla I- 12. Propiedades fisicoquímicas de la caracterización inicial de los suelos. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

	GAM	PORT
Textura	Franco arcillo arenoso	Franco arenoso
pH	$5.67 \pm 0.11a$	$8.16 \pm 0.03b$
CE (dS m⁻¹)	$0.49 \pm 0.08b$	$0.19 \pm 0.00a$
C_{oxi} (%)	$1.73 \pm 0.09b$	$0.78 \pm 0.05a$
CIC (cmol_c kg⁻¹)	$10.23 \pm 0.20a$	$23.89 \pm 0.78b$
Na (cmol_c kg⁻¹)	$17.06 \pm 0.7a$	$68.59 \pm 3.56b$
K (cmol_c kg⁻¹)	$22.22 \pm 1.06b$	$12.91 \pm 0.26a$
P (mg kg⁻¹)	$862.07 \pm 33.46b$	$337.34 \pm 9.11a$
Cd (mg kg⁻¹)	$10.53 \pm 0.26b$	$3.03 \pm 0.23a$
V (mg kg⁻¹)	$62.34 \pm 3.39a$	$70.99 \pm 1.52b$
Cr (mg kg⁻¹)	$48.48 \pm 0.81b$	$44.32 \pm 1.61a$
Fe (mg kg⁻¹)	$170761.34 \pm 4800.84b$	$90198.65 \pm 436.59a$
Co (mg kg⁻¹)	$20.55 \pm 2.48b$	$14.85 \pm 0.41a$
Ni (mg kg⁻¹)	$38.11 \pm 5.14a$	$42.06 \pm 3.9a$
Cu (mg kg⁻¹)	$16.55 \pm 0.45a$	$35.13 \pm 1.16b$
Zn (mg kg⁻¹)	$10083.75 \pm 332.19b$	$2234.44 \pm 60.8a$
As (mg kg⁻¹)	$60.96 \pm 2.94a$	$151.38 \pm 6.23b$
Al (mg kg⁻¹)	$15989.58 \pm 658.01a$	$23906.33 \pm 2353.33b$
Pb (mg kg⁻¹)	$2323.9 \pm 146.39a$	$2738.12 \pm 184.24a$

Al comparar la concentración de metales con los NGR establecidos por las comunidades autónomas aleñadas a las áreas de muestreo, en el caso de GAM, la comunidad autónoma de Asturias y para PORT Andalucía se establece la contaminación de los suelos para los siguientes metales: As, Cd, Pb, V y Zn. Para el Zn y Cd solo se considera la contaminación en GAM debido a que en PORT la legislación permite un nivel superior de concentración para este metal. La consideración se llevó a cabo cotejando los valores determinados para otros usos, en los cuales se incluye el uso agrícola. La legislación de las zonas mineras estudiadas (Cantabria y Murcia) no se

encuentra definida, los rangos que delimitan dicha contaminación se encuentran registrados en la Tabla 5 (Consejería de Fomento, Ordenación del Territorio y Medio Ambiente- Principado de Asturias, 2014; Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio- Junta de Andalucía, 2015). A nivel europeo, la legislación comúnmente utilizada es la finlandesa (Tabla 3) y según los rangos delimitados para los metales en esta normativa, se tiene que los suelos sobrepasan los límites, únicamente en el caso de As, Pb y Zn (Tabla I- 12). Dicha caracterización inicial es esencial debido a que permite evidenciar los efectos de la adición de biochar, hidrochar y EC teniendo en cuenta que los resultados en las variaciones de las propiedades de los suelos y el comportamiento de los metales dependen de varios factores: (i) tipo de materia prima utilizada en la fabricación de enmiendas, (ii) temperatura de producción, (iii) tipo de suelo utilizado. Aspectos como el pH, son claves en el comportamiento de los metales (Puga et al., 2016) pero no es la única variable que afecta la especiación, también lo hace la CIC, CE, capacidad de retención de humedad y el área superficial, entre otras. El aumento en la CIC y la superficie pueden incrementar la retención de metales, así como la precipitación y coprecipitación de los mismos (Kambo y Dutta, 2015).

3.3. Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de *Brassica napus* en el pH, CE y las propiedades biológicas de los suelos

Para el análisis de los resultados, los suelos control hacen referencia a los testigos (GAM y PORT) y los suelos enmendados sin crecimiento de planta. El pH y la CE posterior a los meses de incubación en los suelos permitió establecer diferencias estadísticamente significativas entre los suelos testigo y los suelos enmendados con y sin crecimiento de *Brassica napus*. En el caso de GAM, en los suelos sin planta se observa un aumento del pH al agregar las enmiendas, siendo los valores más altos en los biochar (GAM+BEC450 y GAM+BEC600). No obstante, el aumento del pH es más significativo en los suelos enmendados con los biochar y con crecimiento de la planta. Los valores de pH en los tratamientos de *B. napus* son más altos respecto a los suelos control, incluso GAM tiene un pH de 7.49 ± 0.06 . La adición de HEC190 y EC en los tratamientos con colza disminuye el pH con valores 7.41 ± 0.01 y 7.38 ± 0.04 para GAM+HEC190 y GAM+EC respectivamente. Se observa como la adición de los biochar genera un efecto encalante mientras las otras enmiendas mantienen los pH cercanos a la neutralidad ($\text{pH} > 7.24$) (Figura I- 17a).

Figura I- 17. pH en los suelos control y con *Brassica napus*: a. GAM y b. PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 18. CE (dS m^{-1}) en los suelos control y con *Brassica napus*: a. GAM y b. PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

En PORT, el pH disminuye al agregar los hidrochares y el EC, mientras aumenta al adicionar los biochares tanto en los controles como los suelos con *B. napus*. Teniendo en cuenta que para PORT control y PORT con crecimiento de colza los valores de pH son de 7.87 ± 0.01 y 8.02 ± 0.03 respectivamente. La combinación de la fitoextracción con biochares como enmienda en los suelos maximiza el aumento del pH en el suelo. Los intervalos de pH, para los tratamientos de GAM+BEM450 y GAM+BEC600 con y sin colza, varían entre 8.11 ± 0.02 y 8.28 ± 0.01 (Figura I- 17b). Los cambios en el pH del suelo al adicionar enmiendas se debe esencialmente al pH de los materiales (Tabla I- 4). Tendiendo los hidrochares menores valores de pH que los biochares, resultados ya datados por otras investigaciones (Liu et al., 2017). Además de considerar el efecto encalante de los biochares (Albuquerque et al., 2014). En la presente investigación, ninguno de los suelos enmendados presentó el cambio de alcalino a un pH ácido. Existen ciertas materias primas, que pueden generar hidrochares con pH realmente bajos que pueden afectar la remediación del suelo, como el caso de hidrochares producidos a partir de purín de cerdo (Liu et al., 2017).

La CE aumentó significativamente en los suelos enmendados en comparación con GAM. El incremento es mayor en los suelos con los dos biochares, seguido por el GAM+EC y luego los hidrochares. Los suelos con crecimiento de planta poseen CE menores que sin presencia de colza. No obstante, se sigue la misma tendencia pues los valores son mayores en las mezclas con biochares y menores con los hidrochares (Figura I- 18a).

La CE en los suelos de Portmán no superaron los 2 dS m^{-1} pero todas las enmiendas aumentan los valores respecto a PORT y PORT con *Brassica napus*, siendo mayores los datos registrados en los suelos enmendados con el biochar BEC450, especialmente el caso de PORT+BEC450 control, con un $2 \pm 0.02 \text{ dS m}^{-1}$. Estadísticamente no hay diferencias en los suelos enmendados con BEC600 y EC exceptuando el caso de PORT+BEC600 con *B. napus* (Figura I- 18b). Los hidrochares mejoran la CE, pero sus efectos son menos notorios en comparación con las otras enmiendas. Estos resultados siguen el mismo comportamiento encontrado por diferentes autores (Ahmad et al., 2017; Chan et al., 2008), los cuales sustentan el aumento de la CE con la adición de biochar además de encontrar una correlación positiva entre el pH y la CE. Situación similar en el presente estudio pues el aumento del pH coincide con el aumento de la CE.

La correlación de Pearson realizada entre los valores de pH y CE muestran una correlación positiva. El R^2 para los tratamientos GAM control es de 0.84 y un coeficiente de correlación de 0.92, mientras que en los tratamientos GAM+ *Brassica napus* la correlación es baja ($R^2= 0.36$; $P=0.60$). En las mezclas de PORT, los controles y los suelos con *Brassica napus*, el pH y la CE tienen menor correlación con valores de R^2 de 0.24 y 0.09 respectivamente y con coeficientes de correlación de 0.49 y 0.31. Las actividades enzimáticas se utilizaron como un indicador de la calidad del suelo, siendo entonces el índice GMea sensible a la contaminación del suelo (Bastida et al., 2008). Inicialmente se tiene la actividad enzimática de la fosfomonoesterasa, en la cual, en los tratamientos de Gamonedo, no se evidencia ninguna diferencia entre GAM y GAM+BEC450 con y sin planta. La adición del BEC600 incluso genera una menor actividad para GAM+BEC600 control. Por el contrario, los hidrochares y el EC estimulan la actividad de la enzima con los mayores valores en GAM+HEC240. Esta tendencia es igual en los suelos con y sin *B. napus* (Figura I- 19a).

En Portmán todas las enmiendas mejoran la actividad de la fosfomonoesterasa y al igual que en Gamonedo, la muestra PORT+HEC240 registra un aumento considerable con y sin crecimiento de la especie vegetal. De todos los materiales, el HEC190 incrementa la enzima en menor grado. No existen diferencias entre tratamientos con y sin planta exceptuando el caso PORT+BEC450+ *Brassica napus* que tiene una baja actividad respecto al su control (PORT+BEC450) mientras que en el PORT+EC sucede lo contrario, la actividad aumenta en PORT+EC+ *Brassica napus* (Figura I- 19b).

La β -glucosidasa presenta mayores concentraciones en los tratamientos de GAM+HEC190, GAM+HEC240 y GAM+EC con y sin planta. Los valores en los suelos enmendados con biochar son menores que el GAM y GAM con crecimiento de *B. napus*. El menor dato se registró en el tratamiento GAM+BEC450+ *Brassica napus* (Figura I- 20a). Para PORT la actividad disminuye si se compara con GAM y no existen diferencias estadísticamente significativas entre PORT y PORT+BEC450 control y con planta. Los hidrochares y el EC parecen causar un efecto positivo al adicionarse al suelo PORT, sin embargo no parece existir mayor efecto al combinar la adición de HEC190, HEC240 y EC con el crecimiento de la colza pues aunque la actividad incrementa respecto al suelo testigo (PORT) disminuye respecto a los controles de estas mezclas (PORT+HEC190, PORT+HEC240 y PORT+EC sin planta) (Figura I- 20b).

Figura I- 19. Fosfomonoesterasa con *Brassica napus*: a. GAM y b. PORT. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).

Figura I- 20. β-glucosidasa con *Brassica napus*: a. GAM y b. PORT. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).

Comparando los resultados obtenidos en la actividad de la deshidrogenasa, en los tratamientos con presencia de colza se puede concluir que no existen diferencias entre GAM y GAM+ biochar, por el contrario, los hidrochar y el EC incrementan la actividad, específicamente el HEC240. La concentración de deshidrogenasa es menor en GAM+ *Brassica napus* que GAM, pero la muestra GAM+HEC240 siguen siendo la más notoria (Figura I- 21a). En las muestras de Portmán no existen diferencias entre el testigo PORT y las mezclas con los dos biochar. La adición de HEC190 y EC tiene el mismo comportamiento, mejorando la actividad, excepto en el caso de PORT+HEC190+ *Brassica napus* que tiene un valor menor, pero sigue incrementando la actividad cotejando con PORT. La mayor concentración, una vez más se da en PORT+HEC240 (Figura I- 21b).

El índice GMea, al integrar las actividades de las tres enzimas, tiene una tendencia similar en las diferentes mezclas. En Gamoneda, no se observan diferencias entre GAM y la adición de los dos biochar. A diferencia de esto, los hidrochar y el EC aumentan considerablemente las actividades en los suelos con y sin planta. De estas tres enmiendas, que proporcionaron los mejores resultados, se establece la siguiente tendencia: GAM+EC=GAM+EC+ *Brassica napus* < GAM+HEC190+ *Brassica napus* < GAM+HEC190=GAM+HEC240+ *Brassica napus* < GAM+HEC240 (Figura I- 22a). En el caso de portmán, la adición de biochar, hidrochar y EC aumentaron el GMea excepto el caso de PORT+BEC450+ *Brassica napus* sin diferencias con PORT (Figura I- 22b). Los mayores valores se vuelven a registrar en PORT+HEC240 control.

La secuencia de los valores más altos del índice GMea en PORT es la siguiente: PORT+HEC190+ *Brassica napus* < PORT+EC= PORT+EC+ *Brassica napus* < PORT+HEC190=PORT+HEC240+ *Brassica napus* < PORT+HEC240. En general, las tres enzimas presentan mayor actividad con los hidrochar y el EC. Sin embargo, la adición de los biochar tiene un efecto nulo (no hay diferencias) en comparación con los suelos control. Otras investigaciones llevadas a cabo con biochar, obtuvieron baja actividad de la enzima fosfomonoesterasa con el biochar producido a 500° C mientras que la actividad aumentó en el biochar producido a 300 °C y la biomasa sin tratar (purín de cerdo). Logrando establecer los beneficios de los residuos ganaderos pues en el presente trabajo también se obtienen incrementos con el EC.

Figura I- 21. Deshidrogenasa con *Brassica napus*: a. GAM y b. PORT. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

Figura I- 22. Índice GMea con *Brassica napus*: a. GAM y b. PORT. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

La ausencia de variaciones en la fosfomonoesterasa al usar biochar puede deberse a la temperatura de producción del material (Gascó et al., 2016), teniendo en cuenta que las temperaturas utilizadas fueron de 450 °C y 500°C. Es importante resaltar que en ninguno de los experimentos la actividad de la fosfomonoesterasa fue menor que en el suelo testigo, no obstante fueron bajos si se comparan con los hidrochares y el EC. Contrario a lo sucedido, Liang et al. (2014) reporta un aumento de la fosfomonoesterasa al adicionar biochar al suelo proveniente de gallinaza y producido a 400 °C.

Paz-Ferreiro et al. (2012) establecen que la β -glucosadas disminuye al adicionarse biochar al suelo. Lammirato et al. (2011) reportó la inhibición en la actividad de la β -glucosidasa después de la adición de un biochar derivado de madera y lo relaciona con la liberación de compuestos aromáticos, como los fenoles y polifenoles. Estos resultados son comparables con lo datado en la muestra GAM+BEC450 con crecimiento de *B. napus* siendo la única muestra que disminuye la actividad enzimática en comparación con el suelo testigo mientras que en PORT no existen diferencias estadísticamente significativas al adicionar biochar. Este último comportamiento también fue evidenciado por Elzobair et al. (2016), quienes no encontraron variaciones con la mezcla de suelo más biochar.

La deshidrogenasa no presentó diferencias significativas al igual que otros trabajos realizados con biochar de gallinaza (Mierzwa-Hersztek et al., 2016), lo cual se puede deber a la materia volátil y la materia orgánica lábil de la enmienda (Gascó et al., 2016). Ameloot et al. (2014) encontró mayor actividad de la deshidrogenasa pero en un biochar producido a 350 °C, temperatura menor que las utilizadas para producir los biochar. En cuanto al GMea es evidente el aumento de este índice en los suelos tratados con los hidrochares, lo que a su vez permite establecer que este material aumenta la calidad del suelo. Dicho incremento por parte de este material ya ha sido reportado por Bamminger et al. (2014) y lo relacionan con el aumento de la biomasa microbiana al adicionar el hidrochar y por consiguiente el desarrollo de mayor sustrato (enzimas). Teniendo en cuenta esta hipótesis otros autores han reportado más actividad en la microbiota del suelo al agregar hidrochar que en los biochar debido a la alta degradabilidad de los hidrochares (Fang et al., 2018; Kambo y Dutta, 2015).

Respecto a la biomasa microbiana en los tratamientos de GAM, la adición de enmiendas incrementa el carbón asociado a la biomasa, hablando de las muestras sin crecimiento de planta, pero el valor más alto corresponde a GAM+BEC450 mostrando diferencias significativas. En la presencia de *Brassica napus* la biomasa es más alta con la adición de HEC240 y EC (Figura I- 23).

Figura I- 23. Biomasa microbiana (C- biomasa) con *Brassica napus* para GAM. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

En los tratamientos de PORT la adición de los hidrocharres y el EC presentan mayor actividad microbiana que la adición de los biocharres con y sin crecimiento de planta, no obstante existen diferencias estadísticas entre la adición de HEC190, HEC240 y EC, siendo el HEC190 el mejor escenario para el crecimiento de los microorganismos por lo menos en los suelos control mientras que en los suelos con *Brassica napus*, la mejor enmienda es el EC (Figura I- 24).

Figura I- 24. Biomasa microbiana (C- biomasa) con *Brassica napus* para PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Los resultados de la biomasa microbiana en los dos suelos permiten establecer que la adición de enmiendas mejora la actividad de los microorganismos, siendo mayor para PORT y sus mezclas con el mayor promedio de $2564.37 \pm 93.00 \mu\text{g g}^{-1}$, mientras en GAM fue de $1160.92 \pm 82.864 \mu\text{g g}^{-1}$. Las variaciones entre los suelos se deben a las diferentes propiedades que cada uno posee. Los beneficios en la biomasa microbiana al mezclar los suelos con materiales como estiércol de animales ya han sido publicados por otros autores (Malik et al., 2013) y lo relacionan con el aporte de nutrientes y el contenido de carbono. Bajo esta perspectiva, en el presente estudio el EC se establece que como una de las enmiendas que potencia el desarrollo de los microorganismos, resultado en una mayor biomasa. Si se observan los resultados en la caracterización inicial de los materiales, el EC contiene altas concentraciones de carbono orgánico oxidable y soluble (Tabla I- 4) al igual que el análisis elemental indica el alto porcentaje de C en dicho material (Tabla I- 8).

En cuanto a la comparación entre los efectos de los biocharres e hidrocharres, se observa que los dos materiales promueven la biomasa, pero los hidrocharres potencializan el crecimiento de la

microbiota en mayor medida. Siendo estos datos comparables con lo obtenido por Bargmann et al. (2014) quienes reportan un aumento de la biomasa microbiana significativo con el biochar, pero bajo en comparación con el aumento propiciado por el hidrochar. Lo anterior se da por el alto contenido de estructuras de carbono lábil en los hidrochares que lo hacen menos estable al ser agregado al suelo, corroborado también por las relaciones molares H:C y O:C de los materiales, que son altas en los hidrochares en comparación que los biochares. Al igual que los resultados obtenidos en este estudio, para el HEC190 y HEC240 con mayores H:C y O:C cotejando con los datos para los BEC450 y BEC600 (Tabla I- 8).

3.4. Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de *Brassica napus* en el contenido de metales en los suelos y fósforo total.

La concentración de metales totales difiere para cada metal y el análisis se realizó para un total de 11 metales: Cd, V, Cr, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Al y Pb. En general, la adición de enmiendas permite reducir la concentración de metales en los suelos pero no en todos los casos es estadísticamente significativo (Figura I- 25). En el caso del Cd, en GAM se observa una disminución de la concentración del metal al adicionar las enmiendas pero no hay diferencias entre las mismas, al igual que no hay variaciones con el crecimiento de la colza (Figura I- 25a). La cantidad de Cd en PORT es menor comparado con GAM, no obstante la adición de enmiendas no generó ningún cambio en los suelos ni la combinación con la fitoextracción, siendo todas las muestras estadísticamente iguales (Figura I- 25b). Situación similar a lo encontrado en el comportamiento del V en GAM donde no existen diferencias entre los tratamientos (Figura I- 25c). En PORT el suelo control y con *Brassica napus* presentan cantidades de V estadísticamente iguales pero los datos son menores al adicionar las enmiendas, sin existir diferencias entre ellas, exceptuando el caso del BEC450 para el suelos con presencia de colza (Figura I- 25d). En el Cr, el uso de biochares, hidrochares y EC permite el mismo comportamiento del metal, el cual disminuye respecto a los suelos sin enmendar en los dos suelos GAM y PORT, en particular las muestras GAM+EC y PORT+BEC450 con *Brassica napus* poseen los menores valores (Figura I- 25e y f).

Los suelos controles enmendados presentan diferencias con el suelo testigo GAM para el Fe, siendo menor en todos los casos; la presencia de *Brassica napus* genera mayor cantidad de

variaciones en los suelos enmendados y disminuye más las concentraciones de Fe (Figura I- 25g). El contenido en Fe no varía entre enmiendas en el suelo de PORT, sin embargo, se sigue manteniendo la misma tendencia de reducción en estos suelos enmendados (Figura I- 25h). Las concentraciones de Co son iguales en todas las muestras de GAM (Figura I- 25i), mientras en PORT se ve un efecto positivo al adicionar los materiales orgánicos, la influencia de la colza en este caso parece ser insignificante excepto en la combinación con BEC450 (Figura I- 25j). Lo mismo sucede con el Ni, siendo la concentración de este metal igual en todas las muestras tanto para GAM (Figura I- 25k) como PORT, el único promedio más bajo que los suelos testigo se presenta en PORT+BEC450 con *Brassica napus* (Figura I- 25l). En cuanto al Cu, la tendencia cambia siendo los valores de dicho metal más altos al adicionar las enmiendas en los dos suelos testigo (GAM y PORT) (Figura I- 25m y n). La reducción de las concentraciones de Zn después de aplicar los biocharres, hidrocharres y el EC son significativas pero no hay un claro comportamiento al compararlas individualmente en GAM (Figura I- 25ñ) y PORT ni con el crecimiento de la colza (Figura I- 25o). Para el As (Figura I- 25p y q) y Al (Figura I- 25r y s), se siguen manteniendo los beneficios de las enmiendas pero las variaciones entre ellas son estadísticamente insignificantes y la presencia de *Brassica napus* no altera esto. Por último, el Pb no registra modificaciones entre los suelos con y sin enmiendas ni con el crecimiento de la especie vegetal para ninguno de los suelos estudiados (Figura I- 25t y u).

La concentración de los metales y su movilidad puede variar según el metal al cual se hace mención, generalmente uno de los factores ligado con el comportamiento de los mismos, es el pH del suelo. Algunos autores (Bolan et al., 2014; Lomaglio et al., 2017) aseguran que la movilidad de los metales catiónicos Cd, Zn y Pb aumenta en la presencia de pH ácidos mientras que para los aniónicos como el As disminuye. Verificando las variaciones de pH en las muestras del presente estudio (Figura I- 17 a y b) posterior a la adición de las enmiendas y el tiempo de crecimiento de la planta se puede concluir que los cambios en esta variable no llegan alcanzar pH realmente ácidos y aunque los biocharres si tienen un efecto encalante, la adición de los hidrocharres, no disminuye el pH por debajo de 7, lo cual concuerda con la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de concentración de metales diferenciando entre enmiendas.

Figura I- 25. Metales totales en los suelos control y con *Brassica napus*. a. Cd en GAM, b. Cd en PORT, c. V en GAM, d. V en PORT, e. Cr en GAM, f. Cr en PORT, g. Fe en GAM, h. Fe en PORT, i. Co en GAM, j. Co en PORT, k. Ni en GAM, l. Ni en PORT, m. Cu en GAM, n. Cu en PORT, ñ. Zn en GAM, o. Zn en PORT, p. As en GAM, q. As en PORT, r. Al en GAM, s. Al en PORT, t. Pb en GAM, u. Pb en PORT, v. P en GAM, w. P en PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas Duncan ($p= 0.05$).

Como se hizo mención previamente y según el marco europeo, los suelos presentan contenidos de As, Zn y Pb que sobrepasan los límites superiores para su uso agrícola. En el caso del Zn para GAM el promedio fue de 10083 mg kg⁻¹ en el suelo testigo y el uso de biochar, hidrochar y EC disminuyeron las concentraciones con y sin crecimiento de *Brassica napus*. Mientras que en PORT las concentraciones fueron de 2234 mg kg⁻¹ para PORT sin planta y de 2231 mg kg⁻¹ para PORT con *Brassica napus* y aun siendo más altas la presencia de enmiendas permitió la inmovilización del metal. Las enmiendas orgánicas utilizadas en el presente trabajo ya han sido documentadas como materiales viables para retener los metales y ayudar la inmovilización de los mismos en el suelo, refiriéndose al uso de biochar (Beesley et al., 2014; Kim et al., 2014). Sigua et al. (2019) utilizó biochar a partir de residuos ganaderos y estableció los beneficios de este en la mejora de la calidad de suelos mineros. Estos autores también relacionan el potencial del biochar para maximizar la producción de biomasa vegetal y en general el crecimiento de la planta *Zea mays*. En comparación con esta investigación el crecimiento de *Brassica napus* no presentó diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la concentración de metales en los suelos, no obstante, el potencial de esta especie como hiperacumuladora será detallado en las siguientes secciones.

Otras investigaciones explican la formación de complejos metálicos en la superficie del biochar debido a sus grupos funcionales, lo cual conlleva a la precipitación mineral del metal y de forma extendida afirma el potencial del biochar para mejorar la calidad del suelo debido a su eficacia de remoción o de estabilización de los metales (Kim et al., 2014). Beesley y Marmiroli (2011) encontraron que el biochar reduce la concentración de Cd y Zn, mayormente de Zn y que el efecto es el resultado al incremento del pH debido a la adición de la enmienda, donde el aumento de la alcalinidad asiste la retención de Cd y Zn. En el caso particular del Cu el aumento tras la mezcla con los biochar, hidrochar y EC se atribuye a la concentración inicial de este metal en las enmiendas, pues según la caracterización previa (Tabla I- 5) los valores para el Cu son altos, sin embargo en ninguno de los casos se sobrepasan los límites legislativos.

Por último, el comportamiento del fósforo total permite evidenciar el aporte de este nutriente en los suelos tras la adición de los materiales orgánicos, siendo considerablemente más alto en los suelos enmendados que en los suelos testigo (GAM y PORT), las diferencias estadísticas

permiten establecer que las muestras con BEC450, BEC600 y HEC190 promueven el contenido de P total en comparación con el HEC240 y el EC para los dos suelos (Figura I- 25 v y w).

3.5. Capacidad de fitoextracción de *Brassica napus*

3.5.1. Producción de biomasa vegetal de *Brassica napus*

La mayor producción de biomasa vegetal total se observa en GAM+EC. Sin embargo no existen diferencias estadísticamente al comparar las hojas, tallos y raíces entre sí para los tratamientos de Gamonedo (Figura I- 26). En portmán se evidencia los mejores resultados de biomasa total con el BEC600, pero las variaciones entre el testigo PORT y PORT+BEC600 son bajas. Por su parte la biomasa desarrollada por las hojas es significativamente diferente en PORT+BEC600, siendo en mayor que en PORT, igual sucede para PORT+EC. En cuanto a los tallos y las raíces no existe una clara influencia en la adición de enmiendas para potenciar el desarrollo de tejido vegetal (Figura I- 27). En los dos suelos y en todos los tratamientos la biomasa es mayor para las raíces que la parte superior de la planta (hojas y tallos). Resultado justificable debido a que las raíces son las que proveen el alimento y regulan los procesos de la planta.

Figura I- 26. Biomasa vegetal de *Brassica napus* en GAM. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 27. Biomasa vegetal de *Brassica napus* en PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

3.5.1. Factor de bioconcentración (BCF) y translocación (TF) de *Brassica napus*

El BCF determinado para el Cd muestra que en GAM, *Brassica napus* no acumula el metal en la parte aérea, mientras que en las raíces este metal puede fitoacumularse especialmente en los tratamiento con biocharres (Figura I- 28). En el caso de PORT, los niveles del BCF-2 permiten catalogar la planta como acumuladora con $BCF > 1$ para todos los tratamientos incluso el suelo sin enmendar, las enmiendas mantienen este potencial excepto en el caso del suelo enmendando con HEC190 donde el BCF-2 es significativamente bajo en comparación con los otros materiales, mientras que en el caso de la adición BEC600 la actividad de extracción por parte de la colza aumenta (Figura I- 28). Para el V, aunque las raíces son las que mantienen la mayor cantidad de metal, no existe un potencial de acumulación por parte *Brassica napus* en ninguno de los suelos (Figura I- 29) incluso el BCF-1 determinado para las hojas y tallos es menor a 0.1. En el caso del Cr (Figura I- 30) y Co (Figura I- 31) no se presenta mayor variación entre las enmiendas, ninguno

de los BCF calculados sobrepasa el 1 y siguen siendo más altos los valores del BCF-2 que los del BCF-1, indicando que la poca acumulación se realiza en las raíces.

Figura I- 28. BCF de *Brassica napus* determinado para el Cd. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 29. BCF de *Brassica napus* determinado para el V. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 30. BCF de *Brassica napus* determinado para el Cr. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 31. BCF de *Brassica napus* determinado para el Co. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

En el Fe, el BCF-1 no presenta diferencias estadísticamente significativas y los valores son bajos, en cuanto al BCF-2 únicamente la adición de BEC600 en los dos suelos permite la mejora de la extracción del metal por parte de *Brassica napus* (Figura I- 32). Para el Ni (Figura I- 33) no se reportan valores altos en ninguno de los casos ($BCF < 1$).

Figura I- 32. BCF de *Brassica napus* determinado para el Fe. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p = 0.05$).

Figura I- 33. BCF de *Brassica napus* determinado para el Ni. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p = 0.05$).

El comportamiento de la planta ante la acumulación de Cu es favorable, incluso es el único metal en el cual BCF es mayor a 1 en las hojas y tallos en el caso de GAM, sin embargo, la adición de enmiendas no parece favorecer el comportamiento pues los valores disminuyen en los suelos enmendados. Las raíces por su parte, se ven beneficiadas por adición del EC con diferencias respecto a GAM como se puede observar en el BCF-2 de la muestra G+EC. En PORT, el BCF mantiene los mejores resultados en los suelos mezclados con BEC600 y HEC190, siendo las raíces de *Brassica napus* las que retienen el Cu (Figura I- 34).

La Figura I- 35, muestra los valores de BCF-1 y BCF-2 para el Zn. Los valores de BCF-1 son menores que 1 en todos los casos, indicando que *Brassica napus* no concentra el metal en la parte área ni en las raíces por lo menos en lo que se refiere a los tratamientos de GAM. En las mezclas de PORT, el comportamiento es diferente y la adición de BEC600 y HEC240 maximiza el potencial de acumulación de la planta y establece valores 1.16 y 1.06 respectivamente, concluyendo en la extracción del metal. En el As, el uso de biochar incrementa el BCF-2 permitiendo la remoción y almacenamiento de As en las raíces en los dos suelos. Los suelos enmendados con hidrochares parecen tener un efecto negativo en la acumulación del metal mientras que la adición del EC tiene un impacto nulo (Figura I- 36).

Figura I- 34. BCF de *Brassica napus* determinado para el Cu. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 35. BCF de *Brassica napus* para el Zn. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 36. BCF de *Brassica napus* determinado para el As. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Respecto a los cálculos de BCF obtenidos para el Al en GAM se puede apreciar que la planta no puede catalogarse como hiperacumuladora de este metal mientras que en el caso de

PORT únicamente en el suelo sin enmiendas se observa un BCF-2 mayor a 1 (Figura I- 37). Finalmente, para el Pb (Figura I- 38) los datos son bajos incluso con la adición de enmiendas (BCF-1 y 2 < 1).

Figura I- 37. BCF de *Brassica napus* determinado para el Al. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 38. BCF de *Brassica napus* determinado para el Pb. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

De acuerdo a los resultados obtenidos para los BCF de los diferentes metales se puede establecer que *Brassica napus* se considera acumuladora en escenarios específicos y dependiendo del metal al cual se hace mención. Autores como Rossi et al. (2002) determinaron el factor de concentración para el Cd, Zn y Cu y concluyeron el potencial de *Brassica napus* para acumular Zn en suelos contaminados, así como en los suelos enmendados con compost y la mezcla de suelos con compost enriquecido con Zn, los valores de BCF variaron entre 1.10 y 1.11.

Otras investigaciones (Souhila et al., 2016), también registraron el potencial de *Brassica napus* como hiperacumuladora de Zn y establecieron que las altas concentraciones de este metal no afectaron el crecimiento de la planta. A diferencia de esto, investigaciones previas llevadas a cabo para el género *Brassica*, establecieron la toxicidad del Zn en el crecimiento de tres especies, incluyendo a *B. napus* como una de ellas, dichos trabajos también relacionan la deficiencia de Fe y Mn con las presencia de Zn y como consecuencia la disminución del desarrollo vegetal (Ebbs y Kochian, 1997). Además, argumentan que la planta puede ser considerada como acumuladora intermedia con la mayor actividad de extracción en las raíces y menor en la parte aérea de la planta, es decir hojas y tallos.

Farooq et al. (2015) estudiaron los efectos del As en el desarrollo de *Brassica napus* y encontraron una reducción en el crecimiento de la planta, llevando a la disminución en la capacidad de acumulación de la planta. Al igual que Brunetti et al. (2011) quienes reportaron valores de BCF menores que 0.2 en este caso para el Pb y lo consideran como normal en el caso de suelos contaminados. Teniendo en cuenta las revisiones realizadas y los resultados obtenidos en la presente investigación se puede inferir que *Brassica napus* puede ser usada como una especie acumuladora pero su eficiencia se ve afectada por la presencia de varios metales en el suelo que actúan negativamente en su crecimiento, no obstante aún en suelos mineros esta especie puede crecer y acumular ciertos metales, recordando que inicialmente se mencionó que tanto GAM como PORT superan los límites de concentración en metales como As, Zn y Pb. Por otra parte, se puede concluir que la mayor parte de actividad de acumulación se da en las raíces siendo los valores de BCF-2 mayores en todos los casos que los BCF-1.

Los valores de TF (Tabla I- 13) de los suelos GAM concuerdan con lo encontrado en los factores de bioconcentración, pues los metales que se superan el límite para que *Brassica napus*

pueda ser considerada como hiperacumuladora ($BCF > 1$) son los que tienen los TF más altos, por ejemplo metales como Cd y Cu. En el Cd, las diferencias entre enmiendas permiten establecer que la mezcla de GAM con el HEC190 es estadísticamente igual al suelo sin enmendar y la adición de los biocharres y HEC240 arrojan menores promedios de translocación. En el V, la adición de biocharres, HEC240 y EC tienen valores de TF menores que GAM, mientras que G+HEC190 es igual que el suelo control. Si se observan los valores para el Cr, la adición de biocharres no produce ningún efecto en el TF respecto a GAM, por el contrario, las enmiendas restantes aumentan la translocación. En el Fe y Co, tanto biocharres, hidrocharres y EC mantienen porcentajes similares a aquellos del suelo control. Para el Ni, el único material que aumenta el promedio de GAM es el HEC190.

Para el Cu se puede evidenciar el potencial de *Brassica napus* de translocar dicho metal en el suelo control, siendo este porcentaje más elevado que en los suelos enmendados. Previamente se hizo mención al comportamiento del Cu, como el único metal acumulado en las hojas y tallos de la planta, si se observa la Tabla I- 13 corresponde a los mayores TF en comparación con los otros metales. Metales como V, Cr, Co y Fe poseen bajos valores de TF, al igual que se observó en los BCF.

En el caso del As se ve una clara diferencia entre el uso de enmiendas, es decir los valores de TF en los biocharres son iguales al encontrado en GAM (valores entre $1.2 \pm 0.13\%$ y $1.51 \pm 0.12\%$), mientras en los hidrocharres y el EC los datos son diferentes, donde el rango es de $46.41 \pm 0.58\%$ a $56.01 \pm 2.16\%$, permitiendo inferir que estas enmiendas facilitan el paso del metal de las raíces a la parte aérea de la planta, observándolo también en el BCF-1 calculado en los suelos enmendados con HEC190, HEC240 y EC, que aunque no llegan a superar el 0.4 son más altos que los biocharres y el suelo sin enmiendas (Figura I- 36).

El Al y Pb se mantienen en las raíces de las plantas resultando en bajos porcentajes de translocación y por supuesto altos BCF-2 en comparación con los BCF-1. Por último en el Zn el TF de *Brassica napus* en los suelos enmendados con los biocharres disminuyen respecto GAM, mientras que con el HEC240 y EC no hay diferencias estadísticamente significativas y el HEC190 aumenta la translocación del metal, exactamente lo que sucede con el BCF siendo este mayor que el BCF-2 (raíces) en los biocharres y menor en los hidrocharres y EC (Figura I- 35).

Tabla I- 13. TF de *Brassica napus* (%) para los tratamientos de GAM.

	GAM	G+BEC450	G+BEC600	G+HEC190	G+HEC240	G+EC
Cd	57.05 ± 3.83d	38.26 ± 1.42b	26.14 ± 1.23a	56.52 ± 0.23c,d	37.31 ± 1.44b	50.99 ± 4.34c
V	2.29 ± 0.27b	1.88 ± 0.2a	1.84 ± 0.09a	2.26 ± 0.11b	1.66 ± 0.1a	1.78 ± 0.12a
Cr	14.42 ± 1.16a	13.77 ± 0.92a	18.64 ± 1.19a,b	40.7 ± 1.16d	28.97 ± 1.72c	22.1 ± 3.77b
Fe	0.89 ± 0.04b,c	0.87 ± 0.04b	0.7 ± 0.12a,b	1.12 ± 0.15c	0.72 ± 0.1a,b	0.62 ± 0.08a
Co	4.26 ± 2.32a	2.88 ± 0.55a	5.29 ± 3.45a	6.24 ± 0.7a	3.97 ± 0.88a	2.6 ± 0.02a
Ni	26.16 ± 1.9c	22.22 ± 1.31b	18.05 ± 0.17a	29.32 ± 1.82d	22.66 ± 0.46b	22.5 ± 0.31b
Cu	93.92 ± 7.23b	72.97 ± 12.24a	68.42 ± 2.4a	69.42 ± 11.12a	101.48 ± 1.81b	62.02 ± 8.07a
Zn	9.6 ± 0.65b	6.82 ± 0.26a	6.67 ± 0.4a	12.2 ± 0.4c	9.56 ± 0.02b	10.16 ± 0.7b
As	1.32 ± 0.03a	1.51 ± 0.12a	1.2 ± 0.13a	56.01 ± 2.16d	46.41 ± 0.58b	49.44 ± 1.14c
Al	1.83 ± 0.08a	2.07 ± 0.02a	5.87 ± 0.85b	9.07 ± 0.04d	8.28 ± 0.19c	7.61 ± 0.15c
Pb	1.44 ± 0.38b	1.23 ± 0.12a,b	1.47 ± 0.11b	1.32 ± 0.13a,b	1.32 ± 0.21a,b	0.98 ± 0a

El TF en los tratamientos de PORT (Tabla I- 14) varían en cada metal, en el caso del Cd no se muestran diferencias estadísticas entre el suelo sin enmendar y los suelos enmendados pero en el caso de la adición de hidrochares permiten que *Brassica napus* transfiera dicho metal de las raíces a los tallos y hojas en mayor proporción, no obstante los valores son altos en todos los tratamientos. En el V la muestra P+BEC600 tiene un menor TF que el calculado en PORT, sin embargo, con las otras enmiendas es igual o mayor. En el Cr no hay diferencias entre el suelo control y la adición de biochares, por el contrario, la mezcla del suelo con hidrochares y EC aumentan dicha variable. En el Fe los porcentajes son menores al 1%, y no hay diferencias significativas entre PORT y PORT enmendado, exceptuando el caso de P+BEC600 (Figura I- 32).

Tabla I- 14. TF de *Brassica napus* (%) para los tratamientos de PORT.

	PORT	P+BEC450	P+BEC600	P+HEC190	P+HEC240	P+EC
Cd	55.42 ± 3.12a	60.78 ± 3.48a,b	59.27 ± 0.44a	70.26 ± 1.84b,c	71.35 ± 8.45c	52.81 ± 0.71a
V	1.97 ± 0.11b	2.32 ± 0.04d	1.54 ± 0.03a	2.03 ± 0.07b,c	2.24 ± 0.18c,d	1.81 ± 0.09b
Cr	16.33 ± 1.81a	16.61 ± 4.38a	13.26 ± 0.05a	25.04 ± 3.9b	42.12 ± 2.77c	27.63 ± 4.44b
Fe	0.79 ± 0.05b	0.89 ± 0.05b	0.43 ± 0.06a	0.89 ± 0.06b	0.89 ± 0.06b	0.72 ± 0.24b
Co	18.27 ± 0.12c	6.53 ± 0.38b	4.35 ± 1.62a	5.96 ± 0.09a,b	5.23 ± 0.17a,b	4.92 ± 0.37a,b
Ni	17.65 ± 0.15a,b	24.5 ± 2.17c,d	15.87 ± 0.66a	24.94 ± 4.02c,d	29.53 ± 2d	22.68 ± 2.1b,c
Cu	60.58 ± 0.37b,c	37.49 ± 0.44a	42.06 ± 4.83a	52.81 ± 14.51a,b	76.24 ± 10.77c	54.35 ± 2.57a,b
Zn	10.8 ± 0.7b	9.51 ± 0.94a,b	7.12 ± 0.31a	18.54 ± 2.71c	17.37 ± 0.32c	15.82 ± 0.84c
As	0.91 ± 0.07a	1.37 ± 0.23b	0.69 ± 0.07a	1.49 ± 0.23b	5.06 ± 0.15c	0.74 ± 0.2a
Al	1.81 ± 0.32b	1.49 ± 0.31a,b	1.51 ± 0.26a,b	1.7 ± 0.19b	1.74 ± 0.26b	1.05 ± 0.15a
Pb	1.35 ± 0.07b	1.18 ± 0.15a,b	1.1 ± 0.19a,b	1.11 ± 0.06a,b	1.22 ± 0.22a,b	0.91 ± 0.11a

La adición de enmiendas para el Co no parece favorecer la translocación del metal por parte de *Brassica napus*, siendo menor en todos los suelos enmendados respecto a PORT y en el Ni el único material que no produce diferencias estadísticamente significativas es BEC600. El Cu al igual que el Cd son los metales con los TF más altos, incluso para el Cu en la muestra PORT+HEC240 presenta el mayor porcentaje de translocación de 76.24 ± 10.77 . Los hidrochares y el EC permiten aumentar el paso del Zn de las raíces a la parte aérea de la planta, mientras que en el As es únicamente la adición de HEC240 al suelo que permite observar una diferencia aunque los valores en los dos metales previamente mencionados son bajos (Tabla I- 14). En el Al no existen diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos y ninguno de los porcentajes promedio supera el 1.81%. En el Pb el escenario es similar los biochares e hidrochares no varían con el suelo control y el EC arroja un promedio menor.

Diwan et al. (2010) aseguran que se necesitan altos porcentajes de TF para que una especie sea considerada como hiperacumuladora, teniendo en cuenta esta aseveración y analizando los datos se destacan que los metales en los cuales esta variable es mayor al 50% son el Cu para los tratamientos de GAM, el Cd en algunos suelos enmendados de PORT y el Cu específicamente en la muestra P+EC.

3.5.2. Porcentajes de extracción de metales de *Brassica napus*

La Figura I- 39 contiene los porcentajes de extracción calculados en las hojas y tallos de *Brassica napus* en los tratamientos de Gamonedo. Los valores de extracción se realizaron comparando los valores de suelos enmendados con el suelo sin enmendar. Para el total de los metales se puede evidenciar la extracción es baja en las hojas y tallos de *Brassica napus* en los tratamientos de Gamonedo, exceptuando el caso del As. Los suelos enmendados con el EC y los hidrochares son los que tienen los mayores porcentajes de extracción de As.

La Figura I- 40 muestra los porcentajes de extracción en los tratamientos Portmán y se establece nuevamente los valores más altos para el As mientras que en los otros metales son bajos e incluso menores que el suelo testigo. Es la muestra PORT+HEC240 que posee el mejor porcentaje. Con estos resultados se establece que la combinación de enmiendas y fitoextracción no favorece la acumulación de los metales en la parte aérea de la planta.

Figura I- 39. Valores porcentaje de extracción de metales en hojas y tallos de *Brassica napus* en los tratamientos de Gamoneda.

Figura I- 40. Valores porcentaje de extracción de metales en hojas y tallos de *Brassica napus* en los tratamientos de Portmán.

La Figura I- 41 establece los porcentajes de extracción de metales por parte de las raíces de *Brassica napus* para los suelos enmendados de Gamonedo. A nivel general, todos los metales se acumulan en las raíces en los tratamientos combinados con biochares como se pueden ver en las muestras GAM+BEC450 y GAM+BEC600. Los metales con mayores porcentajes de extracción son el Cd y Cu. A la luz de resultados, las enmiendas permiten la acumulación de los metales en las raíces de la planta pero no hay una translocación a las hojas y tallos.

La Figura I- 42 contiene los valores de extracción en porcentaje de los metales acumulados en las raíces de la colza para los suelos de Portmán. En este caso los metales como el Pb, Al y Cr no se acumularon en las raíces de la planta en lo que se refiere a los suelos enmendados. No obstante, el Cu se acumula en todos los tratamientos sugiriendo que, las enmiendas potencializan la extracción del metal por parte de *Brassica napus*. En general la muestra PORT+BEC600 obtiene los mejores resultados en la mayoría de metales. **Figura I- 41.** Valores porcentaje de extracción de metales en las raíces de *Brassica napus* en los tratamientos de Gamonedo.

Figura I- 41. Valores porcentaje de extracción de metales en las raíces de *Brassica napus* en los tratamientos de Gamonedo.

Figura I- 42. Valores porcentaje de extracción de metales en las raíces de *Brassica napus* en los tratamientos de Portmán.

3.6. Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de *Sinapis alba* en el pH, CE y las propiedades biológicas de los suelos

Los valores de pH posterior al tiempo del crecimiento de *Sinapis alba* permiten evidenciar diferencias entre los suelos de GAM enmendados con biochar, donde existe un aumento de dicha variable, en comparación con la adición de hidrochar y EC. El efecto en el pH del suelo es nulo o en ciertos escenarios como GAM+HEC240 y GAM+EC con el crecimiento de *Sinapis alba*, puede llegar a mayores valores pero no en el mismo rango que los biochar (Figura I- 43a). En PORT, se observa una variación en el suelo control con y sin planta pues en el suelo con *Sinapis alba* el pH es mayor incluso que en los suelos enmendados con hidrochar y EC, los biochar siguen siendo los de mejores resultados debido a su efecto encalante y este beneficio se ve incrementado con el crecimiento de la mostaza (Figura I- 43b). La CE posee el mismo comportamiento referente a los biochar aumentando tras la adición de dichas enmiendas en los dos suelos mientras en los hidrochar y el EC aumenta pero en menor grado (Figura I- 44 a y b).

Figura I- 43. pH de los suelos control y con *Sinapis alba*: a. GAM y b. PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p = 0.05$).

Figura I- 44. CE (dS m^{-1}) de los suelos control y con *Sinapis alba*: a. GAM y b. PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p = 0.05$).

Las variaciones en el pH de los suelos posterior al tiempo de experimento no se ven influenciadas por la presencia de *Sinapis alba*, en este caso el factor determinante es la adición de la enmienda. Es evidente el descenso de los pH al agregarse los hidrochares, lo cual concuerda con la naturaleza de dicho material, como ya ha sido reportado por otras investigaciones (Zhu et al., 2015), de igual forma el EC disminuye el pH del suelo en comparación con los biochares y según Zebarth et al. (2011) tiene que ver con el pH inicial de la enmienda agregada, no obstante en el presente estudio no existen variaciones entre el pH de los suelos sin enmendar y los suelos enmendados con el EC, mientras la adición de biochares tiene un claro efecto encalante (Major et al., 2010). En cuanto a la CE dicha propiedad aumenta con el uso de enmiendas si se compara con los suelos sin enmendar, lo que corrobora el beneficio en esta propiedad (Ahmad et al., 2017; Chan et al., 2008). Según los valores de correlación de Pearson para el pH y la CE, en los suelos de GAM las dos variables están positivamente correlacionadas con coeficientes de 0.81 y 0.93 para los suelos GAM control y los GAM+ *Sinapis alba* respectivamente ($R^2=0.66$ y 0.87). En PORT, las correlaciones son bajas con coeficientes de 0.59 y 0.73 ($R^2=0.34$ y 0.53).

La actividad enzimática de la fosfomonoesterasa es más alta en los suelos enmendados con los hidrochares en GAM, sin embargo, si se comparan los suelos con y sin planta en estos tratamientos (Suelo+ hidrochares), la presencia de *Sinapis alba* genera menos valores de la enzima, pero manteniéndose mayores que el suelo control sin enmiendas. Las mezclas con los hidrochares no poseen diferencias estadísticamente significativas con GAM y GAM+ *Sinapis alba* (Figura I- 45a). Los biochares adicionados en el suelo de PORT establecen cantidades de fosfomonoesterasa más bajos que PORT sin enmiendas, para los escenarios con *Sinapis alba* y en ausencia de esta, mientras que el EC posee los mejores promedios seguido de los hidrochares (Figura I- 45b).

La β -glucosidasa presenta baja actividad en GAM+BEC450 y GAM+BEC600 en comparación con GAM y las mezclas de GAM con hidrochares y EC, con y sin crecimiento de mostaza (Figura I- 46a). En PORT la actividad de la enzima varía entre PORT y PORT+ *Sinapis alba*, siendo mayor con la presencia de la planta, si se relacionan las concentraciones entre GAM y PORT+ biochares no hay diferencias estadísticas entre los mismos, pero si la comparación se realiza con PORT+ *Sinapis alba*, la adición de BEC450 y BEC600 disminuye la β -glucosidasa. Los hidrochares en los suelos enmendados control poseen promedios de actividad mayores que los

mismos suelos con la planta, lo mismo sucede con el EC, no obstante se observa el beneficio de estas enmiendas en la actividad enzimática de la β -glucosidasa (Figura I- 46b).

En la deshidrogenasa, para los dos suelos, no se observan diferencias entre los suelos controles sin enmiendas, en comparación con los suelos enmendados con los dos biocharres, con y sin crecimiento de *Sinapis alba*. A diferencia de esto, los hidrocharres y EC tienen efectos positivos en los valores de deshidrogenasa, siendo el beneficio de la adición de hidrocharres más evidente que el EC (Figura I- 47a y b). El índice GMea, que contempla los valores de todas las actividades, muestra la tendencia previamente mencionada, por lo menos en GAM se puede observar claramente como los suelos sin enmendar con o sin crecimiento de mostaza no difieren entre sí, pero son más altos que los suelos enmendados con los biocharres. El mayor valor se determinó en la muestra GAM+HEC240 control (ausencia de planta), seguido de GAM+HEC190 control, luego los suelos GAM+ hidrocharres + *Sinapis alba* y por último la mezcla de suelo con EC con variaciones insignificantes entre la presencia o ausencia de la mostaza (Figura I- 48a). En PORT se da la disminución del GMea con los biocharres y la adición de hidrocharres y EC mejora el índice sin diferencias en la mayoría de casos entre los tratamientos con o sin *Sinapis alba* (Figura I- 48b).

En general se puede inferir que las actividades enzimáticas de los suelos se ven beneficiadas por la adición de enmiendas y que la presencia de *Sinapis alba* tiende a reducir o tener efectos nulos en las enzimas, lo cual se asemeja a lo descrito previamente para la especie *Brassica napus*. En este sentido, es la mezcla de los suelos con los hidrocharres registran los mayores valores, lo cual está relacionado con el aumento de la microbiota del suelo y por ende la necesidad de sustrato para subsistir, siendo las enzimas el sustrato (Bamminger et al., 2014).

Además de considerar el aumento de la biomasa microbiana, también según Fang et al. (2018) se debe contemplar las características de los biocharres, hidrocharres y residuos ganaderos; dichos autores sustentan que la degradabilidad de los hidrocharres influencia el incremento de las propiedades biológicas del suelo. Es importante tener en cuenta que la determinación de las actividades de la fosfomonoesterasa, β -glucosidasa y deshidrogenasa son más sensibles a las alteraciones en el suelo que las propiedades físicas y químicas, adicionalmente permiten establecer la influencia de las enmiendas orgánicas en el ciclo de nutrientes y el crecimiento de especies vegetales (Paz-Ferreiro et al., 2012), por lo cual los resultados obtenidos permiten dar una idea de los beneficios del uso de materiales como los hidrocharres y los residuos animales.

Figura I- 45. Fosfomonoesterasa para *Sinapis alba*: a. GAM y b. PORT. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

Figura I- 46. β -glucosidasa para *Sinapis alba*: a. GAM y b. PORT. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

Figura I- 47. Deshidrogenasa para *Sinapis alba*: a. GAM y b. PORT. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

Figura I- 48. Índice GMea para *Sinapis alba*: a. GAM y b. PORT. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

En cuanto a la biomasa microbiana todas las enmiendas aumentan el carbón asociado a los microorganismos, exceptuando el caso de la muestra GAM+BEC450+ *Sinapis alba*. No obstante, entre los suelos enmendados no existen diferencias estadísticamente significativas con o sin mostaza, el único tratamiento que presenta una biomasa diferencialmente alta es GAM+HEC190 con la planta (Figura I- 49). Si se compara los valores obtenidos para esta variable con los del otro suelo (PORT) se evidencia mayor actividad microbiana en GAM. Las variaciones en PORT entre el suelo sin enmendar y los suelos con adición de los materiales orgánicos no son significativas en la mayoría de tratamientos. Las muestras que muestran una biomasa microbiana mayor son: PORT+HEC190+ *Sinapis alba*, PORT+HEC240 control y PORT+EC control, siendo este último el más alto (Figura I- 50). Los resultados la biomasa microbiana para el presente estudio permiten mantener la hipótesis de la mejora en la calidad del suelo tras la adición de los hidrochares (Bamminger et al., 2014), relacionado a su vez con la calidad del suelo, adicionalmente la mezcla de suelos con el EC en PORT corrobora el beneficio de los residuos de animales en las propiedades biológicas de los suelos, ya reportado en otras investigaciones (Malik et al., 2013).

Figura I- 49. Biomasa microbiana (C- biomasa) de *Sinapis alba* en GAM. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 50. Biomasa microbiana (C- biomasa) de *Sinapis alba* en PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

3.7. Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de *Sinapis alba* en el contenido de metales en los suelos y fósforo total.

La concentración de los metales totales presenta un comportamiento diferente para cada metal, sin embargo a nivel general se puede observar la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos cuando se habla de metales como Cd (Figura I- 51a y b), Ni (Figura I- 51k y l) y Pb (Figura I- 51t y u), en los cuales los valores promedio de concentración en suelos son iguales en los controles y los suelos con crecimiento de *Sinapis alba* para GAM y PORT. Otros metales como el V y el Co presentan la misma tendencia únicamente en los tratamientos de GAM como se presenta en las figuras 56c y 56i respectivamente. A diferencia de esto, en el Fe (Figura I- 51g y h), Zn (Figura I- 51ñ y o), As (Figura I- 51p y q) y Al (Figura I- 51r y s) las concentraciones disminuyen entre los suelos sin emendar y los suelos con enmiendas, pero no se establecen variaciones entre las mismas o con la presencia o ausencia de la planta, estableciéndose el mismo comportamiento tanto en GAM como en PORT.

Figura I- 51. Metales totales en los suelos control y con *Sinapis alba*. a. Cd en GAM, b. Cd en PORT, c. V en GAM, d. V en PORT, e. Cr en GAM, f. Cr en PORT, g. Fe en GAM, h. Fe en PORT, i. Co en GAM, j. Co en PORT, k. Ni en GAM, l. Ni en PORT, m. Cu en GAM, n. Cu en PORT, ñ. Zn en GAM, o. Zn en PORT, p. As en GAM, q. As en PORT, r. Al en GAM, s. Al en PORT, t. Pb en GAM, u. Pb en PORT, v. P en GAM, w. P en PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas Duncan ($p= 0.05$)

En PORT, el V (Figura I- 51d) y Co (Figura I- 51j) también disminuyen sus concentraciones al adicionar los biochares hidrochares y EC, no obstante no hay diferencias entre las muestras con las diferentes enmiendas. En el Cr para GAM y PORT, de igual forma se observa una reducción en los suelos enmendados pero en este caso si hay variaciones, siendo los biochares e hidrochares los tratamientos con menores concentraciones comparados con el EC, es decir los materiales tratados térmicamente son más eficientes en la inmovilización de este metal, la presencia de *Sinapis alba* no parece tener un efecto claro (Figura I- 51e y f). En el Cu, la tendencia se invierte pues la adición de enmiendas aporta mayor concentración del metal en comparación a GAM y PORT (Figura I- 51m y n). Por último, se observa el claro aporte de P total posterior a la adición de las enmiendas resultando en mayores valores para los biochares y el HEC190 que en el HEC240 y EC en los dos suelos (Figura I- 51v y w).

3.8. Capacidad de fitoextracción de *Sinapis alba*

3.8.1. Producción de biomasa vegetal de *Sinapis alba*

El total de biomasa producida por *Sinapis alba* es mayor en las muestras GAM+BEC600 y GAM+EC, teniendo estos tratamientos la misma cantidad de raíces, pero en el caso de hojas y tallos es estadísticamente diferente para GAM+EC. El BEC450 y los hidrochares no tienen variaciones significativas con respecto a la biomasa total generada en el suelo sin enmendar y a nivel general son las raíces las que presentan los mayores valores promedio (Figura I- 52). En las hojas se presenta la secuencia: $GAM \leq GAM+BEC450 = GAM+HEC190 = GAM+HEC240 \leq GAM+BEC600 < GAM+EC$ y en los tallos la biomasa incrementa con la adición de BEC600 y EC. El comportamiento en los tratamientos de PORT se distingue por el aumento de la biomasa vegetal total de *Sinapis alba* en la muestra PORT+EC, mientras en los biochares y HEC190 la biomasa total es mayor que el suelo control y menor que con EC, pero no presenta diferencias entre ellas. En el caso específico de la biomasa obtenida en las hojas la adición de enmiendas potencializa la producción siendo mayor que lo conseguido en suelo control y alcanzando la siguiente secuencia: $PORT < PORT+HEC240 > PORT+BEC450 = PORT+BEC600 = PORT+HEC190 < PORT+EC$. En los tallos no existen diferencias estadísticamente significativas entre las enmiendas, exceptuando el caso del EC como se mencionó anteriormente. Por último, en las raíces se puede evidenciar los beneficios de los biochares, el HEC190 y EC para el desarrollo

de las mismas (Figura I- 53). En este sentido Zemanová et al. (2017) también registran aumento en los rendimientos de producción de biomasa de *Sinapis alba* posterior a la adición de biochar pero sin ser estadísticamente significativo.

Figura I- 52. Biomasa vegetal de *Sinapis alba* en GAM. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 53. Biomasa vegetal de *Sinapis alba* en PORT. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

3.8.2. Factor de bioconcentración (BCF) y translocación (TF) de *Sinapis alba*

Los BCF calculados para *Sinapis alba*, muestran a nivel general que los valores de BCF-1, correspondientes a la acumulación de metales en los hojas y tallos, es menor que los BCF-2. No obstante cada metal presenta su propio comportamiento. En el Cd los promedios de BCF-2 son mayores a 1, permitiendo considerar a *Sinapis alba* como una especie acumuladora en todos los tratamientos de GAM incluso el suelo control mientras que el BCF-1 para GAM y suelos enmendados no supero el 0.5. En PORT, el Cd la actividad de la planta se potencializa siendo los BCF -1 y BCF-2 > 1, exceptuando el caso de P+EC en el BCF-1. Las enmiendas con los mejores resultados son BEC450 y HEC190 si se enfoca en los BCF-2 (Figura I- 54). En el V (Figura I- 55), para los dos suelos en el BCF-1 son casi nulos y no hay diferencias entre el uso de enmiendas. Los datos calculados para el BCF-2 aunque son más altos que los de BCF-1 no superan el 1, presentándose el mismo comportamiento descrito en el Cr (Figura I- 56), Co (Figura I- 57) y Ni (Figura I- 58).

Figura I- 54. BCF de *Sinapis alba* determinado para el Cd. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 55. BCF de *Sinapis alba* determinado para el V. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 56. BCF de *Sinapis alba* determinado para el Cr. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 57. BCF de *Sinapis alba* determinado para el Co. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 58. BCF de *Sinapis alba* determinado para el Ni. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

La acumulación del Fe (Figura I- 59) en las hojas y tallos es bajo y no existen variaciones en los suelos GAM enmendados y el BCF-2 para dichos tratamientos aumenta pero no sobrepasa el límite esperado ($BCF > 1$). En PORT, el único por encima de 1 se evidencia en la muestra

P+BEC450. Los valores de BCF-1 para el Cu en GAM se aproximan a 0.6, a diferencia de esto los BCF-2 son mayores (BCF-2 >1) en todos los tratamientos, siendo las adiciones de BEC600 y HEC240 las de mejores promedios de acumulación. Al igual que GAM en PORT, la muestra P+BEC600 incrementa el BCF-2 pero los BCF-1 son menores a 0.4 (Figura I- 60).

Figura I- 59. BCF de *Sinapis alba* determinado para el Fe. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 60. BCF de *Sinapis alba* determinado para el Cu. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

En GAM para el Zn, la muestra G+BEC450 presenta diferencias estadísticamente significativas respecto al control y los suelos mezclados con las otras enmiendas, siendo solo en este caso *Sinapis alba* potencialmente acumuladora de dicho metal, por el contrario en PORT todos los suelos enmendados son mayores a 1, aunque no hay variaciones entre usar una enmienda u otra (Figura I- 61). En los valores promedio de BCF-2 para el As cabe resaltar que las adiciones de los biocharres permiten que la planta actúe extrayendo el metal y la mezcla con los hidrocharres y el EC reduce este potencial en comparación con GAM. En PORT existen diferencias entre el control y los biocharres y el control, siendo mayor en los suelos enmendados con dichos materiales, pero es el HEC190 el que reporta el dato más alto en el BCF-2. Los BCF-1 de As calculados para los dos suelos se mantienen uniformes y bajos (Figura I- 62).

La acumulación de Al, indicada en el BCF-1 es menor a 0.2 en los suelos enmendados y los dos suelos controles y la extracción en las raíces en lo que se refiere a los tratamientos GAM es baja ($BCF-2 < 1$). Sin embargo en PORT los hidrocharres promueven la fitoextracción por parte de *Sinapis alba* arrojando valores aproximados a 1.2 (Figura I- 63). Finalizando con el Pb, en el cual se establece que las hojas y tallos no acumulan el metal en ninguno de los suelos, ni en el raíces de los suelos GAM, la única diferencia se hace evidente en la muestra P+HEC190 como el dato más alto registrado (Figura I- 64).

Figura I- 61. BCF de *Sinapis alba* determinado para el Zn. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 62. BCF de *Sinapis alba* determinado para el As. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 63. BCF de *Sinapis alba* determinado para el Al. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura I- 64. BCF de *Sinapis alba* determinado para el Pb. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

El TF en el Cd para *Sinapis alba* son menores en los suelos enmendados que en GAM, estableciendo que la planta se ve afectada por la adición de estos materiales. En el V, Fe, Co, As, Al y Pb, los porcentajes son bajos y en ninguno de los casos supera el 10%. En el Cr el mayor valor se registra en la muestra G+BEC600, al igual que sucede con el Ni. El Cu posee datos altos de translocación tanto en el suelo control como en los enmendados. En el Zn la mezcla con los biocharres, hidrocharres y EC no parecen favorecer la translocación (Tabla I- 15).

Tabla I- 15. TF de *Sinapis alba* (%) para los tratamientos de GAM.

	GAM	G+BEC450	G+BEC600	G+HEC190	G+HEC240	G+EC
Cd	49.99 ± 2.52c	21.94 ± 0.84a	22.03 ± 1.12a	24.49 ± 0.33a	27.85 ± 2.24b	22.38 ± 0.08a
V	2.84 ± 0.31a,b	2.91 ± 2.24a,b	3.96 ± 0.6	2.3 ± 0.97a,b	1.36 ± 0.38a	1.05 ± 0.18a
Cr	11.04 ± 0.46a	10.01 ± 2.93a	20.29 ± 3.51c	12.41 ± 0.85a,b	17.09 ± 0.67b,c	10.75 ± 0.02a
Fe	2.24 ± 1b	2 ± 0a,b	2.46 ± 0.64b	1.4 ± 0.4a,b	0.42 ± 0.03a	0.36 ± 0.02a
Co	3.3 ± 0.15b	2.49 ± 1.37a,b	4.33 ± 0.21b	3.62 ± 0.73b	3.33 ± 1.16b	0.99 ± 0.19a
Ni	10.72 ± 1.26b,c	7.48 ± 1.94a	12.23 ± 1.44c	8.83 ± 0.88a,b	7.14 ± 1.18a	8.04 ± 1.11a,b
Cu	59.2 ± 9.61c	58 ± 11.22c	34.51 ± 0.72a	40.41 ± 1.66a,b	50.89 ± 0b,c	51.92 ± 2.02b,c
Zn	16.19 ± 0.83e	6.41 ± 1.24a	7.92 ± 0.49b	10.22 ± 0.87c	13.01 ± 0.54d	8.9 ± 0.09b,c
As	2.64 ± 1.31a,b	5.07 ± 0.94b	3.13 ± 0.16a,b	1.37 ± 0.19a	3.03 ± 2.2a,b	2.2 ± 0.53a,b
Al	2.02 ± 0.46a	3.97 ± 2.85a	3.53 ± 0.57a	1.64 ± 0.63a	1.92 ± 1.94a	0.56 ± 0.12a
Pb	2.73 ± 0.63b	5.36 ± 0c	3.25 ± 0.42b	2.64 ± 0.49b	0.67 ± 0.41a	0.42 ± 0.22a

Los mayores porcentajes de TF se calcularon en el Cd y el Cu para los suelos de PORT, mientras que metales como el V, Fe, Co, As, Al y Pb poseen las menores proporciones, tal como se mencionó para el suelo GAM. En el Cd la combinación con los biochares, el HEC190 y el EC resultan en menor actividad de translocación por parte *Sinapis alba*. En el Ni la adición de enmiendas representa una menor translocación comparado con el promedio encontrado en PORT. Mientras que en el Cu el porcentaje de la muestra P+HEC240 es el más alto con $45.96 \pm 3.52\%$. Para el caso del Zn, a excepción del HEC240, todos los materiales reducen los TF si se comparan con el suelo sin enmendar (Tabla I- 16).

Si se cotejan los valores de TF para el Cd con los BCF-1y BCF-2 (Figura I- 54) obtenidos en PORT, los resultados se acoplan pues los mayores porcentajes de translocación están asociados al incremento del BCF-1 (hojas y tallos) respecto a otros metales, en donde los valores para esta variable son bajos, incluso menores a 0.2. Por supuesto los bajos porcentajes de translocación, indican que los metales que acumula *Sinapis alba* se almacenan en las raíces y por ende a nivel general todos los datos de BCF-2 son mayores.

En conclusión, la capacidad de fitoextracción de *Sinapis alba* varía en cuanto al metal, siendo específicos los escenarios donde la planta supera el límite para considerarse como hiperacumuladora. Por otra parte, como se ha mencionado previamente los altos porcentajes de translocación permiten la denominación de la especie como fitoextractora de Cd.

Tabla I- 16. TF de *Sinapis alba* (%) para los tratamientos de PORT.

	PORT	P+BEC450	P+BEC600	P+HEC190	P+HEC240	P+EC
Cd	$84.48 \pm 0.95d$	$63.92 \pm 1.12b,c$	$72.83 \pm 8.92c$	$54.52 \pm 1.96a,b$	$89.06 \pm 2.71d$	$51.92 \pm 2.01a$
V	$3.14 \pm 0.23b$	$2.38 \pm 0.17b$	$1.33 \pm 0.06a$	$1.26 \pm 0.68a$	$3.11 \pm 0.3b$	$1.12 \pm 0.52a$
Cr	$14.02 \pm 1.75b,c$	$15.01 \pm 2.66b,c$	$11.15 \pm 0.03a,b$	$9.64 \pm 0.18a$	$12.79 \pm 1.25a,b,c$	$15.61 \pm 2.74c$
Fe	$1.46 \pm 0.11a,b$	$1.42 \pm 0.23a,b$	$0.56 \pm 0.01a$	$2.01 \pm 1.2b$	$1.49 \pm 0.57a,b$	$0.62 \pm 0.33a$
Co	$2.8 \pm 0.71a,b$	$3.79 \pm 0.28b,c$	$1.63 \pm 0.55a$	$6.32 \pm 1.21c,d$	$5.53 \pm 0.34d$	$1.9 \pm 1.24a$
Ni	$9.37 \pm 1.07b$	$6.8 \pm 0.66a$	$6.07 \pm 0.21a$	$5.67 \pm 1.18a$	$7.31 \pm 0.68a$	$6.96 \pm 0.21a$
Cu	$36.52 \pm 1.06a$	$33.9 \pm 1.67a$	$32.09 \pm 5.02a$	$36.99 \pm 0.95a$	$45.96 \pm 3.52b$	$34.02 \pm 3.78a$
Zn	$21.63 \pm 0.66d$	$11.94 \pm 0.5a,b$	$10.28 \pm 0.55a$	$17.35 \pm 0.44c$	$28.86 \pm 0.49e$	$13.09 \pm 1.75b$
As	$2.06 \pm 0.48b,c$	$3.63 \pm 0.05d$	$1.5 \pm 0.35a,b$	$1.78 \pm 0.52b,c$	$2.46 \pm 0.41c$	$0.85 \pm 0.11a$
Al	$2.44 \pm 0.16a$	$2.34 \pm 0.08a$	$0.86 \pm 0.11a$	$1.79 \pm 0.74a$	$2.31 \pm 0.03a$	$1.66 \pm 1.57a$
Pb	$1.85 \pm 0.14c$	$2.24 \pm 0.14c$	$0.52 \pm 0.1a$	$1.56 \pm 0.72b,c$	$2.34 \pm 0.06c$	$0.92 \pm 0.15a,b$

3.8.3. Porcentajes de extracción de metales de *Sinapis alba*

La Figura I- 65 muestra los porcentajes de extracción de las hojas y tallos de *Sinapis alba* para los once metales analizados en los suelos de Gamonedo. El Pb, Al, As, Ni, Co, Fe, Cr y V, se acumulan en la parte área de la planta en el tratamiento de GAM+BEC450 mientras que en el resto de suelos enmendados no hay extracción de metales totales. En los metales como el Zn, Cu y Cd los suelos enmendados tienen menores porcentajes de extracción que el suelo sin enmendar.

La Figura I- 66 contiene los porcentajes de extracción de las hojas y tallos de *Sinapis alba* en los suelos de Portmán. Todos los metales tienen altos valores de acumulación cuando se trata de la muestra PORT+BEC600, exceptuando el caso del Zn, Cu y Cd. En los dos suelos son los biochares los que permiten altos niveles de extracción respecto a los suelos control. Mediante estas gráficas se puede evidenciar que los metales varían su comportamiento según la enmienda adicionada al suelo y sugieren que para *Sinapis alba* los biochares permiten que extraer los metales y transportarlos a la parte superior de la planta.

Figura I- 65. Valores porcentaje de extracción de metales en hojas y tallos de *Sinapis alba* en los tratamientos de Gamonedo.

Figura I- 66. Valores porcentaje de extracción de metales en hojas y tallos de *Sinapis alba* en los tratamientos de Portmán.

La Figura I- 67 establece los porcentajes de extracción calculados para las raíces de *Sinapis alba* en los suelos enmendados de Gamonedo. Los metales en ésta gráfica tienen porcentajes de extracción negativos, indicando menores concentraciones acumuladas en comparación al suelo sin enmendar. La excepción a este comportamiento, se observa en el Cu. La extracción del Cu se da por las raíces de *Sinapis alba* con todos suelos enmendados. En la muestra GAM+BEC450, existen porcentajes de extracción positivos pero bajos en el Zn, Ni, Fe y Cd.

La Figura I- 68 contiene la extracción de metales por parte de las raíces de *Sinapis alba* en los suelos de Portmán. A nivel general todos los metales tienen porcentajes positivos en los suelos enmendados, especialmente el Cu y Ni. No obstante se puede observar que la mayoría de metales en el tratamiento PORT+EC tienen porcentajes negativos indicando menores concentraciones de metal acumulado en las raíces de los suelos enmendados que el suelo control. Nuevamente el Cu parece acumularse con todas las enmiendas. Existen caso puntuales como el Al, en el cual las enmiendas no parecen favorecer la extracción, excepto PORT+HEC240.

Figura I- 67. Valores porcentaje de extracción de raíces de *Sinapis alba* en los tratamientos de Gamonedo.

Figura I- 68. Valores porcentaje de extracción de raíces de *Sinapis alba* en los tratamientos de Portmán.

4. CONCLUSIONES

Caracterización de materiales

- El pH y la conductividad eléctrica permiten evidenciar que la pirólisis produce la separación de sales alcalinas de la materia orgánica aumentando el pH de los biocharres. En la carbonización hidrotermal las temperaturas son menores y promueven la presencia de ácidos orgánicos y sustancias fenólicas que disminuyen el pH, así como la solubilización de sales que reducen la conductividad.
- El porcentaje de carbono fácilmente oxidable establece la mayor cantidad de estructuras de carbono lábil en los hidrocharres. En los biocharres la presencia de estructuras de carbono aromáticas lo hacen un material más estable coincidiendo con el índice de termoestabilidad.
- Las cenizas en los biocharres es más alta que en los hidrocharres, se relaciona con la pirólisis pues la cenizas se quedan retenidas en la para sólida. A diferencia de esto en la carbonización hidrotermal las cenizas se disuelven en la fracción líquida.
- En el análisis elemental, el porcentaje de C es mayor en los hidrocharres que en el estiércol de conejo debido a las reacciones de deshidratación y descarboxilación durante carbonización, mientras que en los biocharres se da por la polimerización y por ende presencia de carbono estable.
- En el presente capítulo se puede observar los efectos positivos de los biocharres e hidrocharres en las emisiones de CO₂ en cortos períodos de tiempo. No obstante es evidente la necesidad de conocer el impacto de dichos materiales a largo plazo en cuanto a la estabilidad del carbono.

Efectos de la adición de enmiendas y combinación con la fitoextracción

- La adición de hidrocharres incrementa la actividad enzimática de los suelos y la biomasa microbiana. El incremento de los microorganismos implica la necesidad de mayor sustrato, sin embargo es importante reconocer que los biocharres y el estiércol de conejo también mejoran las propiedades biológicas de los suelos en menor grado. La presencia de las especies *Brassica napus* y *Sinapis alba* no parece influenciar el comportamiento de la microbiota.

- A nivel general el uso de biochar, hidrochar y estiércol de conejo reduce la concentración de metales totales en los suelos de Gamonedo y Portmán. La concentración de metales totales en los suelos con o sin planta no presenta diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los metales, al igual que no hay variaciones entre el uso de una enmienda u otra.
- La capacidad de fitoextracción de las especies utilizadas, *Brassica napus* y *Sinapis alba*, depende ampliamente del metal al que se hace referencia y de la enmienda utilizada. Estas dos especies se pueden catalogar como potencialmente hiperacumuladoras según los factores de bioconcentración y de translocación pero en escenarios específicos que se mencionan a lo largo de los resultados.

CAPÍTULO II: EFECTOS DE LA ADICIÓN DE ENMIENDAS ORGÁNICAS Y COMBINACIÓN CON LA FITOEXTRACCIÓN EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE UN SUELO MINERO Y UNA PRESA DE RESIDUOS DE FLOTACIÓN PROVENIENTES DEL ÁREA DE PORTMÁN

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

Analizar los efectos de la adición de biochar y estiércol de conejo y de su combinación con la fitoextracción (*Brassica napus* y *Sinapis alba*) en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de un suelo minero y una presa de residuos de flotación provenientes del área de Portmán (Murcia) así como en la extracción de metales en los suelos seleccionados.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar las propiedades fisicoquímicas de las enmiendas orgánicas: biochar y estiércol de conejo.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas de los dos suelos: Portmán 2 y Presa 32.
- Evaluar el efecto de la adición de enmiendas y combinación con la fitoextracción en el pH, conductividad eléctrica (CE) y propiedades biológicas de los suelos (actividades enzimáticas y biomasa microbiana).
- Evaluar el efecto de la adición de enmiendas y de su combinación con la fitoextracción en el contenido en metales de los suelos.
- Analizar la capacidad de fitoextracción (factor de bioconcentración y translocación) y producción de biomasa de *Brassica napus* y *Sinapis alba* en los suelos testigos y enmendados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección de los suelos

Los suelos seleccionados corresponden al muestreo realizado en el marco del proyecto “Tratamiento de suelos contaminados por metales mediante combinación de técnicas de fitorremediación con adición de biochar (CGL2014-58322-R)” del programa Retos 2014. De las muestras obtenidas se seleccionaron un suelo minero y una presa minera, que almacena lodos residuales del concentrado de Zn y Pb, encontrándose las dos zonas en el área de Portmán, municipio de La Unión-Cartagena, perteneciente a la comunidad autónoma de Murcia. El primero de estos, el suelo minero, se encuentra ubicado en la Latitud: $37^{\circ} 35' 22.0308''$ N y Longitud: $0^{\circ} 51' 45.4914''$ O y se reconoce en el marco del proyecto como suelo Portmán 2 (P2). El segundo, la presa minera, corresponde al Lodo 32 (L32), ubicado en la Latitud: $37^{\circ} 35' 23.0712''$ N y Longitud: $0^{\circ} 51' 38.8381''$ O e inventariado bajo el código Presa 977 II 4 32 (Figura II- 1).

Figura II- 1. Zonas de muestreo correspondientes al área de Portmán: Suelo Portmán 2 (P2) y Presa 977 II 4 32 (L32).

2.2. Selección enmiendas

El residuo utilizado corresponde al estiércol de conejo (EC) previamente descrito en el capítulo I (Sección 2.2: selección del residuo). Los biocharres se fabricaron a partir del EC, a dos temperaturas 300 °C (B300) y 600 °C (B600), las condiciones de pirólisis como la velocidad de calentamiento, tiempo de residencia y equipo de operación se mantuvieron iguales a aquellas descritas en el primer capítulo (Sección 2.4 preparación de biocharres). En total se obtuvieron cinco enmiendas, considerando la mezcla de cada uno de los biocharres con el EC, resultando en los materiales denominados como B300+EC y B600+EC. La proporción para las mezclas de biocharres con el estiércol fue de 1:1.

2.3. Selección especies para fitoextracción

Las especies seleccionadas para los ensayos de fitoextracción corresponden a la colza (*Brassica napus*) y la mostaza blanca (*Sinapis alba*). La selección de estas plantas se realizó debido a su potencial como especies acumuladoras y resistentes a la presencia de metales en los suelos según previa revisión bibliográfica (Cárdenas-Aguiar et al., 2017; Dhiman et al., 2016; Souhila et al., 2016). En los dos suelos se utilizaron las mismas especies y los mismos tratamientos.

2.4. Caracterización de materiales

La caracterización de los materiales se llevó a cabo según los procesos previamente mencionados en el primer capítulo. En este caso específicamente, se determinaron las siguientes propiedades: pH, CE, Coxi, Csol, CIC, Polsen, K, contenido de metales totales e índice de germinación. Adicionalmente se llevó a cabo el análisis elemental (% C, N, H, S, O), termogravimétrico (curvas TG, dTG), la porosimetría y S_{BET} .

El análisis inmediato se realizó en un equipo termogravimétrico modelo Labsys Setaram, determinando el contenido en cenizas (Cenizas), carbono fijo (CF) y materia volátil (MV). El análisis se efectuó calentando una muestra de 20 mg aproximadamente a una velocidad de 20 °C min⁻¹ en atmósfera de N₂ (40 mL min⁻¹) desde temperatura ambiente hasta 600 °C. En este punto se introduce aire (30 min aprox.) hasta alcanzar estabilidad en el peso. La primera pérdida de peso se obtuvo hasta los 150 °C correspondiendo a la pérdida de humedad, la segunda a temperaturas

mayores (150 °C a 600 °C) con la que se determina el porcentaje de materia volátil (MV). La masa residual tras este tratamiento con aire corresponde al porcentaje de cenizas. El porcentaje de carbono fijo (CF) de la muestra se determinó por diferencia de los porcentajes de humedad, materia volátil y cenizas (Méndez et al., 2014). El índice de termoestabilidad ($CF / (MV + FC)$), se determinó relacionando la materia volátil y el carbono fijo.

2.5. Experimentos de fitoextracción: realización de las mezclas suelo–enmiendas y montaje de experimentos

Inicialmente se realizó el montaje de cada una de las macetas con una capa de grava de 100 g en todos los casos. Seguido de 300 g de la correspondiente mezcla. Las mezclas se realizaron con 10% de enmienda y 90% de suelo, teniendo en cuenta que en el suelo testigo no se adicionó ningún tipo de enmienda. Para el caso de las mezclas de biochar y estiércol, el porcentaje manejado fue de 5% del EC y 5% del correspondiente biochar. Resultando en un total de seis tratamientos por suelo, considerando el suelo testigo y las mezclas de suelo con las cinco enmiendas, como se muestra en la Tabla II- 1.

Para los tratamientos de fitoextracción, se colocaron 10 semillas en cada maceta y cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado. De igual forma se efectuó el montaje de los suelos control, es decir las mismas mezclas, pero sin semilla. Todos los tratamientos se llevaron a capacidad de campo y se determinó el peso inicial de las macetas con esta humedad. El total de las macetas se mantuvieron durante dos meses en una incubadora a 20 °C con ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. El peso inicial se alcanzó diariamente mediante riego con agua destilada.

Tabla II- 1. Mezclas utilizadas para el montaje de los experimentos.

Tratamientos colza (C)					
Muestra	Suelo (g)	Enmienda (g)	Muestra	Suelo (g)	Enmienda (g)
L32+C	300	-	P2+C	300	-
L32+B300+C	270	30g B300	P2+B300+C	270	30g B300
L32+B600+C	270	30g B600	P2+B600+C	270	30g B600
L32+B300+EC+C	270	15g B300 15g EC	P2+ B300+EC+C	270	15g B300 15g EC
L32+ B600+EC+C	270	15g B600 15g EC	P2+ B600+EC+C	270	15g B600 15g EC
L32+EC+C	270	30g EC	P2+EC+C	270	30g EC

Tratamientos mostaza (M)					
Muestra	Suelo (g)	Enmienda (g)	Muestra	Suelo (g)	Enmienda (g)
L32+M	300	-	P2+M	300	-
L32+B300+M	270	30g B300	P2+B300+M	270	30g B300
L32+B600+M	270	30g B600	P2+B600+M	270	30g B600
L32+B300+EC+M	270	15g B300 15g EC	P2+ B300+EC+M	270	15g B300 15g EC
L32+ B600+EC+M	270	15g B600 15g EC	P2+ B600+EC+M	270	15g B600 15g EC
L32+EC+M	270	30g EC	P2+EC+M	270	30g EC

2.6. Caracterización de las muestras posterior a la incubación

Posterior a los dos meses de incubación, se determinaron las actividades enzimáticas de tres enzimas: fosfomonoesterasa, β -glucosidasa y deshidrogenasa, además del índice GMea siendo este la media de las actividades (Capítulo I, 2.10. Actividades enzimáticas). La biomasa microbiana se efectuó mediante el método indirecto de fumigación con cloroformo, estableciendo el carbono asociado a la presencia o ausencia de los microorganismos (Capítulo I, 2.11. Biomasa microbiana) y el contenido de metales totales en plantas y suelo se obtuvo mediante digestión ácida (Capítulo I, 2.12. Contenido de metales en plantas y suelos). Una vez obtenidos los resultados de la concentración de metales totales en la planta (hojas, tallos y raíces) se calcularon los factores de bioconcentración (BCF) y de translocación (TF) siguiendo la metodología ya descrita.

2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se utilizó para determinar la existencia de diferencias significativas en las diferentes variables analizadas. Proceso realizado a través del programa STATGRAPHICS Centurion XVI.II. Se determinó la existencia de diferencias con un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Duncan para conocer específicamente entre que tratamientos se dieron las variaciones. Teniendo en cuenta que dichas variaciones se representan por letras seguidas de los valores medios y desviaciones, en donde letras iguales muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de materiales

La Tabla II- 2 indica las propiedades físicas y químicas de los biocharres y EC utilizados durante el montaje de los experimentos, en donde para el pH se obtiene una variación posterior al tratamiento térmico del EC, resultando en un menor pH en el caso del biochar producido a 300 °C y un mayor pH en el B600, aunque todos los materiales tienden a la basicidad. La influencia de la temperatura ha sido estudiada en otras investigaciones (Al-Wabel et al., 2013), resultando en menores pH a bajas temperaturas de producción, explicado por el proceso de separación de las sales alcalinas y los materiales orgánicos (Yuan et al., 2011). La CE, por su parte, tiende a disminuir tras la pirólisis, pero no hay diferencias entre los biocharres. Siendo esto una tendencia normal según Figueiredo et al. (2018) quienes sustentan que en los biocharres la CE es menor que la materia prima pero que al aumentar la temperatura de fabricación del material aumenta esta propiedad. En el presente estudio, la CE para el B600 es de $0.39 \pm 0.08 \text{ dS m}^{-1}$ mientras para el B300 es de $0.34 \pm 0.02 \text{ dS m}^{-1}$ pero no existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla II- 2. Propiedades físicas y químicas del EC y biocharres. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

	EC	B300	B600
pH	$9.20 \pm 0.06\text{b}$	$8.64 \pm 0.2\text{a}$	$10.76 \pm 0.19\text{c}$
CE (dS m^{-1})	$0.62 \pm 0.01\text{b}$	$0.34 \pm 0.02\text{a}$	$0.39 \pm 0.08\text{a}$
C_{oxi} (%)	$20.13 \pm 0.13\text{b}$	$20.45 \pm 0.62\text{b}$	$5.13 \pm 1.35\text{a}$
C_{sol} (%)	$1.72 \pm 0.03\text{c}$	$0.78 \pm 0.03\text{b}$	$0.05 \pm 0.02\text{a}$
CIC($\text{cmol}_\text{c} \text{ kg}^{-1}$)	$98.71 \pm 0.50\text{a}$	$145.87 \pm 10.4\text{c}$	$127.14 \pm 6.29\text{b}$
Polsen (g kg^{-1})	$4.70 \pm 0.01\text{c}$	$1.6 \pm 0.16\text{b}$	$0.76 \pm 0.03\text{a}$
K ($\text{cmol}_\text{c} \text{ kg}^{-1}$)	$61.03 \pm 1.18\text{b}$	$18.9 \pm 0.01\text{a}$	$19.7 \pm 1.15\text{a}$
Cenizas (%)	40.36	50.59	61.35
MV (%)	38.85	30.06	4.93
CF (%)	19.46	19.35	33.72
CF/(MV+FC)	0.33	0.39	0.87

En cuanto a la concentración de carbono orgánico fácilmente oxidable, se resalta el bajo contenido del mismo, en el B600 y se relaciona con la presencia de estructuras de carbono más grandes y aromáticas (Calvelo Pereira et al., 2011). Mientras a menores temperaturas y en el material de partida (EC) el carbono es lábil, presentándose el mismo comportamiento en el carbono soluble con mayor contenido en el estiércol y menor en los biocharres, específicamente el B600. La CIC, incrementa en el B300 y B600, pero el mayor promedio fue de $145.87 \pm 10.4 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$ en el B300, en concordancia con lo registrado por Gaskin et al. (2008) quienes relacionan mayores CIC en biocharres fabricados a menores temperaturas.

El fósforo varía considerablemente entre el EC y los biocharres, disminuyendo en los materiales carbonosos, en donde el P_{olsen} fluctúa entre 0.76 ± 0.03 y $1.6 \pm 0.16 \text{ g kg}^{-1}$ en los biocharres. Igualmente sucede en el K, siendo la concentración de este considerablemente mayor que en el B300 y B600. El porcentaje de cenizas, incrementa al transformar el EC en biochar y también con la temperatura, coincidiendo por lo datado en la investigación de Angin (2013), quien sustenta que al aumentar la temperatura, el porcentaje de cenizas incrementa, aunque también lo relacionan con la velocidad de calentamiento ya que existen diferencias al producir biocharres a 10, 30 y $50 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. En esta investigación, además se identifica el análisis inmediato estableciendo que la materia volátil disminuye con la temperatura, igual a lo sucedido en el presente estudio (Tabla II- 2) mientras que el carbono fijo aumenta a temperaturas alrededor de los $600 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Angin (2013) concluye que el biochar fabricado a $600 \text{ }^{\circ}\text{C}$ es adecuado como combustible debido básicamente al alto contenido de carbono fijo, alto poder calorífico y bajo contenido de materia volátil.

Otros residuos ganaderos estudiados (estiércol de ganado, purín de cerdo, gallinaza) muestran las mismas características, siendo la MV mayor en la materia prima y menor en los biocharres, además los biocharres a mayores temperaturas ($\geq 500 \text{ }^{\circ}\text{C}$) poseen los menores valores de dicha variable que aquellos elaborados a $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$. El comportamiento se invierte en el caso de CF, siendo menor en los residuos como tal, e incrementado con la pirólisis y la temperatura implementada (Cely et al., 2015). En el caso del índice de termoestabilidad, el cual indica la cantidad de la fracción de materia orgánica más estable térmicamente en comparación con la menos estable, se tiene que al aumentar la temperatura aumenta el $\text{CF}/(\text{MV}+\text{FC})$ lo cual se

mantiene en la investigación previamente descrita y en el presente estudio, con los valores más altos para los biocharres a 500 °C (Cely et al., 2015) y 600 °C (Tabla II- 2).

La concentración de metales totales varía para cada metal, en el caso del Cd no se establecen diferencias estadísticamente significativas entre los biocharres y el EC, siendo las concentraciones de este metal bajas, no superan los 0.4 mg kg⁻¹. A diferencia del Cu, el cual aumenta tras el proceso de pirólisis y también con la temperatura, el mayor valor registrado es de 90.26 ± 0.81 mg kg⁻¹ en el B600. En el Pb no existen variaciones significativas entre el EC y el B600 y el menor promedio se dio en el B300, no obstante las cantidades son bajas. Los datos medios del Fe son altos y entre el B300 y el EC las variaciones son insignificantes mientras el B600 reporta el mayor valor. Las cantidades de Zn en las enmiendas son bajas ($Zn \leq 1.01$ mg kg⁻¹) y la única diferencia radica en el B600 comparado con el EC, siendo mayor en el material carbonoso. Por último, el As no muestra diferencias significativas entre las enmiendas orgánicas. A nivel general, los datos más altos se reportan para el Cu y el Fe (Tabla II- 3).

Al comparar los resultados de metales totales obtenidos con el comportamiento en otras materias primas, como el purín de cerdo, se observa una tendencia clara siendo las concentraciones más altas al aumentar la temperatura de pirólisis. Según Gascó et al. (2018) biocharres fabricados a 600 °C tienen contenidos altos de Cd, Cu, Fe, Pb y Zn en comparación con el purín de cerdo sin tratamiento térmico y en el caso de los biocharres a 300 °C los valores siguen siendo mayores que la materia prima, lo cual se debe a la retención de los metales en las cenizas de los materiales carbonosos.

De la misma manera, Uchimiya et al. (2012) encontraron que para el Cu y el Ni, las concentraciones aumentan con la temperatura en biocharres fabricados a partir de estiércol de ganado lechero, gallinaza y estiércol de pavo, entre otros. Siendo este comportamiento idéntico a los valores de Cu reportados en la Tabla II- 3, donde a mayor temperatura de pirólisis, mayor Cu. Mientras que el Pb, en los reportes de Uchimiya et al. (2012) disminuye con la temperatura, lo cual coincide con lo encontrado para el B300 (Tabla II- 3). En la investigación previamente referenciada no existe un comportamiento definido del Cd para los diferentes materiales y en los resultados del Cd para el EC, B300 y B600 sucede algo similar pues no hay diferencias estadísticas entre los el EC y B300, solo el en el B600 se observa un ligero aumento.

Tabla II- 3. Concentración de metales (mg kg^{-1}) totales en el EC y biochares. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Metales	EC	B300	B600
Cd	$0.31 \pm 0.04a$	$0.3 \pm 0.06a$	$0.39 \pm 0.02b$
Cu	$68.83 \pm 2.84a$	$81.56 \pm 1.96b$	$90.26 \pm 0.81c$
Pb	$7.81 \pm 0.62b$	$5.39 \pm 0.59a$	$7.56 \pm 0.02b$
Fe	$3417.77 \pm 124.17a$	$2785.79 \pm 5a$	$5238.4 \pm 322.55b$
Zn	$674.7 \pm 129.54a$	$924.45 \pm 219.53b$	$1008.19 \pm 4.25b$
As	$1.71 \pm 0.05a$	$1.64 \pm 0.03a$	$1.62 \pm 0.03a$

En general la concentración de metales de las enmiendas, para ninguno de los metales, sobrepasa el límite establecido por ejemplo para fertilizantes en suelos por la legislación española (BOE 164- MPR, 2013), ni para suelos tratados con lodos de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), exceptuando el caso del Zn pues el rango para este metal es de 150 a 450 mg kg^{-1} (BOE 262- MAPA, 1990) y la concentración del EC, B300 y B600 se encuentra por encima de los 674 mg kg^{-1} aproximadamente. Actualmente no existe un listado de metales y concentraciones máximas permitidas cuando se adicionan enmiendas orgánicas como son los biochares, hidrochares e incluso estiércol, estableciendo la necesidad de este tipo de estudios pues estos materiales se han convertido en alternativas para el manejo y valorización de los residuos.

El porcentaje de carbono aumenta después de tratar térmicamente el EC, siendo mayor en el B300, por el contrario el porcentaje de oxígeno de las muestras tiene un comportamiento invertido, en donde el menor valor corresponde al B600 seguido por el B300 mientras el EC tiene un 33.91 % de O. El contenido en hidrógeno es similar en el EC y B300, no obstante en el caso del B600 la disminución es considerable, igualmente sucede con el nitrógeno y en el caso del sulfuro, los porcentajes son bajos en todas las enmiendas (Tabla II- 4). Figueiredo et al. (2018) explican que en el caso del N, la baja concentración en los biochares producidos a mayores temperaturas se debe al proceso de volatilización que tiene este elemento durante el proceso de pirólisis, además asocian el alto contenido de N en el biochar producido a 300 °C a la presencia de componentes de N más estables y que no son fáciles de descomponer a esta temperatura.

Tabla II- 4. Análisis elemental del EC y biochares.

Muestra	%C	%H	%N	%S	%O	H/C	O/C	(N+O)/C
EC	20.37	3.11	1.94	0.32	33.91	1.83	1.25	1.33
B300	31.33	3.34	2.14	0.50	12.10	1.28	0.29	0.46
B600	29.64	1.30	0.80	0.38	6.53	0.54	0.18	0.27

Agrafioti et al. (2013) sustentan que el contenido de C disminuye con la temperatura, lo cual concuerda con los presentes resultados, siendo la volatilización el proceso determinante. Los valores obtenidos por Agrafioti et al. (2013) en el biochar producido a 500 °C son evidentemente menores que el biochar de 300 °C pasando de 39.7% para el BC300 a 9.8% para el BC500, dicha variación se produce en menor grado en los biochares de la actual investigación, pues en el B300 el % C es de 31.33% y disminuye a 29.64% (Tabla II- 4), es aquí donde la naturaleza de la materia prima juega un rol importante, pues en general los residuos ganaderos tienen mayor contenido de lignocelulosa, lo que hace que las pérdidas sean menores, o al menos si se compara con biochares de lodos de depuradora (Agrafioti et al., 2013; Figueiredo et al., 2018; Gaskin et al., 2008).

Figura II- 2. Diagrama de Van Krevelen para el EC y biochares.

Las pérdidas de H y O posterior al proceso de pirólisis se deben básicamente a la reducción de los grupos funcionales hidroxilo (-OH) y los procesos de deshidratación y condensación (Antal & Grønli, 2003). Las relaciones atómicas (Tabla II- 4), muestran el descenso de dichos ratios posterior a la pirólisis y con el aumento de la temperatura, en el caso del H/C el menor valor se

encuentra en el B600 indicando mayor contenido de compuestos aromáticos y un aumento de la condensación aromática (Yuan et al., 2013). De hecho, Agrafioti et al. (2013) explica que según la temperatura de producción, los biocharres tienen diferentes funciones, biocharres a 500 °C sirven para almacenamiento de C en el suelo, por el contrario biocharres a 300 °C son fuentes de carbono orgánico lábil y por ende pueden proveer nutrientes a las plantas. La disminución de las relaciones H/C y O/C en los biocharres se pueden evidenciar claramente en el diagrama de Van Krevelen (Figura II- 2), en donde el EC posee altos valores de dichas variables, lo que se debe a la tasa de reacción de la descarboxilación a la deshidratación (Kambo & Dutta, 2015).

En el análisis termogravimétrico se puede evidenciar que la primera pérdida es la pérdida de humedad, el EC pierde mayor cantidad de agua en la franja inicial de temperatura (25 °C a 150 °C). Luego se da la franja de combustión de la materia orgánica, la cual se divide en dos, por un lado se tiene la materia orgánica menos evolucionada, siendo esta la celulosa y hemicelulosa, se da entre los 200 °C y los 350 °C y en el caso del EC existe gran pérdida de este material a las temperaturas indicadas. Pasados los 375 °C hasta los 600 °C, la disminución corresponde a la materia orgánica más evolucionada, es decir estructuras aromáticas de alto peso molecular, la cual es más estable en el EC sin existir mayores fluctuaciones (Figura II- 3). Entre los 550°C y los 600 °C, también se ha referenciado la descomposición de las arcillas y por encima de los 600 °C se descomponen minerales como los carbonatos (Gascó et al., 2018; Méndez et al., 2011).

Figura II- 3. Curvas TG y dTG para el EC.

En los biochares, las pérdidas de peso son menores en la primera zona franja de combustión de la materia orgánica mientras que en la segunda zona es mayor, esto se relaciona con la presencia de estructura de C aromáticas estables resultado del proceso de pirólisis (Figura II- 4 y Figura II- 5).

Figura II- 4. Curvas TG y dTG para el B300.

Figura II- 5. Curvas TG y dTG para el B600.

Tabla II- 5. Perdidas de peso (P) obtenidas del análisis termo – gravimétrico para el EC y los biochares.

Muestras	P1	P2	P3	P2/(P2+P3)	P3/(P2+P3)	P3/P2
EC	7.02	29.15	25.84	0.53	0.47	0.89
B300	2.21	19.41	49.14	0.28	0.72	2.53
B600	2.14	5.56	30.44	0.15	0.85	5.47

El área superficial (S_{BET}) de los materiales muestra un aumento considerable en el B600 comparado con el EC. Lo que se debe según Zhao et al. (2017) a la degradación progresiva de la celulosa, hemicelulosa y lignina y a la formación de enlaces vasculares o canales estructurales durante el proceso de pirólisis. De igual forma se observa el aumento de la S_{BET} en el B300, en menor proporción que para el B600, producto posiblemente de la alta reactividad de la hemicelulosa a temperaturas menores a 300 °C. En el caso de la porosimetría, el V_{micro} también aumenta con la temperatura de pirólisis (Tabla II- 6), lo que concuerda con anteriores investigaciones (Suliman et al., 2016; Zhao et al., 2017) y se justifica con el comportamiento de la materia orgánica con la temperatura, es decir entre 300 y 400 °C se presenta la ruptura de la hemicelulosa y la formación de estructuras de carbón amorfas, resultado de la degradación de la celulosa, generando más microporos. Alrededor de los 500 °C se da la descomposición de la lignina y por ende la liberación de H_2 y CH_4 , lo cual también contribuye al aumento de la S_{BET} y los volúmenes de poro (V_{micro} , V_{meso} , V_{macro}), como se puede evidenciar en la Tabla II- 6. El aumento de la temperatura hasta los 600 °C genera un incremento drástico de la S_{BET} resultado coherente pues se dan procesos de condensación aromática, además de la contribución debido a la degradación de la lignina.

Tabla II- 6. Área superficial S_{BET} y porosimetría del EC y biochares. V_{micro} : Volumen de microporos; V_{meso} : Volumen de mesoporos; V_{macro} : Volumen de macroporos.

Muestras	S_{BET} ($m^2 g^{-1}$)	V_{micro} ($cm^3 g^{-1}$)	V_{meso} ($cm^3 g^{-1}$)	V_{macro} ($cm^3 g^{-1}$)
EC	1.1666	0.000177	0.02685	0.49131
B300	2.3123	0.012750	0.01780	1.3666
B600	23.6087	0.067350	0.05795	1.9357

La prueba de fitotoxicidad de Zuconi, muestra alta fitotoxicidad en el EC y B300 con valores de IG menores a 50, mientras que en el B600 alcanza un valor promedio de 84.74 ± 9.22 catalogando este material como no fitotóxico (Figura II- 6). Investigaciones realizadas por Rombolà et al. (2015) respecto a la germinación de *Lepidium sativum*, con biocharres de gallinaza a 400, 500 y 600 °C registran porcentajes de germinación bajos en suspensiones de biochar/ agua desionizada de 40 g L⁻¹ siendo estos de $52 \pm 19\%$ en el biochar producido a 400 °C, $47 \pm 10\%$ en el de 500 °C y de $53 \pm 7\%$ en el de 600 °C mientras en el control es el porcentaje germinación es de $92 \pm 2\%$. Dichos autores explican la inhibición de la germinación de semillas por la presencia de componentes químicos presentes en la materia prima. Por el contrario, Nieto et al. (2016) encontró que el índice de germinación para la lechuga aumenta con la temperatura de pirólisis siendo para el biochar producido a 300 °C de 55.7 e incrementado a 83.0 en el B600, argumentando la degradación de los compuestos químicos provenientes de la materia prima (sustancias fenólicas) debido al tratamiento térmico. Este comportamiento es similar a lo registrado en el presente estudio (Figura II- 6), en el cual el EC se considera elevada fitotoxicidad y el B600 no.

Figura II- 6. Índice de germinación para el EC y biocharres. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

3.2. Caracterización de los suelos

La Tabla II- 7 muestra las propiedades fisicoquímicas de L32 y P2, permitiendo establecer que son suelos con valores de pH similares, los cuales tienden a la basicidad. En el caso de la CE

en el L32 es mayor en comparación con P2, pero C_{oxi} tiene el comportamiento contrario siendo de $0.92 \pm 0.05\%$ para P2 mientras en L32 es bajo, de $0.25 \pm 0.01\%$. La CIC no presenta variaciones entre los suelos, mientras que las bases de cambio (K y Na) difieren en las muestras, P2 posee mayor contenido de Na y L32 mayor concentración de K. El fósforo biodisponible (Polsen) es considerablemente más alto en P2 y la concentración de metales cambia según el metal.

Tabla II- 7. Propiedades físico químicas determinadas en la caracterización inicial de los suelos. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

	L32	P2
Textura	Franco arenoso	Arenoso franco
pH	$7.89 \pm 0.0a$	$8.09 \pm 0.01b$
CE ($dS\ m^{-1}$)	$2.24 \pm 0.01b$	$0.35 \pm 0.01a$
C_{oxi} (%)	$0.25 \pm 0.01a$	$0.92 \pm 0.05b$
CIC ($cmol_c\ kg^{-1}$)	$10.55 \pm 1.04a$	$12.20 \pm 0.30a$
Na ($cmol_c\ kg^{-1}$)	$15.26 \pm 0.91a$	$57.37 \pm 2.67b$
K ($cmol_c\ kg^{-1}$)	$21.31 \pm 0.74b$	$12.69 \pm 0.98a$
Polsen ($mg\ kg^{-1}$)	$722 \pm 73a$	$6632 \pm 978b$
Cd ($mg\ kg^{-1}$)	$10.58 \pm 0.08a$	$12.11 \pm 0.59a$
Fe ($g\ kg^{-1}$)	$117.75 \pm 2.38a$	$115.81 \pm 0.39a$
Cu ($mg\ kg^{-1}$)	$40.13 \pm 15.15a$	$146.66 \pm 1.15b$
As ($g\ kg^{-1}$)	$0.47 \pm 0.02a$	$1.21 \pm 0.25a$
Pb ($g\ kg^{-1}$)	$2.28 \pm 0.03a$	$18.98 \pm 1.15b$
Zn ($g\ kg^{-1}$)	$4.13 \pm 0.0a$	$6.45 \pm 0.24b$

El área de Portmán, hace parte de la comunidad autónoma de Murcia, no obstante para este sector no han sido definidos NGR de los metales para su uso agrícola. La información disponible para los límites de concentración de metales se encuentra registrada para áreas cercanas, como es el caso de comunidad autónoma de Andalucía, según dicha legislación los suelos se puede considerar como contaminados para As y Pb (Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio- Junta de Andalucía, 2015). Adicionalmente, al comparar los valores con la legislación utilizada a nivel europeo (filandesa), la concentración de metales totales registrada para L32 y P2 sobrepasa los rangos de As, Pb y Zn (Tóth et al., 2016).

La textura por su parte es un factor esencial en la lixiviación de los metales, los suelos seleccionados en el presente estudio se catalogan como franco arenoso para L32 y arenoso franco para P2, según Jordá et al. (2004) los suelos arenosos son muy permeables y con alto grado de aireación, además de poseer baja fijación de metales, posibilitando la lixiviación a los horizontes subyacentes e incluso existe un riesgo latente de contaminación de los niveles freáticos, mientras que los suelos francos son los más deseados en la agronomía, debido a sus propiedades intermedias y porcentajes similares de arcilla, limo y arena.

3.3. Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de *Brassica napus* en el pH, CE y las propiedades biológicas de los suelos

La adición de los biochar, el EC y las mezclas de biochar con EC no generan mayores variaciones en el pH del suelo L32, exceptuando el caso de muestra L32+B600 y el crecimiento de *Brassica napus*, en este caso tiene influencia en la fluctuaciones del pH (Figura II- 7a). En P2, la mezcla del suelo con las enmiendas aumenta el pH produciendo diferencias estadísticamente significativas, especialmente en el caso del uso del B600, además se evidencia que el crecimiento de la colza disminuye ligeramente los valores de pH pero sin ser menores que el suelo sin enmendar (Figura II- 7b). Investigaciones realizadas en ensayos de 3 años determinaron que la aplicación de biochar, produce pequeños pero significativos cambios en el pH del suelo, en donde la mayor variación fue un aumento de 0.32 unidades (Jones et al., 2012).

El B600 registró el mayor valor de pH con 10.76 ± 0.19 (Tabla II- 2) y son las mezclas de suelo con este material, las que registran un incremento evidente en comparación con los otros tratamientos. La conductividad, aumenta con el uso de enmiendas en los dos suelos pero es el tratamiento L32+B300+EC y P2+B300+EC (Figura II- 8 a y b) los que menores valores arrojan entre los suelos enmendados. En L32 se evidencia que el crecimiento de *Brassica napus* disminuye la CE cotejando con los respectivos controles (Figura II- 8a), de igual forma sucede con P2 exceptuando el caso de P2+B600+EC, donde con colza la CE aumenta y en P2+EC los valores registrados para la CE son iguales (Figura II- 8b). Según el estadístico de Pearson las variables pH y CE tienen bajos R^2 y coeficientes de correlación, para los suelos control de Lodo 32 ($R^2=0.68$; $P=0.82$) y los suelos con colza ($R^2=0.54$; $P=0.73$), al igual que los suelos de Portmán 2 control ($R^2=0.72$; $P=0.85$) y PORT+ *Brassica napus* ($R^2=0.44$; $P=0.66$).

Figura II- 7. pH en los suelos control y con *Brassica napus*: a. L32 y b. P2. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura II- 8. CE (dS m^{-1}) en los suelos control y con *Brassica napus*: a. L32 y b. P2. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

El comportamiento de las actividades enzimáticas, a nivel general, es similar, en donde la adición del B600 produce valores bajos en comparación con los suelos enmendados con B300, EC y las mezclas de biochar y EC. Para la fosfomonoesterasa en L32, la actividad incrementa en el suelo mezclado con el EC mientras que disminuye con el B600, siendo incluso menor que el suelo sin enmienda (Figura II- 9a) y no se presentan mayores diferencias entre los tratamientos con o sin planta. En P2, existe el mismo comportamiento pero la muestra P2+B300+EC también registra valores altos (Figura II- 9b). La respuesta de dicha enzima ante la adición de biochar puede estar condicionada a la temperatura de pirólisis, según Liang et al. (2014), la fosfomonoesterasa aumenta al enmendar el suelo con un biochar proveniente de gallinaza producido a 400 °C, lo cual concuerda con los resultados obtenidos para el B300, mientras que a mayores temperaturas de pirólisis (600 °C) disminuye la actividad de la enzima.

En la β -glucosidasa, todas las enmiendas aumentan la actividad pero en el L32+B600 no existen diferencias significativas con el L32, nuevamente el L32+EC posee promedios considerablemente mayores (Figura II- 10a). Otras investigaciones (Bailey et al., 2011) sustentan que la actividad de la β -glucosidasa disminuye con biochar producidos a 500 °C (Smith et al., 2010), lo que permite ratificar el rol de la temperatura de producción en los beneficios del biochar al menos en cuanto a las actividades enzimáticas se refiere y explicando de cierta forma la ausencia de variaciones entre el suelo sin enmienda y con B600. Este material muestra la misma tendencia en el suelo P2 y en particular para los tratamientos de este suelo el crecimiento de *Brassica napus* tiene un efecto positivo (Figura II- 10b).

Para la deshidrogenasa también se calcularon los menores valores en las muestras L32+B600 (Figura II- 11a) y P2+B600 (Figura II- 11b), a diferencia de esto el B300 maximiza la actividad al igual que el EC. En este aspecto, Ameloot et al. (2014) reportan que biochar a 350 °C potencializan la cantidad de deshidrogenasa en el suelo. Adicional a la temperatura de fabricación de los biochar, Wang et al. (2015) explican la influencia de la cantidad de material agregado, estableciendo que menores cantidades de biochar producen mayor actividad enzimática. El índice GMea (Figura II- 12a y b), como ya se ha mencionado integra las mediciones de las tres enzimas por lo cual los menores promedios de GMea se relacionan con el B600, mientras que el EC y B300+EC potencializan la concentración de enzimas, siendo los residuos ganaderos materiales óptimos en la mejora de la calidad del suelo en lo que a la microbiota se refiere.

Figura II- 9. Fosfomonoesterasa con *Brassica napus*: a. L32 y b. P2. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

Figura II- 10. β-glucosidasa con *Brassica napus*: a. L32 y b. P2. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

Figura II- 11. Deshidrogenasa con *Brassica napus*: a. L32 y b. P2. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

Figura II- 12. Índice GMea con *Brassica napus*: a. L32 y b. P2. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

La biomasa microbiana disminuye en el caso de los tratamientos con enmiendas y crecimiento de *Brassica napus*, si se observan solo las muestras denominadas como controles en L32, es decir, sin crecimiento de colza se puede establecer que la adición del B600 disminuye la cantidad de carbono asociado a los microorganismos del suelo, incluso la mezcla del B600+EC no mejora esta propiedad biológica (Figura II- 13). Lo cual puede ser explicado por el contenido y estructura de carbono asociado a la enmiendas, el B600 al ser producido a mayores temperaturas presenta estructuras de carbono aromáticas de forma turbostráticas, lo que le confiere al biochar mayor estabilidad y a su vez dificulta el uso de dicho carbono por parte de los microorganismos como fuente de energía (Lehmann et al., 2011). No obstante, a menores temperaturas el carbono aromático es de tipo amorfo y en este caso una fracción del C puede ser utilizable y por ende mineralizable, generándose mayor actividad microbiana (Lehmann & Joseph, 2009). La fracción nombrada puede ser cuantificable a través de la material volátil, por lo cual enmiendas con mayores porcentajes de MV resultan en mayor biomasa microbiana. Este comportamiento se observa en el presente estudio, en donde los valores de MV para el EC y B300 son considerablemente mayores que el B600 (Tabla II- 2). Resultados del análisis elemental inicial 600 también contribuir con el comportamiento de la microbiota pues el B600 tiene menor porcentaje en C (Tabla II- 4).

Figura II- 13. Biomasa microbiana (C- biomasa) con *Brassica napus* para L32. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

La presencia de *Brassica napus* disminuye a nivel general la biomasa microbiana en el suelo testigo L32 y los suelos enmendados (Figura II- 13), lo cual puede sugerir una interacción entre el carbono disponible para los microorganismos y para la planta. En cuanto a la C- biomasa en el suelo P2, el comportamiento es igual respecto a la adición de B600, disminuyendo la actividad de los microorganismos y manteniendo la hipótesis planteada por Lehmann et al. (2011). De igual forma, la cantidad de biomasa microbiana se ve asociada a las actividades enzimáticas, pues estas son una medida de la concentración de sustrato disponible como fuente de energía (Kambo & Dutta, 2015), lo que coincide con los resultados previamente descritos para el GMea (Figura II- 12). La tendencia de los datos de cada una de las enzimas analizadas independientemente: fosfomonoesterasa (Figura II- 9), β -glucosidasa (Figura II- 10) y deshidrogenasa (Figura II- 11), corroboran la menor concentración en los tratamientos mezclados con el B600 e incluso la mezcla de este con el EC (B600+EC) para los dos suelos. El crecimiento de *Brassica napus* en el suelo sin enmendar, disminuye considerablemente la biomasa microbiana, al igual que sucede en las muestras P2+B300 y P2+B600, no obstante en los tratamientos de mezcla entre biochar y EC, la biomasa incrementa evidentemente sugiriendo la mejora de la calidad del suelo al combinar el crecimiento de especies vegetales con el uso de biochar y compost.

Figura II- 14. Biomasa microbiana (C- biomasa) con *Brassica napus* para P2. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

3.4. Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de *Brassica napus* en el contenido de metales en los suelos

En el suelo L32, proveniente de una presa de residuos de flotación, la concentración de los metales totales entre el suelo sin enmendar y el suelo mezclado con los biocharres, las mezclas y el EC, no presentan diferencias estadísticamente significativas para el Cu (Figura II- 15c), Fe (Figura II- 15e), Pb (Figura II- 15g), Zn (Figura II- 15i) y As (Figura II- 15k). Tampoco se evidencian variaciones con el crecimiento de *Brassica napus* en los tratamientos. En este caso, el único metal que disminuye su concentración es el Cd en la muestra L32+B300 (Figura II- 15a). No obstante, en el P2 el comportamiento de los metales fluctúa para cada uno, por ejemplo, en el Cd la adición del B600 parece aumentar la concentración de dicho metal, mientras que el resto de tratamientos tienen valores iguales a aquellos registrados para el suelo sin enmendar y la presencia de *Brassica napus* no tiene influencia alguna (Figura II- 15b). A diferencia de esto en el Cu se registra un descenso de los promedios en los suelos enmendados con el B300, B600 y el EC, siendo este descenso más notorio en los tratamientos de los biocharres mezclados con el EC, por ende los menores datos son los de P2+B300+EC y P2+B600+EC (Figura II- 15d), sin embargo los controles y las macetas con colza no difieren en el contenido de Cu. La tendencia encontrada en el Fe es similar que la del Cu pero en particular la adición del EC al suelo no cambia en comparación al suelo testigo P2 (Figura II- 15f), sucediendo lo mismo para el Pb (Figura II- 15h). Las cantidades del Zn en el P2 y el suelo con adición de enmiendas son estadísticamente iguales (Figura II- 15j) y respecto al As se presenta una variación, disminuyendo en los suelos tratados pero sin fluctuaciones entre las enmiendas (Figura II- 15l).

Las variaciones en el comportamiento de los metales entre los dos suelos, se debe principalmente a las características de cada uno de ellos. Varias investigaciones han documentado la influencia del pH en el comportamiento de los metales en el suelo (Bolan et al., 2014; Lomaglio et al., 2017), sin embargo en el presente trabajo la variación del pH comparando los dos suelos no es tan evidente, siendo el pH similar (Tabla II- 7) incluso si se analizan los cambios en el pH posterior al tiempo de incubación y con la mezcla de enmiendas, existe una tendencia clara con el aumento del pH debido adición de biocharres y EC (Figura II- 7). Por lo cual se plantea la hipótesis que el factor dependiente es la conductividad, la CE es menor en el P2 que en L32 (Figura II- 8), catalogando a L32 como un suelo salino.

Figura II- 15. Metales totales en los suelos control y con *Brassica napus*. a: Cd en L32, b: Cd en P2, c: Cu en L32, d: Cu en P2, e: Fe en L 32, f: Fe en P2, g: Pb en L32, h: Pb en P2, i: Zn en L32, j: Zn en P2, k: As en L32, l: As en P2.

Según Martínez-Sánchez et al. (2011) la influencia del pH está relacionada con el comportamiento de los metales solubles y biodisponibles y no con los metales totales (resultados descritos), mientras que la CE esta correlacionada con el comportamiento de ciertos metales. A nivel general la adición de enmiendas tiene efectos positivos o nulos en la concentración de metales totales en los suelos pero la mezcla de los suelos con biochar, EC y las correspondientes mezclas no parece potencializar la acumulación por parte de *Brassica napus* o al menos no hay mayores variaciones en los metales del suelo con o sin planta.

3.5. Capacidad de fitoextracción de *Brassica napus*

3.5.1. Producción de biomasa vegetal de *Brassica napus*

El peso seco de la planta registrado para los diferentes tratamientos demuestra la existencia de diferencias entre las muestras L32+B600+EC y L32+EC y el suelo sin enmendar L32 en lo que a la biomasa de hojas se refiere, lo mismo sucede en el caso del peso determinado para los tallos. Las raíces de *Brassica napus* son las de mayor biomasa respecto a la parte superior de la planta (hojas y tallos) y en esta caso únicamente la muestra L32+B600+EC aumenta el peso seco. El total de biomasa vegetal obtenido en el suelos L32 ratifica el beneficio de agregar la mezcla de B600 y EC al suelo (Figura II- 16).

Figura II- 16. Biomasa vegetal de *Brassica napus* en L32. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Para el suelo P2, la biomasa de las hojas aumenta en el suelo enmendado con el B300 y el EC, mientras en los otros suelos enmendados el peso seco es igual o mayor al P2. Los tallos poseen la misma tendencia que las hojas, mientras que en las raíces la secuencia es la siguiente: $P2+B300+EC = P2+B600+EC \leq P2+B600 \leq P2 \leq P2+EC = P2+B300$. En la biomasa vegetal total de *Brassica napus* los menores valores se dan en los suelos enmendados con mezcla de biochar y EC pero el uso de B300 y EC incrementa el crecimiento de la planta (Figura II- 17).

Figura II- 17. Biomasa vegetal de *Brassica napus* en P2. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Estudios realizados por Herrero et al. (2003), demuestran la disminución de la producción de biomasa vegetal por parte de *Brassica napus* en suelos altamente contaminados, dichos autores sustentan que el mayor peso se obtiene en las hojas de la planta, situación diferente a lo encontrado en los suelos de L32 y P2 donde los valores más altos se registran para las raíces. Aunque se ratifica la capacidad de la especie de tolerar la presencia de metales en el suelo, de hecho Purakayastha et al. (2008) encontraron que entre varias especies de *Brassica* que *Brassica napus* presenta un mayor desarrollo de las raíces en suelos contaminados. La adición de enmiendas tiene un efecto positivo en el crecimiento de la planta, observando los resultados para los suelos enmendados y de acuerdo a Houben et al. (2013) tiene que ver con el porcentaje agregado de la enmienda, en sus experimentos las plantas con un 1% de biochar murieron a las 12 semanas, al igual que las del

suelo sin tratar, mientras que en los tratamientos con 10% de biochar presentaron un crecimiento óptimo de *Brassica napus*. Esta cantidad es la misma utilizada en el presente estudio, sin embargo las macetas se obtuvieron durante ocho semanas y en el suelo sin tratar aunque el crecimiento fue menor no se llegó al punto de marchitamiento.

3.5.2. Factor de bioconcentración (BCF) y translocación de *Brassica napus*

Los BCF calculados para el Cd muestran que para el L32 la presencia del B300, B600 y EC (BCF-2 >1) no difieren del suelo sin enmienda, por el contrario la mezclas L32+B300+EC y L32+B600+EC reducen el BCF-2 y las hojas y los tallos no acumulan dicho metal. En el P2, BCF-1 sigue siendo bajo sin presentar diferencias entre los tratamientos, en comparación el BCF-2 es mayor especialmente en el P2, disminuyendo en los suelos enmendados y siendo el B600 el único material que permite exceder el límite para considerar *Brassica napus* como acumuladora (Figura II- 18).

Figura II- 18. BCF de *Brassica napus* determinado para el Cd. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

En el caso del Cu, la parte aérea de la planta no acumula el metal en el suelo L32, por el contrario las raíces de *Brassica napus* extraen el Cu aun en el suelo sin enmiendas, la adición de los biocharres y las mezclas no parece tener influencia en esta capacidad de acumulación pero la mezcla del L32 con el EC aumenta el BCF-2 a valores aproximados a 1.6. Para el otro suelo, los

BCF-2 de todos los tratamientos son mayores a 1, exceptuando el caso del P2+B300+EC siendo el promedio 0.98 ± 0.01 , el suelo sin enmiendas y P2+B600+EC tienen los valores más altos sin existir diferencias entre los dos (Figura II- 19).

Los valores de BCF-1 para el Fe en L32 son bajos y los de BCF-2 aunque son mayores no superan la barrera del 1, en el P2 el BCF-2 el promedio es de 1.05 ± 0.04 y según el estadístico de Duncan es igual al promedio obtenido en el P2+B600 siendo este de 0.99 ± 0.01 , las demás enmiendas no tienen mayor influencia en la fitoextracción por parte de *Brassica napus* (Figura II- 20). En el Pb, la retención del metal en las de hojas y tallos en L32 es casi nula y no hay diferencias con los tratamientos, en las raíces el BCF-2 es mayor pero el máximo valor registrado es de 0.96 ± 0.06 . En el caso del P2, el comportamiento es bastante evidente pues al parecer en este suelo *Brassica napus* no extrae el Pb ni en las raíces, que es lo que usualmente se evidencia a en los resultados de los otros metales (Figura II- 21). Los promedios de BCF-2 para el Zn en el L32, son mayores a 1 en todos los tratamientos, excepto en el L32+B300, no obstante el suelo sin enmendar posee un BCF-2 de 1.17 ± 0.07 mientras que en los suelos enmendados con B300, B300+EC y B600+EC son iguales o incluso menores. El BCF-2 del Zn en el P2 es igual que los suelos mezclados con los biochares (Figura II- 22). En el suelo L32 no se puede considerar *Brassica napus* como acumuladora de As, mientras que en el P2 la adición de B600 y B600+EC potencializan esta capacidad (Figura II- 23).

Figura II- 19. BCF de *Brassica napus* determinado para el Cu. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura II- 20. BCF de *Brassica napus* determinado para el Fe. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura II- 21. BCF de *Brassica napus* determinado para el Pb. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura II- 22. BCF de *Brassica napus* determinado para el Zn. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura II- 23. BCF de *Brassica napus* determinado para el As. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Los factores de translocación calculados para los diferentes tratamientos en el suelo L32 presentan los mayores valores en el Cu fluctuando entre $26.67 \pm 3.21\%$ y $40.06 \pm 2.54\%$, donde el transporte de dicho metal de las raíces a las hojas y tallos de *Brassica napus* es mayor o igual en el L32 que en las muestras L32+B600+EC y L32+EC, siendo en el resto menores. Los valores promedios de TF de metales como el Fe, Pb y As son bajos (Tabla II- 8), mientras que en el Cd los suelos enmendados, menos el B600, permiten que la planta mejore la acumulación en la parte área. En el P2, es evidente el comportamiento del Pb con datos de TF de $405.35 \pm 13.58\%$ en el suelo sin emendar, el cual disminuye al agregar enmiendas (Tabla II- 9). Se establece que el alto contenido de Pb en las hojas y tallos de la planta, sugiriendo un alta potencial de translocación por parte de la planta. En el Cd para el P2, el uso de enmiendas mejora la translocación, exceptuando el P2+B300, sin embargo en general los datos no sobrepasan el $22.44 \pm 0.28\%$. Para el Fe y As los TF no exceden el 0.50% de translocación y en el Zn el promedio máximo es de $6.45 \pm 0.23\%$ para el P2+B300+EC y el mínimo es de $1.78 \pm 0.17\%$ para el P2+B600. Por último, en el Cu la implementación de mezclas entre biochar y EC e incluso el EC por si solo incrementan la translocación, obteniendo diferencias significativas entre estos tratamientos y el suelo control (Tabla II- 9).

Tabla II- 8. TF de *Brassica napus* (%) para los tratamientos de L32.

Muestra	Cd	Cu	Fe	Pb	Zn	As
L32	$16.56 \pm 1.13b$	$40.06 \pm 2.54b$	$1.11 \pm 0.06d$	$2.06 \pm 0.85b$	$4.96 \pm 0.32b$	$1.01 \pm 0.06d$
L32+B300	$23.7 \pm 3.92d$	$30.85 \pm 2.98a$	$0.54 \pm 0.04b$	$0.56 \pm 0.04a$	$6.57 \pm 0.99a$	$0.42 \pm 0.03a,b$
L32+B600	$8.58 \pm 0.45a$	$26.67 \pm 3.21a$	$0.75 \pm 0.04c$	$1.06 \pm 0.12a$	$3.51 \pm 0.32d$	$0.81 \pm 0.07c$
L32+B300+EC	$20.97 \pm 2.52c,d$	$31.44 \pm 5.77a$	$0.35 \pm 0.04a$	$0.36 \pm 0.04a$	$7.14 \pm 0.61c,d$	$0.51 \pm 0.04b$
L32+B600+EC	$19.5 \pm 0.99b,c$	$32.43 \pm 4.33a,b$	$0.4 \pm 0a$	$0.37 \pm 0.06a$	$6.05 \pm 0.37c$	$0.35 \pm 0.01a$
L32+EC	$22.1 \pm 1.19c,d$	$34.89 \pm 3.52a,b$	$0.39 \pm 0.04a$	$0.31 \pm 0.03a$	$6.57 \pm 0.57c,d$	$0.37 \pm 0.05a$

Tabla II- 9. TF de *Brassica napus* (%) para los tratamientos de P2.

Muestra	Cd	Cu	Fe	Pb	Zn	As
P2	$14.16 \pm 0.76b$	$7.18 \pm 0.72b$	$0.48 \pm 0.02d$	$405.35 \pm 13.58d$	$3.77 \pm 0.2b$	$0.26 \pm 0.02a$
P2+B300	$19.67 \pm 0.99d$	$9.61 \pm 0.52c$	$0.38 \pm 0.02b,c$	$118.64 \pm 2.25a$	$5.28 \pm 0.24c$	$0.27 \pm 0.02a$
P2+B600	$7.34 \pm 0.57a$	$5.08 \pm 0.2a$	$0.26 \pm 0.03a$	$144.53 \pm 6.12a,b$	$1.78 \pm 0.17a$	$0.28 \pm 0.03a$
P2+B300+EC	$18.84 \pm 0.13d$	$12.28 \pm 0.41d$	$0.33 \pm 0.04b$	$157.22 \pm 15.12a,b$	$6.45 \pm 0.23d$	$0.31 \pm 0.03a$
P2+B600+EC	$17.11 \pm 0.47c$	$12.83 \pm 0.61d$	$0.39 \pm 0.02b,c$	$242.95 \pm 41.37c$	$4.98 \pm 0.14c$	$0.31 \pm 0.06a$
P2+EC	$22.44 \pm 0.28e$	$12.53 \pm 0.33d$	$0.44 \pm 0.03c,d$	$182.17 \pm 4.28b$	$6.9 \pm 0.09e$	$0.25 \pm 0a$

Los resultados obtenidos para los BCF y TF de los metales permiten evidenciar la acumulación de los mismos en las raíces de *Brassica napus*, exceptuando el caso del Pb para el suelo P2, del cual se hará mención más adelante. Este resultado concuerda con lo reportado por Turan & Esringü (2007) donde la mayor concentración de Cd, Cu, Pb y As se presentó en las raíces en lugar de la parte superior de la planta. De igual forma la poca afinidad de la planta hacia el As, registrada en la concentración del metal en el suelo con crecimiento de *Brassica napus* (Figura II-15k), en el BCF-1 y BCF-2 de la planta (Figura II- 23) y en el TF (Tabla II- 8 y Tabla II- 9), ha sido reportada en otras investigaciones por (Dhiman et al., 2016), quienes sustentan que para un total de seis metales, el As obtuvo menores valores de acumulación.

Según Hernández-Allica et al. (2008), existen concentraciones de Cd, Zn y Pb en el tejido vegetal, que producen la inhibición de aproximadamente el 100% del crecimiento de *Brassica napus*, siendo en el caso del Cd de 92 mg kg⁻¹ con un porcentaje de inhibición del 108%, para el Zn es de 10916 mg kg⁻¹ con un 93% y para el Pb de 328 mg kg⁻¹ con un 99% de inhibición. Estos valores no se alcanzaron en ninguno de los metales para el presente estudio, pues para las hojas y tallos se reportan rangos de 0.83 a 2.45 mg kg⁻¹ para el Cd, 150.32 a 319.29 mg kg⁻¹ para el Zn y 4.98 a 59.62 mg kg⁻¹ para el Pb en el suelo L32, mientras que en el suelo P2 los promedios fluctuaron entre 0.95 a 2.38 mg kg⁻¹ para el Cd, 111.28 a 354.54 mg kg⁻¹ para el Zn y 16.13 a 97.85 mg kg⁻¹ para el Pb, permitiendo evidenciar crecimiento en todos los tratamientos.

Los BCF varían de acuerdo a cada metal y tratamiento aplicado, siendo en varias ocasiones superiores a 1, lo que permite considerar a *Brassica napus* como una especie potencialmente acumuladora además de resistente. No obstante, la capacidad de fitoextracción de esta especie puede verse afectada por los efectos sinérgicos de la presencia de varios metales (Houben et al., 2013). En la literatura revisada (Angelova et al., 2008), se establece que los factores principales para la asimilación de metales por parte de la colza son la concentración de cada metal de forma independiente y la influencia de la combinación de varios metales, como es el caso de los suelos mineros estudiados (L32 y P2).

El comportamiento del Pb en el suelo P2 específicamente, es atípico en comparación a los otros metales pero permite establecer la translocación de las raíces a las hojas y tallos, resultando en altos TF. No obstante cotejando dichos valores y el contenido de Pb total en el suelo, la cantidad que extrae *Brassica napus* no es suficiente para la dimensión de contaminación de suelo, por ende

los valores de BCF son bajos. Otros autores también han reportado la eficiencia de remoción de Pb de la colza (Dhiman et al., 2016).

3.5.3. Porcentajes de extracción de metales de *Brassica napus*

La Figura II- 24 representa los porcentajes de extracción de metales de *Brassica napus* para los suelos emendados de L32. El Zn y Cd fueron los únicos metales con mayores porcentajes de acumulación en los suelos enmendados en las hojas y tallos de la planta. Particularmente en el Zn los valores se encuentran entre el 20-40% de extracción en las muestras L32+EC, L32+B300+EC, L32+B300. El Cd en la muestra L32+EC tiene un valor aproximado de 20% mientras que en L32+B300 es de 30%. En el resto de metales, As, Pb, Fe y Cu, las concentraciones de metales en hojas y tallos son menores en los suelos enmendados que en el suelo testigo.

La Figura II- 25 muestra los porcentajes de extracción de metales de *Brassica napus* para los suelos emendados de P2. Las hojas y tallos de la planta acumulan un aproximado del 40%, en comparación al control, del Zn y Cu, específicamente con las muestras P2+EC, P2+B300+EC y P2+B600+EC, estableciendo que el EC mejora la acumulación de dichos metales. En los otros metales los porcentajes de extracción son negativos para todos los suelos enmendados, concluyendo que la acumulación del metal es mayor en el suelo testigo.

Las Figura II- 26 y Figura II- 27 establecen los porcentajes de extracción de metales por parte de las raíces de *Brassica napus* en los suelos L32 y P2 respectivamente. En el suelos L32, el único metal con acumulación mayor a la del suelo control, fue el Cu, en donde en la muestra L30+EC el porcentaje de extracción es superior al 20%, mientras que en L32+B600+EC y L32+B300 el valor es menor al 10%. El As, Zn, Pb, Fe y Cd tiene valores de extracción negativos en los suelos enmendados de L32. Las raíces en P2 enmendados tiene concentraciones de metales menores que en el suelo testigo.

A nivel general en los suelos L32 y P2 los metales acumulados ya sea en la parte aérea de *Brassica napus* o en las raíces fueron el Zn, Cd y Cu. No obstante en todos los casos el porcentaje no superó el 60%. Las mezclas de suelo con enmiendas no parecen favorecer la extracción si se coteja con el suelo sin enmiendas.

Figura II- 24. Valores porcentaje de extracción de metales en hojas y tallos de *Brassica napus* en los tratamientos de L32.

Figura II- 25. Valores porcentaje de extracción de metales en hojas y tallos de *Brassica napus* en los tratamientos de P2.

Figura II- 26. Valores porcentaje de extracción de metales en raíces de *Brassica napus* en los tratamientos de L32.

Figura II- 27. Valores porcentaje de extracción de metales en raíces de *Brassica napus* en los tratamientos de P2.

3.6. Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de *Sinapis alba* en el pH, CE y las propiedades biológicas de los suelos

El pH de los suelos posterior a los meses de crecimiento de la planta se registró para los dos suelos (Figura II- 28), en el caso del L32 el pH es menor en el suelo sin planta que en el suelo con *Sinapis alba*. La adición enmiendas mejora esta variable y en los tratamientos L32+B300+EC y L32+B600+EC no existen diferencias estadísticamente significativas entre los suelos con o sin planta, mientras que en el L32+B600 el pH es mayor en el suelo enmendado en ausencia de la mostaza (Figura II- 28a). Todos los valores de pH para los suelos enmendados y el suelo control son superiores a 7 y el efecto encalante al adicionar biochar se hace evidente. En P2, el suelo sin enmienda posee un promedio de pH menor a los suelos enmendados y si hay diferencias en el P2 con y sin *Sinapis alba*. En los suelos con la adición de biochares y mezclas de biochares y EC, la presencia de la mostaza disminuye el pH pero dichas variaciones no representan un cambio drástico en el pH del suelo (Figura II- 28b).

La CE, tiene una tendencia clara en los dos suelos, la cual constituye el aumento de dicha propiedad al adicionar las enmiendas, en el L32 en las muestras L32+B300, L32+B600 y L32+B600+EC la conductividad es mayor en dichos suelos enmendados sin crecimiento de la especie vegetal pero, en el L32+B300+EC sucede lo contrario siendo el promedio de CE mayor en la combinación de suelo + enmienda + *Sinapis alba* (Figura II- 29a). La CE entre los suelos varía claramente siendo mayores los valores de L32 que de P2, no obstante en P2 la mezcla con biochares, mezclas y EC incrementa la CE de los suelos y se observan diferencias para cada tratamiento entre los suelos con o sin planta (Figura II- 29b).

El aumento del pH y la CE posterior al uso de biochar y el EC, ha sido ampliamente discutido en el documento, lo cual se debe al pH inicial de las enmiendas y la mejora de las propiedades de los suelos por parte del biochar (Ahmad et al., 2017; Beesley et al., 2010; Chan et al., 2008). Los coeficientes de correlación de Pearson calculados entre el pH y la CE para los suelos L32 y P2 con y sin *Sinapis alba* muestran una relación positiva entre las dos variables. Los R^2 y coeficientes son mayores para los controles ($P=0.83$; $R^2=0.69$ para L32 y P2) en comparación a los suelos con la planta ($P=0.59$; $R^2=0.35$ para L32 y $P=0.71$; $R^2=0.50$ para P2).

Figura II- 28. pH en los suelos control y con *Sinapis alba*: a. L32 y b. P2. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura II- 29. CE (dS m^{-1}) en los suelos control y con *Sinapis alba*: a. L32 y b. P2. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

La actividad de la fosfomonoesterasa difiere en cada suelo, para el L32 se observa que en el suelo sin enmiendas la cantidad de enzima es mayor en el suelo sin planta, a partir de esto todos los suelos enmendados poseen igual o mayor actividad que el L32, excluyendo L32+B600. El L32 mezclado con el B300, EL B300+EC y el EC registra aumento en la fosfomonoesterasa en los suelos con crecimiento de *Sinapis alba* y en L32+B600+EC sucede lo contrario (Figura II- 30a). En P2 la enzima es más alta en L32+*Sinapis alba* que en el L32 solo, los tratamientos con biochar, mezclas y estiércol incrementan la actividad enzimática, exceptuando nuevamente el caso del B600. Los mejores resultados se obtuvieron en la mezcla con el EC (Figura II- 30b).

En la β -glucosidasa, el mayor promedio se observó en la muestra L32+EC con un claro descenso cuando este tratamiento se combina con el crecimiento de *Sinapis alba*. Aunque con el EC los valores son cercanos a los $4 \mu\text{mol g h}^{-1}$, todos los tratamientos tienen mayor actividad y por ende muestran diferencias significativas con el L32, sin incluir el L32+B600 que es igual o menor (Figura II- 31a). En el suelo P2, la β -glucosidasa claramente aumenta en los suelos control en comparación de los suelos con mostaza, esto sucede en todos los tratamientos y comparando entre las enmiendas el B600 arroja los menores valores (Figura II- 31b).

La deshidrogenasa por su parte no fluctúa en el L32 con o sin mostaza y el tratamiento L32+B600 es estadísticamente igual con el crecimiento de *Sinapis alba*. Los suelos enmendados tienen mayor actividad y dependiendo del tratamiento la presencia de la mostaza puede aumentar o disminuir la concentración de la enzima (Figura II- 32a). Cotejando los resultados previamente descritos con los del P2 la cantidad es mayor y en el suelo testigo la presencia de la especie vegetal potencializa la deshidrogenasa, aunque a nivel de tendencia las enmiendas también incrementan en este caso la actividad, sin incluir el P2+B600 (Figura II- 32b).

La media de las tres enzimas analizadas (GMea), permite concluir que los suelos L32 enmendados con B300, B300+EC y B600+EC favorecen la actividad y no hay diferencias en estos tratamientos entre la presencia o ausencia de *Sinapis alba*, mientras que el L32+B600 posee valores promedio iguales a los del suelo sin emendar y en el L32+EC la presencia de la mostaza parece influir los datos, siendo menor el índice (Figura II- 33a). El GMea en el P2, muestra que en el P2+B600 es incluso menor que los suelos testigos y que las mezclas de suelo favorecen las enzimas pero en todos los tratamientos la presencia de *Sinapis alba* disminuye ligeramente las actividades (Figura II- 33b).

Figura II- 30. Fosfomonoesterasa con *Sinapis alba*: a. L32 y b. P2. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).

Figura II- 31. β-glucosidasa con *Sinapis alba*: a. L32 y b. P2. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).

Figura II- 32. Deshidrogenasa con *Sinapis alba*: a. L32 y b. P2. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

Figura II- 33. Índice GMea con *Sinapis alba*: a. L32 y b. P2. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

La biomasa microbiana encontrada en los suelos de L32 con *Sinapis alba* es menor en todos los tratamientos si se compara con su respectivo control, exceptuando el caso del L32+B600 que es igual con o sin planta y el tratamiento L32+EC que es mayor en L32+EC+ *Sinapis alba*. Los promedios en L32 son menores a los suelos enmendados, estableciendo el beneficio de los materiales adicionados al suelo, para el B600 como se esperaba la biomasa es baja y sin diferencias con el testigo (Figura II- 34). A diferencia de esto, en el suelo P2 el suelo testigo es el que mayor biomasa microbiana presenta pero las variaciones en las réplicas son altas y no hay diferencias entre el P2, P2+B300, P2+B300+EC y P2+EC, por lo que se puede establecer que la biomasa es igualmente alta para dichos tratamientos. El P2+B600 posee las menores biomazas y la mezcla de este biochar con el EC mejora la concentración de carbono asociado a los microorganismos del suelo (Figura II- 35).

Figura II- 34. Biomasa microbiana (C- biomasa) con *Sinapis alba* para L32. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

A partir de los resultados de las actividades enzimáticas y la biomasa microbiana se establece la clara relación entre las enzimas como sustrato para la microbiota asociada al suelo, lo cual se mide través de la biomasa microbiana. En general, el B600 es la enmienda que no produce cambios en dichas propiedades si se compara con el suelo control y esto se debe a las estructuras de carbono que se forman a mayores temperaturas de pirólisis, lo cual ha sido explicado en el

comportamiento de la biomasa con los tratamientos de *Brassica napus*. Para las dos especies se ve reflejada la misma tendencia.

Figura II- 35. Biomasa microbiana (C- biomasa) con *Sinapis alba* para P2. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Los efectos de la adición de materiales ricos en carbono a la biomasa microbiana se atribuyen a varios factores, entre los que se encuentran la inmovilización de los metales que a su vez potencializa el crecimiento microbiano, la fracción lábil de C aportada por el biochar como sustrato para los microorganismos y la estructura porosa de los materiales que se convierten en un hábitat para la microbiota asociada al suelo (Pukalchik et al., 2017).

3.7. Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de *Sinapis alba* en el contenido de metales en los suelos

En algunos de los metales no hay diferencias entre las concentraciones de los suelos sin enmiendas y los suelos enmendados, tal es el caso del Cd para los dos suelos (Figura II- 36 a y b), el Cu en el L32 (Figura II- 36 c), Pb en L32 (Figura II- 36 g), el Zn en los dos suelos (Figura II- 36 i y j) y el As en el L32 (Figura II- 36 k). El Cu en el P2, disminuye con el uso de enmiendas presentando diferencias estadísticamente significativas (Figura II- 36 d).

Figura II- 36. Metales totales en los suelos control y con *Sinapis alba*. a: Cd en L32, b: Cd en P2, c: Cu en L32, d: Cu en P2, e: Fe en L 32, f: Fe en P2, g: Pb en L32, h: Pb en P2, i: Zn en L32, j: Zn en P2, k: As en L32, l: As en P2.

El Fe es igual en todos los tratamientos del L32, excepto en L32+B300+ *Sinapis alba*, en el cual disminuye (Figura II- 36 e) y por el contrario en el P2 la cantidad de Fe disminuye al adicionar los biocharres y las mezclas, sin incluir el EC pues la muestra P2+EC arroja valores estadísticamente iguales a P2 (Figura II- 36 f). En el caso del Pb en el P2 disminuye al mezclar el suelo con el B300 e incluso el B300+EC funciona al reducir la concentración de metal (Figura II- 36 h). Por último, para el As en los suelos P2 enmendados se calcularon menores valores del metal, permitiendo establecer el beneficio de dichos materiales (Figura II- 36 l).

3.8. Capacidad de fitoextracción de *Sinapis alba*

3.8.1. Producción de biomasa vegetal de *Sinapis alba*

La biomasa de las hojas de *Sinapis alba*, presento diferencias entre el L32 y las mezclas de biocharres mas EC, siendo mayores los valores en el L32+B300+EC y L32+B600+EC. En los tallos, la única enmienda que parece tener incluir es el B600+EC, mientras que en las raíces no hay diferencias entre la presencia o ausencia de enmiendas. En el total de biomasa producido por la planta la tendencia es la siguiente: $L32 \leq L32+B300 = L32+B600 = L32+B300+EC = L32+EC \leq L32+B600+EC$ (Figura II- 37).

Figura II- 37. Biomasa vegetal de *Sinapis alba* en L32. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

La biomasa de *Sinapis alba* obtenida en el P2, no posee variaciones entre el suelo sin enmendar y el uso de las mezclas y el EC, específicamente en las hojas, tallos y raíces. Por el contrario la adición de los biochares a diferentes temperaturas aumentan la producción de raíces respecto a los otros tratamientos con enmiendas pero sigue siendo igual que la producción de raíces en el P2 (Figura II- 38). Los escenarios de crecimiento de *Sinapis alba* en los dos suelos permite ratificar la tolerancia de la especie a suelos con elevadas concentraciones de metales, además de observar que los materiales agregados al suelo no tienen efectos negativos en el crecimiento de la especies como lo registrado por Zemanová et al. (2017).

Figura II- 38. Biomasa vegetal de *Sinapis alba* en P2. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

3.8.2. Factor de bioconcentración (BCF) y translocación de *Sinapis alba*

Los BCF calculados para el Cd en el L32 registran datos superiores a 1 en el L32, L32+B300, L32+ B600 y L32+EC, lo que permite establecer la capacidad de *Sinapis alba* de acumular el metal con el uso de biochares, de hecho el mayor valor se presenta en el L32+B300, siempre refiriéndose al BCF-2 determinado para las raíces, el BCF-1 no reporta promedios altos ni diferencias entre el uso de una enmienda u otra. El BCF-1 en P2 es similar siendo bajos y sin diferencias entre los suelos enmendados ni con el control, mientras que en el BCF-2 la mayoría de materiales beneficia la acumulación, sin incluir el P2+B600+EC y P2+EC (Figura II- 39).

Figura II- 39. BCF de *Sinapis alba* determinado para el Cd. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Para el Cu la fitoextracción por parte de *Sinapis alba* tiene resultados beneficiosos en el suelo sin enmendar P2, con un promedio de 4.09 ± 0.28 para el BCF-2, el cual disminuye notoriamente con el uso de enmiendas, a diferencia de esto, en el L32 todos los tratamientos permiten considerar la mostaza como acumuladora de Cu ($BCF-2 > 1$) obteniendo el mejor resultado en L32+B300. En el L32 y el P2 la translocación del metal de las raíces a los tallos y hojas es baja y no difiere entre enmiendas en el P2 y en el L32 es incluso menor el BCF-1 en los suelos enmendados que en el suelo testigo (Figura II- 40).

Los BCF-2 del Fe son mayores en las muestras L32+B300 y L32+B600 y disminuye en los otros tratamientos. Respecto al BCF-1 las concentraciones son casi nulas en la parte aérea de la planta y esto se repite en los dos suelos. En el P2 el único escenario que favorece la acumulación es el P2+B300 con un promedio 1.04 ± 0.13 (Figura II- 41). La extracción de Pb difiere ampliamente en los dos suelos, en L32 el promedio más alto de BCF-2 se reporta para L32+B300, seguido del L32 y los demás suelos enmendados no supera el 1. Pero en el P2 los dos BCF-1 se encuentran por debajo de los 0.2 y no hay grandes variaciones entre enmiendas (Figura II- 42).

En el Zn la acumulación del metal no se da en las hojas ni tallos de la planta ($BCF-1 < 0.2$) y cotejando los datos en el L32 se establece el aumento del BCF-2 en el tratamiento L32+B300, el

L32+B600 no tiene diferencias con el L32 y la mezclas de biochar y EC disminuyen esta propiedad, pero todos superan el 1. En P2 la adición de B600+EC y EC disminuye los valores de BCF-2 mientras que en el resto de suelos enmendados son mayores a 1 pero no hay diferencias entre ellos (Figura II- 43).

Figura II- 40. BCF de *Sinapis alba* determinado para el Cu. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura II- 41. BCF de *Sinapis alba* determinado para el Fe. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura II- 42. BCF de *Sinapis alba* determinado para el Pb. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura II- 43. BCF de *Sinapis alba* determinado para el Zn. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

La bioconcentración de As en las raíces de *Sinapis alba* permite establecer que la mezcla del suelo L32 con el B300 arroja el mayor promedio siendo significativamente diferente con el suelo testigo, por otro lado el L32+B600 y L32+EC no muestra diferencias y las mezclas disminuyen los valores de BCF-2. En el P2, el dato más alto se da en el P2+B600 y en ninguno de

los suelos las hojas y tallos presentan promedios significativos o diferentes entre tratamientos (Figura II- 44).

Figura II- 44. BCF de *Sinapis alba* determinado para el As. Los valores con la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Los factores de translocación permiten asociar la cantidad de metal acumulado en las hojas y tallos versus la concentración en las raíces y de esta manera conocer de lo extraído que proporción se va a la parte superior de la planta. Bajo este supuesto, los metales con mayor TF para el suelo L32 son el Cd y el Cu, por el contrario en el Fe, Pb, Zn y As los porcentajes son bajos (Tabla II- 10). En el P2, son evidentes los altos promedios para el Pb lo que establece una alta concentración del metal en las hojas y tallos de *Sinapis alba* (Tabla II- 11). No obstante, en el análisis de esta variable es importante aclarar que para la determinación del TF no se considera el contenido del metal en el suelo y se basa solo en el contenido del metal en el tejido vegetal.

Tabla II- 10. TF de *Sinapis alba* (%) para los tratamientos de L32.

Muestra	Cd	Cu	Fe	Pb	Zn	As
L32	20.04 ± 0.65b,c	37.89 ± 0.66d	2.3 ± 0.24c	2.08 ± 0.23e	7.07 ± 0.97b	4.26 ± 0.51d
L32+B300	18.2 ± 0.02b	27.41 ± 0.74b	1.56 ± 0.04b	1.65 ± 0.08d	8.61 ± 0.4b,c	1.51 ± 0b
L32+B600	9.43 ± 0.29a	19.78 ± 2.22a	1.49 ± 0.41b	1.4 ± 0.05c	4.48 ± 1.28a	1.19 ± 0.1b
L32+B300+EC	21.31 ± 2.2c	33.74 ± 1.25c	1.23 ± 0.5b	0.97 ± 0.08b	9.11 ± 2.09c	0.51 ± 0.11a
L32+B600+EC	20.95 ± 0.47b,c	32.93 ± 2.94c	0.65 ± 0.06a	0.62 ± 0.02a	8.69 ± 1.05c	0.5 ± 0a
L32+EC	18.02 ± 0.76b	23.41 ± 0.34a	1.8 ± 0.11b,c	1.63 ± 0.01c,d	9.14 ± 0.79b,c	3.3 ± 0.3c

Al analizar los valores de BCF y TF se debe tener en cuenta las concentraciones de los metales en los suelos y en el caso del Pb lo que sucede es que si existe un proceso de extracción por parte de *Sinapis alba* que incluye la translocación hacia la parte superior pero la concentración del Pb en los suelos es del orden de 24830 mg kg^{-1} , mientras la concentración en hojas y tallos es de 274 mg kg^{-1} .

Tabla II- 11. TF de *Sinapis alba* (%) para los tratamientos de P2.

Muestra	Cd	Cu	Fe	Pb	Zn	As
P2	$22.23 \pm 0.84b$	$2.88 \pm 0.27a$	$0.93 \pm 0.07c$	$805.89 \pm 6.75b$	$7.49 \pm 0.6d$	$0.73 \pm 0.04a$
P2+B300	$14.82 \pm 0.93a$	$8.32 \pm 0.22c$	$0.7 \pm 0.1b$	$829.61 \pm 5.6b$	$6.41 \pm 0.45c$	$0.63 \pm 0.02a$
P2+B600	$13.27 \pm 0.59a$	$6.31 \pm 0.04b$	$1.09 \pm 0.01d$	$752.63 \pm 39.38b$	$4.75 \pm 0.53a$	$0.84 \pm 0.05a$
P2+B300+EC	$13.48 \pm 0.81a$	$10.35 \pm 0.13e$	$2.3 \pm 0.04e$	$1532.65 \pm 67.89c$	$6.22 \pm 0.81c$	$3.54 \pm 0.66b$
P2+B600+EC	$14.9 \pm 0.77a$	$10.26 \pm 0.12e$	$1.1 \pm 0.07d$	$824.61 \pm 88.13b$	$5.99 \pm 0.68c$	$1.15 \pm 0.21a$
P2+EC	$13.57 \pm 0.46a$	$9.5 \pm 0.51d$	$0.54 \pm 0.05a$	$380.96 \pm 15.54a$	$5.38 \pm 0.48b$	$0.66 \pm 0a$

3.8.3. Porcentajes de extracción de metales de *Sinapis alba*

La Figura II- 45 contiene los porcentajes de extracción para las hojas y tallos de *Sinapis alba* en el suelo L32. El Zn es el único metal con valores positivos en las muestras L32+EC, L32+B300+EC y L32+B300, mientras que los otros metales presentan porcentajes de extracción negativos con respecto al testigo. La Figura II- 46 muestra los valores para el suelo P2. En este caso, el tratamiento, P2+B300+EC es el que presenta porcentajes de extracción más altos para el As, Pb, Fe, Cu. Para el As, el porcentaje de extracción fue del 307.8%, mientras que para el Pb, Fe, Cu fue de 101.77%, 130.11% y 52.70% respectivamente.

La Figura II- 47 representa los porcentajes de extracción para las raíces de *Sinapis alba* en los suelos enmendados de L32, mientras la Figura II- 48 referencia los de P2. En L32, las raíces no contienen concentraciones superiores a las encontradas en el suelo sin enmendar, por eso la presencia de porcentajes negativos en la mayoría de metales, exceptuando el caso del Cu en tres de los suelos enmendados: L32+EC, L32+B300+EC y L32+B300. En P2, los datos positivos corresponden a metales y tratamientos específicos. El As en P2+B600 tiene un 17.19% mientras que las otras enmiendas tienen valores negativos. El Pb posee porcentajes de 3.01% y 7.32% para los tratamientos P2+B600 y P2+B300+EC. Por último, el Cd tiene su único porcentaje positivo en el tratamiento P2+B300+EC con un 6.92%.

Figura II- 45. Valores porcentaje de extracción de metales en hojas y tallos de *Sinapis alba* en los tratamientos de L32.

Figura II- 46. Valores porcentaje de extracción de metales en hojas y tallos de *Sinapis alba* en los tratamientos de P2.

Figura II- 47. Valores porcentaje de extracción de metales en raíces de *Sinapis alba* en los tratamientos de L32.

Figura II- 48. Valores porcentaje de extracción de metales en raíces de *Sinapis alba* en los tratamientos de P2.

4. CONCLUSIONES

- La caracterización de los materiales permitió evidenciar la influencia de la temperatura de pirólisis en las propiedades de los biocharres, lo cual interviene directamente en las propiedades de los suelos al ser mezclados. Puntualizando el caso del contenido en carbono que disminuye significativamente al incrementar la temperatura. En este mismo sentido la materia volátil se reduce y esto implica cambios en propiedades biológicas como la microbiota asociada al suelo, como se discute en los resultados obtenidos para la biomasa microbiana.
- Uno de los aspectos que suele influir en la concentración de metales en los suelos enmendados es el pH, en el presente estudio no se vieron mayores variaciones en esta variable y se debe al pH inicial de las enmiendas y al pH inicial de los suelos los cuales no llegan en ningún momento a ser considerados ácidos, en las enmiendas se tienen pH por encima de 8, mientras en los suelos se acercan a la neutralidad.
- A nivel general para los especies se observa que las actividades enzimáticas y la biomasa microbiana se encuentran directamente relacionadas, considerando que las enzimas corresponden al sustrato disponible para los microorganismos del suelo. Por ende los resultados encontrados con la adición del biochar de estiércol de conejo producido a 600 °C se repiten a lo largo de las diferentes enzimas y en el carbono asociado a la biomasa, con valores iguales a los de los suelos sin enmendar e incluso menores en ciertos escenarios. Esto se debe a que a mayor temperatura de pirólisis, existe menor contenido de carbono disponible para los microorganismos.
- La concentración de metales en el suelo permite evidenciar en algunos casos los beneficios del uso de biocharres, biocharres mezclados con estiércol de conejo y estiércol de conejo para reducir la concentración de metales en los suelos, sin embargo en ciertos escenarios no hay diferencias estadísticamente significativas con los suelos sin enmendar, aunque en ninguno de los metales se observa que las enmiendas adicionen contenido a los suelos. La ligera disminución de la concentración de metales en los suelos enmendados se puede dar por el alto contenido de metales inicial y por el efecto sinérgico de los mismos.
- Las especies *Sinapis alba* y *Brassica napus* pueden ser consideradas como organismos tolerantes a altas concentraciones de metales, como es el caso de la presa minera Lodo 32

y del suelo minero Portmán 2, sin embargo la capacidad de fitoextracción depende del metal y no en todos los escenarios las enmiendas potencializan dicha acumulación.

- La determinación de los factores de bioconcentración y translocación permiten dar una idea de la capacidad fitoextractora de las especies, sin embargo en el análisis se debe integrar la concentración de metales en los suelos debido a que la planta puede extraer el metal pero dicha acumulación puede que no sea significativa en la concentración total del metal en el suelo.

**CAPÍTULO III: EFECTOS DE LA ADICIÓN DE GALLINAZA Y CARBÓN
VEGETAL Y COMBINACIÓN CON LA FITOEXTRACCIÓN EN LAS
PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE PRESAS MINERAS DEL
ÁREA DE RIOTINTO**

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo general

Analizar los efectos de la adición de carbón vegetal y gallinaza y de su combinación con la fitoextracción (*Brassica napus* y *Sinapis alba*) en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de tres represas mineras del área de Riotinto (Andalucía) así como en la extracción de metales en los suelos seleccionados.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar las propiedades fisicoquímicas de las enmiendas orgánicas: carbón vegetal y gallinaza.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas de las represas mineras de Riotinto: RI-II, RIII y RIIS.
- Evaluar el efecto de la adición de enmiendas y combinación con la fitoextracción en el pH, conductividad eléctrica (CE) y propiedades biológicas de los suelos (actividades enzimáticas y biomasa microbiana).
- Evaluar el efecto de la adición de enmiendas y de su combinación con la fitoextracción en el contenido en metales de los suelos.
- Analizar la capacidad de fitoextracción (factor de bioconcentración y translocación) y producción de biomasa de *Brassica napus* y *Sinapis alba* en los suelos testigos y enmendados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección de los suelos

Los suelos seleccionados corresponden al muestreo realizado en el marco del proyecto “Tratamiento de suelos contaminados por metales mediante combinación de técnicas de fitorremediación con adición de biochar (CGL2014-58322-R)” del programa Retos 2014. De las muestras obtenidas se seleccionaron dos represas de residuos mineros y un suelo aledaño a dichos depósitos, ubicados en el área de Zarandas, municipio de minas de Riotinto en Huelva, perteneciente a la comunidad autónoma de Andalucía. La primera represa se encuentra ubicada en la Latitud: $37^{\circ} 40' 36.8868''$ N y Longitud: $6^{\circ} 34' 04.0657''$ O y se reconoce en el marco del proyecto como Represa I-II (RI-II), la segunda se identifica como Represa III (RIII), ubicada en la Latitud: $37^{\circ} 40' 26.2776''$ N y Longitud: $6^{\circ} 34' 05.6150''$ O y el suelo adyacente a la RIII, identificado como Represa III suelo (RIIS) localizado en la Latitud: $37^{\circ} 40' 26.6412''$ N y Longitud: $6^{\circ} 34' 25.3205''$ O.

Figura III- 1. Zonas de muestreo correspondientes al área de Riotinto: Represa I-II (RI-II), Represa III (RIII) y Represa III suelo (RIIS).

2.2. Selección enmiendas

El residuo ganadero utilizado corresponde a la gallinaza (G) obtenido de los campos de prácticas de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas (ETSIAAB) perteneciente a la Universidad Politécnica de Madrid (UPM). Este material se sometió a secado al aire durante un mes y luego su posterior tamizaje por una luz de paso de 2 mm. Por su parte, el carbón vegetal (CV) se adquirió a partir de carbón de barbacoa comercial, el cual fue macerado y tamizado. Adicionalmente se realizó la mezcla de los dos materiales en una proporción 1:1 (G+CV).

2.3. Selección especies para fitoextracción

Las especies utilizadas para los ensayos de fitoextracción son las mismas utilizadas en los anteriores experimentos: *Brassica napus* y *Sinapis alba*, basándose en los fundamentos de selección anteriormente expuestos.

2.4. Caracterización de materiales

Los materiales fueron ampliamente caracterizados según los procesos ya descritos en los primeros capítulos del presente documento, obteniendo las propiedades fisicoquímicas de las enmiendas, así como el análisis elemental, inmediato y termogravimétrico.

2.5. Experimentos de fitoextracción: realización de las mezclas suelo–enmiendas y montaje de experimentos

Inicialmente se llevó a cabo el montaje de cada una de las macetas con una capa de grava de 70 g en todos los casos. Seguido de 180 g de la correspondiente mezcla. Las mezclas se realizaron con 10% de enmienda y 90% de suelo, teniendo en cuenta que en el suelo testigo no se adicionó ninguna enmienda. Para el caso de las mezclas de gallinaza y carbón vegetal, el porcentaje fue de 5% de G y 5% de CV. Resultando en un total de cuatro tratamientos por suelo, considerando el suelo testigo y la mezclas de suelo con cada enmienda, como se muestra en la Tabla III- 1. Para los tratamientos de fitoextracción, se utilizaron 10 semillas para cada maceta y cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado. De igual forma se efectuó el montaje de los suelos control, es decir, las mismas mezclas pero sin semillas. Todos los tratamientos se llevaron a capacidad de campo y se determinó el peso inicial de las macetas con esta humedad. El total de las macetas se

mantuvieron durante un mes y medio en una incubadora a 20 °C con ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. El peso inicial se alcanzó diariamente mediante riego con agua destilada.

Tabla III- 1. Mezclas utilizadas para el montaje de experimentos. G: gallinaza, CV: carbón vegetal, C: colza, M: Mostaza, R: Riotinto.

RI-II					
Muestras Colza	Suelo (g)	Enmienda (g)	Muestras Mostaza	Suelo (g)	Enmienda (g)
RI-II+C	180	-	RI-II+M	180	-
RI-II+G+C	162	18g G	RI-II+G+M	162	18g G
RI-II+CV+C	162	18g CV	RI-II+CV+M	162	18g CV
RI-II+G+CV+C	180	9g G/9g CV	RI-II+ G+CV+M	180	9g G/9g CV
RIII					
Muestras Colza	Suelo (g)	Enmienda (g)	Muestras Mostaza	Suelo (g)	Enmienda (g)
RIII+C	180	-	RIII+M	180	-
RIII+G+C	162	18g G	RIII+G+M	162	18g G
RIII+CV+C	162	18g CV	RIII+CV+M	162	18g CV
RIII+G+CV+C	180	9g G/9g CV	RIII+ G+CV+M	180	9g G/9g CV
RIIS					
Muestras Colza	Suelo (g)	Enmienda (g)	Muestras Mostaza	Suelo (g)	Enmienda (g)
RIIS+C	180	-	RIIS+M	180	-
RIIS+G+C	162	18g G	RIIS+G+M	162	18g G
RIIS+CV+C	162	18g CV	RIIS+CV+M	162	18g CV
RIIS+G+CV+C	180	9g G/9g CV	RIIS+ G+CV+M	180	9g G/9g CV

2.6. Caracterización de las muestras posterior a la incubación

Posterior al tiempo de incubación, se determinaron las propiedades biológicas de los suelos control y enmendados, específicamente las actividades enzimáticas y biomasa microbiana, así como el pH y CE de los mismos. La concentración de metales totales se midió en los suelos y en el tejido vegetal (hojas, tallos y raíces) resultando en el cálculo de los factores de bioconcentración (BCF) y translocación (TF). La caracterización se efectuó siguiendo los protocolos mencionados en el capítulo I.

2.7. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas se determinaron por el estadístico de Duncan con un ANOVA, igual que los primeros experimentos y con el software STATGRAPHICS Centurion XVI.II.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de materiales

La Tabla III- 2 muestra las propiedades de los materiales de partida G y CV. En donde, los valores de pH son alcalinos. El valor promedio de pH para la G es de 9.01 ± 0.25 , al comparar estos resultados con otras investigaciones se evidencia un amplio rango de pH reportado, con valores de 7.07 (Sonia y Nora, 2002), 7.8 (Mokolobate y Haynes, 2002), 8.2 (Cantrell et al., 2012) y 9.64 (Dias et al., 2010), no obstante no se registran pH ácidos para dicho residuo, por lo cual, la gallinaza se convierte en una opción viable para el tratamiento de suelos ácidos (Mokolobate y Haynes, 2002). De igual forma, sucede con el carbón vegetal que presenta un pH de 9.49 ± 0.03 , siguiendo la tendencia descrita a lo largo del documento para los biocharres. La CE, por su parte es mayor en la G que en el CV y respecto al C_{oxi} se destaca el alto porcentaje en la G coincidiendo con lo encontrado por otros autores (Dias et al., 2010).

Tabla III- 2. Propiedades físicas y químicas de los materiales de partida gallinaza (G) y carbón vegetal (CV). CE: conductividad eléctrica, C_{oxi} : carbono orgánico fácilmente oxidable, C_{sol} : carbono soluble, CIC: capacidad de intercambio catiónico, Polsen: fósforo Olsen, MV: materia volátil, CF: carbono fijo. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p=0.05$).

	G	CV
pH	$9.01 \pm 0.25a$	$9.49 \pm 0.03b$
CE ($dS\ m^{-1}$)	$0.44 \pm 0.06a$	$0.23 \pm 0.04b$
C_{oxi} (%)	$12.9 \pm 0.2b$	$4.82 \pm 0.77a$
C_{sol} (%)	1.16 ± 0.10	-
CIC($cmol_c\ kg^{-1}$)	$90 \pm 1b$	$13.54 \pm 0.40a$
Polsen ($g\ kg^{-1}$)	$3.21 \pm 0.39b$	$1.82 \pm 0.14a$
K ($cmol_c\ kg^{-1}$)	$12.66 \pm 0.74b$	$1.81 \pm 0.04a$
Cenizas (%)	48.26	17.7
MV (%)	36.46	9.7
CF (%)	15.28	72.6
CF/(MV+FC)	0.29	0.82

La CIC, el contenido de P biodisponible y de K son mayores en la G que en el CV. En este caso es evidente que la gallinaza se convierte en una enmienda de gran importancia en los suelos para efectos agrícolas, según Bolan et al. (2010) este material puede aportar cantidades considerables de los nutrientes esenciales para las plantas (N, P y K), además de aportar nutrientes secundarios como el Ca, Mg y S.

El contenido de nutrientes de la gallinaza proveniente de las gallinas de engorde y las ponedoras puede variar según sea el compuesto, se ha recopilado información en donde se especifica que la cantidad de P varía entre 6.7 y 10.8 g kg⁻¹ mientras el K puede ser entre 10.1 y 15.2 g kg⁻¹. El P en la gallinaza se dice que es mayormente orgánico y puede oscilar entre 0.3 y 2.4% dependiendo de la dieta del animal y los materiales de la cama. El análisis inmediato de los materiales, permite establecer la dominancia de la MV en la G y del CF en el CV, siendo el CV una enmienda térmicamente más estable según el CF/(MV+FC). De acuerdo a esta premisa se puede establecer que el CV es un material estable y rico en carbono (Calvelo Pereira et al., 2011) mientras que la G es más degradable (Song y Guo, 2012).

La Tabla III- 3 contiene la concentración de As, Fe, Pb y P total de la G y CV. En este punto se resalta los altos aportes de Fe y P por parte de la G. Los metales son menores en el CV que en la G. El contenido de P total y de Pb, ya han sido reportados por otros autores para la gallinaza y se asemejan a lo encontrado en el presente estudio, con valores de P total de 13.2 ± 0.36 g kg⁻¹ y de Pb de 2.02 ± 0.20 mg kg⁻¹ (Mierzwa-Hersztek et al., 2016). La legislación referente al uso de fertilizantes en el suelo y la concentración de metales no incluye límites para el As pero en el caso del Pb, la G y CV hacen parte de grupo A (MPR, 2013), asimismo en la normativa de sustratos de cultivo (MPR, 2010).

Los metales presentes en los residuos de animales, es un factor determinante al ser considerados como enmiendas en suelos, la fuente de estos compuestos viene de la dieta de los animales, teniendo en cuenta que las adiciones se realizan a través de suplementos para mejorar la salud y la eficiencia en la alimentación, en general mejorar la producción (Bolan et al., 2010). El origen del CV puede establecer dicho material como una enmienda más segura, no obstante según la legislación los materiales no exceden los límites permitidos. A partir de este análisis, se considera la necesidad de definir rangos de concentración de metales pesados específicamente para

enmiendas orgánicas como el caso de los residuos ganaderos, biocharres, hidrocharres, carbón vegetal, entre otros.

Tabla III- 3. Metales totales y fósforo total de los materiales de partida gallinaza (G) y carbón vegetal (CV). Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Muestras	As mg kg ⁻¹	Fe mg kg ⁻¹	P mg kg ⁻¹	Pb mg kg ⁻¹
G	1.57 ± 0b	2459.94 ± 223.28b	19914.12 ± 62.34b	1.89 ± 0.07b
CV	0.23 ± 0.01a	118.68 ± 1.66a	356.54 ± 3.44a	0.88 ± 0.03a

La Tabla III- 4 contiene el análisis elemental de la G y CV, en donde el CV está compuesto en su mayoría por C con 86% mientras que en la G el porcentaje es menor, siendo este de 33.79%. Se determinó también un significativo % O con 10.87%, luego se tiene en menor medida porcentajes de N y H. En cuanto a las relaciones atómicas, el H/C es mayor que el O/C debido a lo expuesto anteriormente sobre el contenido de C y O.

Tabla III- 4. Análisis elemental de los materiales de partida gallinaza (G) y carbón vegetal (CV).

Muestras	%C	%H	%N	%S	%O	H/C	O/C
G	33.79	4.55	2.06	0.47	10.87	1.62	0.24
CV	86.0	-	0.84	-	-	-	-

3.2. Caracterización inicial de los suelos

La Tabla III- 5 muestra las propiedades fisicoquímicas de los suelos RI-II, RIII y RIIS. La textura de los suelos es franca y franco arenosa. Los valores de pH no superan los 4.68, siendo entonces suelos ácidos. No existen diferencias estadísticamente significativas en la CE entre RIII y RIIS, no obstante el suelo RI-II tiene mayor CE. El contenido de C_{oxi} es menor en los RI-II y RIII que en el RIIS, sin embargo este promedio no es muy alto ($1.34 \pm 0.03\%$).

La CIC varía entre los suelos, el mayor se registra para el RIIS y en cuanto al contenido de Na y K, la concentración es baja. El fósforo total extraído a partir de digestión ácida difiere entre las presas (RI-II y RIII) y el suelo aledaño (RIIS), siendo mucho menor en las primeras. Por el contrario, el contenido de Fe total es mayor en RI-II y RIII fluctuando entre 74.57 ± 0.48 y 83.99

$\pm 2.97 \text{ g kg}^{-1}$ mientras en el RIIS es menor de 50 kg g^{-1} . El contenido de metales como el As y Pb disminuye en el RIIS en comparación con el RI-II y RIII (Tabla III- 5).

Tabla III- 5. Propiedades fisicoquímicas de la caracterización inicial de los suelos del área de Riotinto. RI-II: represa Riotinto I-II, RIII: represa Riotinto III, RIIS: suelo Riotinto aledaño a la represa III. CE: conductividad eléctrica, C_{oxi} : carbono orgánico fácilmente oxidable, CIC: capacidad de intercambio catiónico. Los valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

	RI-II	RIII	RIIS
Textura	Franco arenoso	Franco	Franco
pH	$3.63 \pm 0.01a$	$4.34 \pm 0.03b$	$4.68 \pm 0c$
CE (dS m^{-1})	$0.22 \pm 0c$	$0.09 \pm 0b$	$0.06 \pm 0a$
C_{oxi} (%)	$0.10 \pm 0.09a$	$0.22 \pm 0.01a$	$1.34 \pm 0.03b$
CIC ($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$)	$2.30 \pm 0.1a$	$3.64 \pm 0.6a$	$11.7 \pm 0.8b$
Na ($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$)	$0.24 \pm 0.09a$	$1.11 \pm 0.16b$	$1.05 \pm 0.08b$
K ($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$)	$0.23 \pm 0.02a$	$0.28 \pm 0.05a,b$	$0.30 \pm 0.02b$
P (g kg^{-1})	$0.04 \pm 0a$	$0.05 \pm 0a$	$0.56 \pm 0.01b$
Fe (g kg^{-1})	$83.99 \pm 2.97c$	$74.57 \pm 0.48b$	$47.78 \pm 0.4a$
As (mg kg^{-1})	$643.68 \pm 6.89c$	$213.17 \pm 0.31b$	$71.43 \pm 2.32a$
Pb (mg kg^{-1})	$438.27 \pm 23.57c$	$198.58 \pm 4.65b$	$95.19 \pm 1.24a$

La determinación de las propiedades iniciales de los suelos permite dar explicación a los resultados obtenidos durante los experimentos. Además, a partir de la concentración inicial de metales totales se puede considerar la contaminación del suelo, pues según la legislación los límites de contenido en metales varían de un área a otra. Como se hizo mención anteriormente los suelos corresponden al área de Riotinto, comprendida en la comunidad autónoma de Andalucía.

En Andalucía, los NGR para el As y Pb se catalogan según el uso del suelo, siendo estos: industrial, urbano y otros. El uso agrícola se encuentra incluido entre los otros usos dados a los suelos y para estos el As no debería exceder los 36 mg kg^{-1} y el Pb los 275 mg kg^{-1} . Comparando los valores previamente citados y los resultados obtenidos en la Tabla III-5, los RI-II, RIII y RIIS se encuentran contaminados por As superándose el límite en todos los casos mientras que el Pb

solo se supera el NGR en el RI-II (Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio- Junta de Andalucía, 2015). A nivel Europeo las concentraciones de As se consideran altas cotejando con el valor superior recomendado para suelos agrícolas de 50 mg kg^{-1} mientras que para el Pb el rango aceptable es más amplio ($200\text{-}700 \text{ mg kg}^{-1}$) y no cataloga los suelos de Riotinto como contaminados por este metal (Tóth et al., 2016).

3.3. Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de *Brassica napus* y *Sinapis alba* en el pH, CE y las propiedades biológicas de los suelos

La Figura III- 2 muestra los valores promedio de pH para los suelos posterior al tiempo de incubación, en donde se observa una clara tendencia del aumento del pH tras la adición de las enmiendas. En el suelo RI-II testigo el pH es ácido e incrementa considerablemente al agregar la G a valores aproximados a 7.6, este comportamiento se mantiene en los suelos con las especies vegetales, sin existir diferencias significativas.

La mezcla de los suelos con el CV también presenta mayores valores de pH ($\text{pH} \approx 6.2$), pero esta variación es menor si se compara con la adición de la G y en el caso de la mezcla de G+CV con el suelo, igualmente genera cambios en el pH ácido del suelo a pH cercanos a la neutralidad. En todos los tratamientos los suelos enmendados son estadísticamente iguales, es decir, suelos control, suelos con *Brassica napus* y suelos con *Sinapis alba*.

En el caso del RIII, los suelos testigos tienen un rango de pH entre 4.46 y 4.69, ligeramente mayor que el RI-II, pero indistintamente ácidos, en el tratamiento RIII+G se midieron los mayores datos de pH, no obstante el CV y CV+G también aumentan el pH. Por último, el RIIS tiene un pH promedio de 4.79 ± 0.01 en el suelo testigo control, de 4.87 ± 0.23 en suelo testigo con *Brassica napus* y de 4.91 ± 0.17 suelo testigo con *Sinapis alba*, siendo iguales. Estos promedios aumentan con la adición de G y G+CV, exceptuando la muestra RIIS+G sin planta en donde el pH registrado es de 7.91 ± 0.01 .

El aumento del pH, puede ser el resultado de múltiples mecanismos, Mokolobate y Haynes (2002) exponen que al adicionar materiales orgánicos como el estiércol de aves de corral incrementa el pH de los suelos, debido al pH inicial de esta enmienda y lo relacionan con la presencia de sustancias húmicas que tienen grupos funcionales carboxilo, fenólicos y enólicos, capaces de consumir protones en su pH natural y por ende mantener una capacidad amortiguadora

y neutralizadora de pH ácidos. De igual forma se considera la presencia de CaCO_3 en la materia prima, lo cual promueve el aumento del pH del suelo, teniendo en cuenta que generalmente el CaCO_3 proviene de la caliza utilizada como suplemento dietario en las aves. Los resultados encontrados en el presente estudio, muestran que el pH de la gallinaza es de 9.01 ± 0.25 , por lo cual se atribuye el aumento del pH a la naturaleza alcalina de la materia.

Otros autores han reportado valores de pH de gallinaza de 8.2 (Cantrell et al., 2012), mientras que Cely et al. (2015) establecen que el estiércol de aves tiene un pH de 5.8 ± 0.1 , lo cual explica la diferencia entre el estiércol y la gallinaza. La gallinaza constituye la mezcla del estiércol con las plumas, la cama e incluso residuos de alimento de las aves, de hecho estos autores realizaron una mezcla de estiércol de aves y de serrín que incrementa el pH a 8.0 ± 0.1 , similares a los encontrados en otras investigaciones para la gallinaza (Cantrell et al., 2012).

En suelos ácidos, la adición de gallinaza suele producir cambios en el pH del suelo en la capa superficial (0-5 cm), por ejemplo en suelos con un pH inicial de 5.6, el pH aumento a 6.2 con un rango entre 5.6 a 7.1, a diferencia de esto en zonas más profundas (10 cm) no se presentan diferencias en el pH del suelo (Sharpley et al., 1993). La influencia del carbón vegetal o también enunciado como biochar comercial, es similar a la de la gallinaza debido al pH inicial de dicha enmienda, por lo cual se sigue manteniendo el efecto encalante por parte de este material carbonoso, como lo expuesto por Chintala et al. (2014) en suelos ácidos.

La Figura III- 3, muestra la CE en todos los suelos estudiados, en donde dicha propiedad es baja en los suelos testigo en comparación con los suelos enmendados para RI-II, RIII y RIIS, sin existir diferencias con o sin la presencia de las especies vegetales en los suelos sin enmendar. La adición de la G incrementa la CE considerablemente y el CV disminuye la CE de los suelos, sin embargo no llegan a ser menores que los suelos testigo. La mezcla de G+CV aumenta la CE pero, no en igual medida que la G por si sola. La CE en los materiales de partida reportados en la Tabla III- 2, son mayores en la G con un promedio de $0.44 \pm 0.06 \text{ dS m}^{-1}$, lo cual concuerda con previas investigaciones que registran una CE de $0.43 \pm 0.03 \text{ dS m}^{-1}$ (Cely et al., 2015).

Figura III- 2. pH de los suelos tratados. Los valores con la misma letra no presentan diferencias según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura III- 3. CE (dS m^{-1}) de los suelos tratados. Los valores con la misma letra no presentan diferencias según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

La Figura III- 4 representa la actividad de la fosfomonoesterasa para los tres suelos, RI-II, RIII y RIIS con la presencia de *Brassica napus*. En el suelo RI-II la fosfomonoesterasa aumenta con la adición de la G, al igual que con la mezcla G+CV, no obstante existen diferencias entre los tratamientos sin planta y los de *Brassica napus*, siendo menor la actividad de la enzima en RI-II+G y RI-II+G+CV con la colza respecto a sus controles.

En el RIII, si se observan los controles, en las muestras RIII+G y RIII+G+CV incrementa la actividad de la fosfomonoesterasa. En el RIII+CV no hay diferencias con el testigo RIII. En el caso de la combinación de RIII con el crecimiento de *Brassica napus*, las muestras RIII, RIII+G y RIII+G+CV son estadísticamente iguales y en el RIII+CV es menor que todos los tratamientos.

Para el RIIS, también existen diferencias entre los suelos con o sin planta, en donde el en el RIIS testigo la actividad de la fosfomonoesterasa es baja y aumenta en el RIIS+*Brassica napus*. Los suelos enmendados con G, tanto en el control como con la planta mejora la concentración de la enzima, asimismo el uso de G+CV posee valores altos. Por el contrario, el RIIS+CV control es equivalente al RIIS+G control pero en la muestra RIIS+CV+*Brassica napus* disminuye considerablemente.

En la Figura III- 5 se muestra la actividad de la β -glucosidasa para los suelos de Riotinto con *Brassica napus*, en donde para el RI-II la concentración de la enzima es baja en los suelos sin enmienda y aumenta diferencialmente en los tratamientos de RI-II+G. La mezcla de RI-II+G+CV también incrementa esta propiedad pero en menor medida en comparación con los beneficios de la G.

En el RIII no existen diferencias significativas entre los suelos RIII con y sin colza y los RIII+CV, los mayores valores de β -glucosidasa se registran en el RIII+G control y RIII+G+CV con *Brassica napus*. Similar a lo anterior, en el RIIS los datos son iguales para los suelos testigo y el RIIS+CV con colza, mientras que el resto de suelos enmendados favorecen la actividad de la enzima, siendo el mejor escenario el RIIS+G.

La deshidrogenasa se ve ilustrada en la Figura III- 6, particularmente para el suelo RI-II, la mezcla con enmiendas permite aumentar la actividad de dicha enzima, exceptuando el caso de

la muestra RI-II+CV, el cual es igual al RI-II+*Brassica napus*, siendo nuevamente la combinación de RI-II+G el mejor tratamiento. En el RIII todos los suelos enmendados tienen mayor cantidad de deshidrogenasa que los suelos testigo y se sigue reiterando el impacto positivo al agregar G. Para el RIIS, se destaca la importante actividad en el RIIS+G, aunque todos los tratamientos con enmiendas incrementan la deshidrogenasa, ya sea en ausencia o presencia de la planta.

La Figura III- 7 representa el índice geométrico GMea de los suelos de Riotinto controles y los suelos con crecimiento de *Brassica napus*. El índice GMea resume la tendencia previamente descrita, en donde para todos los suelos enmendados con gallinaza se observan los mejores resultados, seguido de la mezcla G+CV.

Particularmente para cada suelo las secuencias difieren, siendo para el RI-II la siguiente: RI-II control < RI-II+*Brassica napus* < RI-II+CV control = RI-II+CV+*Brassica napus* < RI-II+G+CV+*Brassica napus* < RI-II+G+CV control < RI-II+G control < RI-II+G+*Brassica napus*. Para el RIII, el comportamiento es: RIII control = RIII+*Brassica napus* < RIII+CV+*Brassica napus* < RIII+CV control < RIII+G+*Brassica napus* < RIII+G+CV control < RIII+G+CV+*Brassica napus* < RIII+G control. Respecto al RIIS, se tiene la secuencia: RIIS+CV+*Brassica napus* < RIIS control $\leq$ RIIS+*Brassica napus* < RIIS+CV control = RIIS+G+CV+*Brassica napus* = RIIS+G+*Brassica napus* < RIIS+G control.

Figura III- 4. Fosfomonoesterasa con *Brassica napus* para el área de Ríotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

Figura III- 5. β -glucosidasa con *Brassica napus* para el área de Ríotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

Figura III- 6. Deshidrogenasa con *Brassica napus* para el área de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

Figura III- 7. Índice GMea con *Brassica napus* para el área de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

La Figura III- 8 muestra la actividad de la fosfomonoesterasa en los suelos testigo y enmendados de Riotinto combinados con el crecimiento de *Sinapis alba*, en donde es clara la influencia de los tratamientos RI-II+G y RI-II+G+CV respecto a los suelos sin enmendar, los cuales representan los mayores valores promedio, aunque existen diferencias entre con o sin planta, la tendencia es la misma, es decir, el aumento de la actividad con estas dos enmiendas. En el RIII, los resultados varían entre tratamientos pero a nivel general el RIII+CV es igual o incluso menor que el RIII dependiendo si se compara con o sin crecimiento de la planta, mientras que la adición de la G en el control incrementa la fosfomonoesterasa. La muestra RIIS+CV+*Sinapis alba* presenta el menor promedio de actividad del suelo RIIS, pero los otros suelos enmendados aumentan la concentración, especialmente en RIIS+G.

La actividad de la β -glucosidasa (Figura III- 9) es mayor en el suelo RI-II+ *Sinapis alba* que en el mismo suelo sin planta, sin embargo los promedios son bajos cotejados con lo obtenido en el RI-II+G, de hecho este suelo sin la mostaza registró el dato más alto de $2.85 \pm 0.03 \mu\text{mol (g h)}^{-1}$. Este comportamiento se mantiene en el suelo RIII, en el cual los mayores valores se encuentran en el RIII+G y RIII+G+CV, mientras que el RIII+CV es igual al suelo sin enmienda. Por último, el RIIS, posee resultados similares, con los beneficios del tratamiento RIIS+G sin diferencias con o sin especie vegetal, pero en este caso el RIIS+CV control es estadísticamente igual a las mezclas que son mayores que el suelo RIIS testigo.

La actividad de la deshidrogenasa se encuentra graficada en el la Figura III- 10, en donde la presencia de *Sinapis alba* no parece influenciar la actividad de la enzima en el RI-II y RI-II+CV, por el contrario en el RI-II+G si existen diferencias con o sin planta al igual que en el RI-II+G+CV. En este suelo la enzima aumenta con la adición de todos los materiales pero es mayor en el RIII+G. Lo mismo sucede en el RIII y en el RIIS siendo la mezcla con G sin planta la que obtiene los mejores resultados para este sustrato. A lo largo del documento se ha establecido que el índice GMea contempla el comportamiento de las tres enzimas y se puede obtener un resultado general de las propiedades biológicas de los suelos por tanto se indica que a nivel general en RI-II con o sin planta, los suelos enmendados aumentan la actividades enzimáticas en mayor o menor proporción, tal cual sucede con el RIII, exceptuando el caso RIII+CV+*Sinapis alba* que es estadísticamente igual a su testigo. En el RIIS se presenta una situación particular y es que en el RIIS+CV+*Sinapis alba* el GMea es menor que los suelos sin enmendar aunque el restante de enmiendas aumenta dicho índice (Figura III- 11).

Figura III- 8. Fوسفmonoesterasa con *Sinapis alba* para el área de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

Figura III- 9. β -glucosidasa con *Sinapis alba* para el área de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

Figura III- 10. Deshidrogenasa con *Sinapis alba* para el área de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$).

Figura III- 11. Índice GMea con *Sinapis alba* para el área de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p=0.05$)

Las actividades enzimáticas tienen una tendencia clara al aumentar con el uso de la gallinaza con o sin planta y este comportamiento se debe a varios factores, todos relacionados con la concentración de carbono orgánico. Según Fauci y Dick (1994) los suelos que poseen un contenido bajo en C orgánico tienen mayor potencial de respuesta a la adición de nuevas fuentes de dicho carbono y pueden tener una reserva biológica más grande, es decir mayor actividad microbiana y por ende alta actividad enzimática. Los suelos del área de Riotinto, de acuerdo a su previa caracterización, tienen bajo contenido de C orgánico (Tabla III- 5) fluctuando entre $0.10 \pm 0.09\%$ para RI-II y $1.34 \pm 0.03\%$ para RIII, mientras que la gallinaza tiene un $12.90 \pm 0.20\%$ actuando en este caso como la fuente de C orgánico (Tabla III- 2).

Otro de los aspectos, es la materia prima de las enmiendas, en otras investigaciones se reconoce el potencial de los residuos de animales para aumentar la actividad biológica de los suelos (Lalande et al., 2011), incluso se habla de los efectos de la gallinaza para aumentar la actividad de enzimas como la β -glucosidasa (Fauci y Dick, 1994). Adicionalmente el efecto encalante de la gallinaza, también puede estar asociado a la mejora de las actividades enzimáticas, de acuerdo a lo establecido por otros autores el efecto en el pH puede incrementar el contenido de biomasa microbiana, la tasa de respiración del suelo, el coeficiente metabólico y las actividades de los suelos, de enzimas como la deshidrogenasa, sulfatasa y proteasa (Haynes y Naidu, 1998).

Los resultados obtenidos con la mezcla de los suelos más carbón vegetal, pueden estar asociados a la temperatura de producción de este material puesto que según Gascó et al. (2016) las actividades enzimáticas mejoran con la materia orgánica asociada al purín de cerdo y al biochar producido a partir de esta materia a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ pero disminuye en el biochar producido a $500\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que puede sugerir que en el CV utilizado para el presente estudio la temperatura es alta y no permite generar beneficios en las propiedades biológicas de los diferentes suelos. Por otra parte, se puede considerar la materia prima pues el CV proviene de madera, mientras los residuos de animales tienen alto potencial para promover la actividad biológica del suelo. No obstante, la mezcla de G+CV se contempla como una opción viable pues produce un aumento de GMea, lo que indica su potencial para mejorar la calidad del suelo. En conclusión, la determinación de las actividades enzimáticas se convierte en un indicador de la fertilidad de los suelos (Mierzwa-Hersztek et al., 2016) estableciéndose que los suelos RI-II, RIII y RIIIS tienen bajo potencial biológico pero dicha propiedad se ve potencializada por la gallinaza.

La biomasa microbiana para el suelo RI-II, es mayor en las muestras RI-II+G y RI-II+G+CV en los controles y los suelos con las dos especies, no obstante existen diferencias significativas entre los tratamientos como se muestra en la Figura III- 12, por el contrario el RI-II+CV es igual a los suelos testigos en todos los escenarios, es decir la presencia de *Brassica napus* ni de *Sinapis alba* parece influir. En el RIII, no hay diferencias entre los suelos RIII con *Brassica napus* y los tratamientos RIII+CV control y RIII+CV con *Sinapis alba*, adicionalmente en el RIII control y el RIII con *Sinapis alba* registran un ligero aumento sin ser significativo respecto a los tratamientos previamente mencionados. En cuanto a las mezclas de RIII+G y RIII+G+CV la biomasa aumenta pero el mayor promedio es el de RIII+G control. En el RIIS la tendencia se mantiene pero el carbono asociado a la microbiota del suelo incrementa claramente en los suelos con G con y sin presencia de las plantas (Figura III- 12).

Figura III- 12. Biomasa microbiana (C-biomasa) para los suelos de Riotinto control, con *Brassica napus* y con *Sinapis alba*. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p = 0.05$).

La biomasa encontrada está directamente relacionada con los resultados de las actividades enzimáticas, siendo la combinación de los suelos con la gallinaza el mejor escenario, por lo que también se relaciona con el contenido de C_{oxi} aportado por la enmienda (Fauci y Dick, 1994), pero la razón del aumento pronunciado en el suelo RIIS puede deberse al pH y el contenido de C_{oxi} inicial del suelos, dichas propiedades son más altas que en el RI-II y RIII (Tabla III- 5).

3.4. Efecto de la adición de enmiendas y crecimiento de *Brassica napus* y *Sinapis alba* en la concentración de metales y fósforo total.

La Figura III- 13 muestra la concentración de As total en RI-II, RIII y RIIS, en donde se observa que la cantidad de dicho metal es superior para el RI-II en comparación con los otros suelos. En el RI-II sin enmendar con la presencia de las especies *Brassica napus* y *Sinapis alba* disminuye el As respecto al testigo sin planta, lo que ya sugiere un potencial de extracción. De igual forma la adición de enmiendas reduce el As y la combinación de enmiendas y fitoextracción potencializa los resultados, siendo menores los niveles de As en los suelos enmendados con colza y mostaza. En el suelo RIII, las variaciones son ligeras pero se puede establecer que la presencia de *Sinapis alba*, disminuye la concentración de As significativamente en todos los tratamientos. Para el RIIS, el As no fluctúa mayormente entre el testigo sin enmendar y los suelos enmendados controles, es decir sin planta, sin embargo el crecimiento de *Brassica napus* y *Sinapis alba* reduce la cantidad del metal en el RIIS+G, RIIS+CV y RIIS+G+CV.

En la Figura III- 14 se presenta el Fe total, el cual para el RI-II es mayor en el suelo sin enmendar y no hay diferencias entre el suelo control y el suelo con *Brassica napus*, solo varía con la presencia *Sinapis alba*. Los tratamientos RI-II+G y RI-II+CV disminuyen la concentración de Fe en todos los escenarios: control, con colza y con mostaza. Al igual que estos suelos enmendados, la mezcla de G+CV en el RI-II reduce el Fe exceptuando el caso del RI-II+G+CV+ *Sinapis alba* siendo este estadísticamente igual a los suelos sin enmendar. En el RIII, todas las enmiendas inmovilizan el Fe y no hay diferencias entre los tratamientos con o sin planta en la mayoría de los casos. El mismo comportamiento del RIII, se evidencia en el RIIS, donde los suelos enmendados tienen menos promedios de Fe y las variaciones entre el uso de una especie u otra son escasas. El menor valor de Fe para el RIIS se data en el RIIS+G+CV+ *Brassica napus*.

El Pb total se encuentra representado en la Figura III- 15, nuevamente para el RI-II se calcularon los mayores promedios respecto al RIII y RIIS. Las diferencias entre el suelo sin planta y el suelo con las especies vegetales son evidentes, siendo menores en los suelos con planta, refiriéndose al RI-II sin enmiendas. Cuando se agregan enmiendas, la reducción del Pb aumenta y si se combinan los suelos enmendados con el crecimiento de *Brassica napus* y *Sinapis alba* los resultados mejoran, por tanto, los valores mínimos de Pb se registran en los tratamientos RI-II+G, RI-II+CV y RI-II+G+CV con colza y mostaza.

Figura III- 13. As total en los suelos de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; p= 0.05).

Figura III- 14. Fe total en los suelos de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; p= 0.05).

El Pb total para el RIII (Figura III- 15) es mayor en el RIII+ *Brassica napus*, pero la adición de enmiendas en los tratamientos con colza reduce el contenido del metal. Por el contrario, si se observan los controles para este suelo, no existen diferencias entre el suelo RIII y los RIII enmendados sin planta. Los tratamientos con *Sinapis alba* no difieren entre RIII y RIII+G aunque con RIII+CV y RIII+G+CV si disminuye el Pb. En el RIIS las concentraciones de Pb son bajas respecto a las otras dos muestras y no hay variaciones estadísticamente significativas entre los tratamientos testigo, los enmendados ni con el crecimiento de las plantas, excepto el RIIS+G+CV+ *Brassica napus*.

La Figura III- 16 representa el P total y en este caso se ve una clara tendencia en todos los suelos y es el aumento considerable del P tras la adición de G, este incremento también se da con la mezcla de G+CV pero en menor proporción. Los tratamientos del suelo con CV no generan variaciones respecto a los suelos sin tratar en ninguno de los tres suelos. Específicamente, en el RI-II y RIII el contenido en P total es menor cotejado con el RIII pero como se mencionó el comportamiento de los suelos enmendados es igual. En el RI-II no hay diferencias entre controles, tratamientos con *Brassica napus* y con *Sinapis alba* en el RI-II, RI-II+CV, RI-II+G+CV. En el RI-II+G la secuencia de las muestras es la siguiente: RI-II+G control $\leq$ RI-II+G+ *Sinapis alba* $\leq$ RI-II+G+ *Brassica napus*. La ausencia de diferencias entre testigos y suelos con CV también se da en el RIII y en el RIIS.

Es evidente que la concentración de As y Pb disminuye con la adición de enmiendas, lo que hace a la G y CV materiales aprovechables para el tratamiento de suelos contaminados por metales, no obstante, la presencia de las plantas no parece tener una influencia significativa en la extracción de los metales. Por otro lado, a partir de estos resultados se resalta el aporte de P por parte de la G lo cual es beneficioso para el crecimiento de la planta, en este caso se habla del P total dando una idea del comportamiento y aprovechamiento por parte de las plantas. Otros autores han registrado el aporte de fósforo después de adiciones de gallinaza en suelos a largo plazo y establecen el aporte de macronutrientes, no solamente el fósforo sino también nitrógeno (Sharpley et al., 1993). La gallinaza ha sido ampliamente considerada como un residuo ganadero aprovechable que puede mejorar la calidad del suelo, manteniendo adecuadas dosis y además permite la valorización y manejo del residuo, lo cual es esencial desde el punto de vista ambiental (Bolan et al., 2010).

Figura III- 15. Pb total en los suelos de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).

Figura III- 16. P total en los suelos de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p= 0.05$).

3.5. Capacidad de fitoextracción de *Sinapis alba* y *Brassica napus*

3.5.1. Producción de biomasa vegetal de *Sinapis alba* y *Brassica napus*

La Figura III- 17 muestra la biomasa vegetal producida por *Brassica napus* para los tres suelos, en donde la cantidad de hojas en la mezcla de RI-II+G y RI-II+G+CV es mayor que en el RI-II+G, en el suelo testigo RI-II no se observó crecimiento de la planta, por tanto el valor es nulo para hojas, tallos y raíces. En los suelos enmendados de RI-II, los tallos presentaron el mismo comportamiento de las hojas, siendo RI-II+CV el tratamiento con menor peso de tallos. En las raíces estadísticamente no existen diferencias entre la adición de CV y G+CV, pero la mezcla con G mostró un aumento en la producción de raíces. En la represa RIII, la G afectó la germinación de *Brassica napus*, mientras que en el suelo testigo RIII si se observó crecimiento, no obstante, no existen variaciones entre las diferentes partes de la planta y los diferentes tratamientos. Por último, en el suelo RIIS las variaciones en la biomasa vegetal de las hojas establece el beneficio de la mezcla CV+G, siendo en el peso significativamente mayor, mientras en los tallos tanto el CV como la G+CV obtienen mejores resultados que los otros tratamientos. En las raíces, se registra la siguiente secuencia: $RIIS+G \leq RIII+CV \leq RIIS+G+CV \leq RIIS$. El total de la biomasa obtenida para los suelos enmendados de RI-II no presenta diferencias significativas, exceptuando el caso del RI-II+G. En el RIII y RIIS, los promedios de biomasa vegetal total son iguales entre los tratamientos.

La Figura III- 18 muestra la biomasa producida por *Sinapis alba* para los suelos de Riotinto y en este caso en el suelo RI-II no se evidenció crecimiento de la mostaza, en los RI-II enmendados no hay diferencias significativas entre tallos, raíces y total de la biomasa para los diferentes tratamientos y las hojas fueron las únicas con variaciones significativas siendo la muestra RI-II+G+CV la de mayor peso seco de hojas. Al igual que en el RI-II, en el RIII no existió germinación de la planta en el suelo testigo, la adición de enmiendas promueve el crecimiento de *Sinapis alba* pero no se presentan diferencias entre ellas en ninguna de las partes de la planta. En el RIIS, la mezcla RIIS+G posee promedios de peso seco iguales a los del suelo sin enmendar para las hojas, tallos, raíces y la biomasa total. A diferencia de esto, el RIIS+CV y el RIIS+G+CV aumentan la cantidad de tallos y raíces, no obstante, a nivel de biomasa total producida es el RIIS+CV registra los mayores promedios.

Figura III- 17. Biomasa vegetal *Brassica napus* para los suelos de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p = 0.05$).

Figura III- 18. Biomasa vegetal *Sinapis alba* para los suelos de Riotinto. No hay diferencias con la misma letra (Duncan; $p = 0.05$).

La ausencia de *Brassica napus* y de *Sinapis alba* en el suelo sin enmendar RI-II sugiere la toxicidad del suelo lo que está relacionado con el contenido de metales, según la normativa este es el único que supera los límites permitidos para el As y Pb, mientras que en el RIII y RIIS solo se establece la contaminación por As. El efecto combinado de los dos metales puede llegar a inhibir el crecimiento de las plantas. Desde este punto de vista la adición de G y CV mejora las propiedades del suelo permitiendo la germinación de la mostaza y la colza. Aunque estas especies han sido catalogadas por otros autores como resistentes a suelos contaminados por metales (Houben et al., 2013; Kloss et al., 2014), existen varios factores que pueden influir en la inhibición del crecimiento como el pH de los suelos y el contenido en nutrientes como el fósforo.

3.5.2. Factor de bioconcentración (BCF) y translocación (TF) de *Sinapis alba* y *Brassica napus*

La Figura III- 19 representa el BCF determinado para el As en los tres suelos del área de Riotinto. En el RI-II solo se muestran los suelos enmendados pues no se obtuvo crecimiento de ninguna de las especies en los suelos sin enmiendas, previamente mencionado en los resultados de biomasa vegetal (Figura III- 17 y Figura III- 18), a partir de esta información se establece que los valores de BCF para el As de *Brassica napus* y *Sinapis alba* en el RI-II no superan el límite para considerar a las especies como hiperacumuladoras ($BCF > 1$).

Figura III- 19. BCF del As para los suelos de Riotinto con *Brassica napus* y *Sinapis alba*. Los valores con la misma letra no presentan diferencias según la prueba de Duncan ($p = 0.05$).

En el RIII, el BCF del As en el suelo testigo solo se determinó para *Brassica napus* mientras en el RIII+G solo para *Sinapis alba*, lo que permite concluir que depende de la biología de la especie varia su nivel de tolerancia, se registran diferencias significativas entre los tratamientos no obstante en ninguno de los casos se supera el valor de 0.8. De los tres escenarios el RIIS posee los menores promedios de BCF, sin embargo, las plantas crecen en todos los tratamientos.

La Figura III- 20 se muestra el BCF calculado para el Fe y se concluye que las especies vegetales no son acumuladoras de Fe en ninguno de los tratamientos ni en ninguno de los suelos, a nivel general la adición de CV mejora la bioconcentración pero los resultados son bajos. Por su parte la Figura III- 21 contiene los valores de BCF para el P, en donde es evidente la acumulación por parte de las plantas, claramente se relaciona con las necesidades de las especies para su crecimiento de nutrientes como el P. En el suelo RI-II las diferencias son evidentes entre suelo testigo y el RI-II+G, especialmente en el caso de *Sinapis alba*. Por el contrario, el tratamiento RI-II+CV tiene valores iguales al RI-II. En el RIII en los resultados para *Brassica napus* el BCF del P es mayor en el testigo, mientras que en el RIII+CV y RIII+G+CV disminuye la acumulación. Para *Sinapis alba* solo se obtienen promedios en los suelos enmendados siendo el mayor promedio de P total el de RIII+CV. En el RIIS con colza y los suelos enmendados aumentan el BCF del P, pero en la mostaza solo el RIIS+CV y RIIS+CV+G son diferentes al testigo.

Figura III- 20. BCF del Fe para los suelos de Riotinto con *Brassica napus* y *Sinapis alba*. Los valores con la misma letra no presentan diferencias según la prueba de Duncan ($p= 0.05$).

Figura III- 21. BCF del P para los suelos de Riotinto con *Brassica napus* y *Sinapis alba*. Los valores con la misma letra no presentan diferencias según la prueba de Duncan ($p=0.05$).

La Figura III- 22 representa el BCF calculado para el Pb en el RI-II, RIII y RIIS para las dos especies pero el único valor por encima de 1 se registró en el RIII+G+CV por *Brassica napus* siendo este de 1.01 ± 0.11 mientras en el restante de tratamientos son bajos.

Figura III- 22. BCF del Pb para los suelos de Riotinto con *Brassica napus* y *Sinapis alba*. Los valores con la misma letra no presentan diferencias según la prueba de Duncan ($p=0.05$).

Los factores de translocación calculados para todos los suelos se muestran en la Tabla III-6 para el RI-II, RIII y RIIIS con las dos especies vegetales. Los porcentajes son bajos para todos los metales, pero en el P total existe un evidente proceso de translocación en las dos especies. En el suelo RI-II el P total tiene un TF mayor en el RI-II+CV para *Sinapis alba* y *Brassica napus*. De igual forma en el RIII el incremento se evidencia en el RIII+CV para las dos especies mientras que en el RIIIS es la muestra RIIIS+G+CV la de mejores resultados para *Brassica napus* y en el caso de *Sinapis alba* el suelo testigo RIIIS. El dato mínimo de TF para el P total es de $83.63 \pm 6.76\%$ en el RI-II+G+CV mientras que el As, Fe y Pb los resultados no alcanzan el 20% de translocación.

Tabla III- 6. Factor de translocación (%) de *Brassica napus* y *Sinapis alba* para los suelos de Riotinto. Los valores con la misma letra no presentan diferencias según la prueba de Duncan ($p=0.05$).

Especie	Muestra	As	Fe	P	Pb
<i>Brassica napus</i> RI-II	RI-II+G	$0.93 \pm 0.05b$	$0.96 \pm 0.07b$	$196.83 \pm 3.59a$	$0.46 \pm 0.02b$
	RI-II+CV	$0.98 \pm 0.01b$	$0.74 \pm 0.06a$	$328.88 \pm 8.15b$	$1.54 \pm 0.01c$
	RI-II+G+CV	$0.46 \pm 0.02a$	$0.7 \pm 0.02a$	$203.51 \pm 14.01a$	$0.31 \pm 0.07a$
<i>Sinapis alba</i> RI-II	RI-II+G	$1.37 \pm 0.02b$	$1.31 \pm 0.02b$	$280.14 \pm 18.97b$	$5.57 \pm 2.24b$
	RI-II+CV	$0.78 \pm 0a$	$0.65 \pm 0.05a$	$1176.26 \pm 39.27c$	$1.48 \pm 0.61a,b$
	RI-II+G+CV	$1.35 \pm 0.05b$	$1.51 \pm 0.04c$	$83.63 \pm 6.76a$	$1.22 \pm 0.01a$
<i>Brassica napus</i> RIII	RIII	$4.78 \pm 0.06c$	$3.29 \pm 0.01c$	$130.62 \pm 5.93a$	$18.2 \pm 0.07c$
	RIII+CV	$2.39 \pm 0.55b$	$1.24 \pm 0.04b$	$536 \pm 1.08c$	$1.4 \pm 0.02b$
	RIII+G+CV	$1.1 \pm 0.12a$	$0.63 \pm 0.01a$	$208.58 \pm 1.65b$	$0.45 \pm 0a$
<i>Sinapis alba</i> RIII	RIII	-	-	-	-
	RIII+CV	$4.75 \pm 0.08b$	$3.8 \pm 0.61b$	$543.21 \pm 27.64b$	2.6 ± 0.06
	RIII+G+CV	$1.42 \pm 0.43a$	$0.79 \pm 0.12a$	$233.67 \pm 12.96a$	-
<i>Brassica napus</i> RIIIS	RIIIS	$5.92 \pm 0.14b$	$2.03 \pm 0.07c$	$162.28 \pm 0.77a$	-
	RIIIS+G	$3.72 \pm 0a$	$0.65 \pm 0.05a$	$137.2 \pm 3.93a$	-
	RIIIS+CV	$3.24 \pm 0.34a$	$0.77 \pm 0.07a,b$	$253.02 \pm 5.79b$	-
	RIIIS+G+CV	$5.67 \pm 0.39b$	$0.83 \pm 0.02b$	$358.55 \pm 13.43c$	-
<i>Sinapis alba</i> RIIIS	RIIIS	$8.43 \pm 0.41b$	$7.64 \pm 2.27b$	$224.4 \pm 13.36d$	$2.41 \pm 0.24a$
	RIIIS+G	$17.5 \pm 1.15c$	$14.09 \pm 0.98c$	$137.84 \pm 0.51a$	$18.47 \pm 0.67b$
	RIIIS+CV	$2.87 \pm 0.02a$	$2.31 \pm 0.06a$	$174.42 \pm 4.46b$	$1.51 \pm 0.4a$
	RIIIS+G+CV	$7.32 \pm 0.25b$	$3.55 \pm 0.61a$	$199.7 \pm 7.61c$	$1.51 \pm 0a$

El análisis de la capacidad de fitoextracción de las especies *Brassica napus* y *Sinapis alba* permite establecer que la adición de enmiendas favorece el crecimiento de las plantas, sin embargo los factores de bioconcentración son bajos y no permiten catalogar a las especies vegetales como hiperacumuladoras de As ni Pb. Lo que se puede explicar por el alto contenido de dichos metales en el suelo que no benefician una alta producción de biomasa vegetal, no obstante las diferencias entre las concentraciones de los metales en los suelos con y sin enmiendas son significativas observándose una reducción. Estos resultados pueden sugerir que si existe una actividad de extracción pero no es alta como para generar BCF por encima de 1. Igualmente los factores de translocación no permiten evidenciar un transporte de metales de las raíces a la parte superior de la planta del As, Fe y Pb pero se evidencia que el P total tiene porcentajes por encima del 80%.

4. CONCLUSIONES

- A partir de la caracterización de los materiales de partida se puede identificar la influencia del pH de las enmiendas en el pH del suelo, considerando que se tratan de suelos ácidos que aumentan a valores de pH alcalinos tras la adición de la gallinaza y el carbón vegetal, lo que puede promover el crecimiento de las plantas y la mejora en la actividad de extracción de metales.
- Las actividades enzimáticas permiten corroborar los beneficios de la adición de gallinaza aumentando los niveles de actividad de la fosfomonoesterasa, β -glucosidasa y deshidrogenasa en todos los suelos lo que se encuentra asociado al contenido de carbono orgánico de la enmienda, a la naturaleza de la biomasa e incluso al efecto encalante de la enmienda promoviendo el crecimiento de la microbiota asociada al suelo.
- La concentración de metales en los suelos establece los beneficios de la adición de gallinaza y carbón vegetal en la retención de los metales, siendo los valores de As, Pb y Fe menores en los suelos enmendados respecto a los suelos testigo. No obstante, a nivel general no existen diferencias significativas entre el uso de las dos especies vegetales.
- La capacidad de fitoextracción de *Brassica napus* y de *Sinapis alba* sugiere que dichas especies son sensibles a los niveles de contaminación de metales presentes en los suelos RI-II y RIII inhibiendo su crecimiento, sin embargo, la adición de enmiendas mejora las propiedades del suelo y favorece la germinación de las plantas.
- El aporte P total por parte de la gallinaza, está ligado a factores como la alta concentración de la fosfomonoesterasa y el aumento de la actividad microbiana por lo cual se destaca los beneficios de dicho residuo ganadero.

CAPÍTULO IV: CARACTERIZACIÓN DE BIOCHARES PROCEDENTES DE RESIDUOS GANADEROS POSTERIOR A SU ENVEJECIMIENTO

1. INTRODUCCIÓN

Nuevas estrategias para mitigar el cambio climático se plantean diariamente en la temática ambiental. A lo largo del documento se han destacado los beneficios de las enmiendas orgánicas en el secuestro del carbono. El enfoque se basa en la adición de materia orgánica fresca, procedente de fuentes externas (residuos de cultivos, paja, estiércol de animales), a los suelos para aumentar el contenido de carbono. No obstante, la capacidad de los suelos para almacenar la materia orgánica es limitada y fluctúa según el: (i) tipo de suelo, (ii) régimen hidrológico y (iii) factores climáticos. La mezcla de los suelos con enmiendas con materia orgánica degradable, se convierte en una técnica ineficiente a largo plazo (Sohi et al., 2009) debido a su poca estabilidad. La estabilidad es un factor esencial y se define, en el contexto de mitigación ambiental, como el componente que se mantiene en el suelo por un periodo mínimo de 100 años (Cross y Sohi, 2013).

La transformación de la materia orgánica proveniente de fuentes biológicas hacia un material estable disminuye las emisiones de CO₂ por la ralentización de la tasa de descomposición de la materia orgánica. De hecho, el biochar es un material con carbono estable que influye en la mineralización del carbono del suelo (Zhao et al., 2015). La estabilidad del biochar en los suelos, depende de la materia prima utilizada en su fabricación, de las condiciones de producción y de las propiedades fisicoquímicas del suelo (Lehmann y Joseph, 2009). Los materiales como la madera generan biochar de estructura fuerte y gruesa con porcentajes de C entre 70% a 90%, mientras que los provenientes de césped, maíz o estiércol de animales son materiales finos con contenidos de carbono aproximados al 60% (Sohi et al., 2009), sugiriendo que los primeros tienen una mayor estabilidad.

La fracción lábil de C ligada al biochar, en el suelo sufre procesos de descomposición y oxidación (Zhao et al., 2015), lo que conlleva cambios en las propiedades físicas y químicas del biochar y es lo que se define como envejecimiento (Dong et al., 2017). La degradación de la fracción lábil naturalmente se puede dar por la acción de los microorganismos (Wengel et al., 2006) lo que conlleva la disminución de la cantidad de biochar en el suelo. Igualmente, la

reducción del contenido de biochar puede darse deberse a su movimiento horizontal o vertical por acción del viento, irrigación o labranza del suelo (Obia et al., 2017). Según Dong et al. (2017), la pérdida de masa del biochar puede llegar al 40% después de cinco años de ser agregado al suelo. Obia et al. (2017) también reportan una tasa de recuperación de biochar entre el 45- 66% pasado un año de su aplicación.

Artificialmente, el biochar se puede oxidar de forma abiótica en cortos períodos de tiempo por procesos como (Cheng et al., 2006):

- Oxidación aeróbica a alta temperatura
- Reacciones con oxidantes químicos fuertes
- Oxidación por ozono

Los posibles cambios en las propiedades del biochar tras su envejecimiento se enuncian en la Tabla IV- 1. A nivel general, se puede establecer que el pH de los biochares disminuye después del envejecimiento, exceptuando el caso del biochar proveniente de lodos de depuradora. La porosidad y el área superficial de los biochares envejecidos son mayores, al igual que el porcentaje de C obtenido del análisis elemental. El contenido de C inorgánico es mayor en los biochares frescos (de la Rosa et al., 2018; Dong et al., 2017; Mukherjee et al., 2014). Las relaciones C/N son menores en los biochares envejecidos incluso cuando se comparan diferentes materias primas utilizadas para la producción de dichos materiales (de la Rosa et al., 2018). Pero según Dong et al. (2017) el %H y %N no presenta fluctuaciones significativas.

De acuerdo a lo anterior, el presente capítulo se enfoca en el envejecimiento artificial de cuatro biochares mediante la oxidación química y térmica de los materiales. Obteniendo como resultado final los materiales frescos y envejecidos para la posterior comparación del análisis elemental y termogravimétrico. Los biochares provienen de residuos ganaderos, específicamente estiércol de conejo y purín de cerdo fabricados a diferentes temperaturas de pirólisis.

Tabla IV- 1. Variaciones en los biochares posterior al envejecimiento. CIC: capacidad de intercambio catiónico, CE: conductividad eléctrica. El símbolo (-) se refiere a la ausencia de variaciones.

Referencias	Propiedad	Biochar fresco	Biochar envejecido	Variación
Dong et al., 2017 ^a	Volumen de poro ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	0.038	0.049 - 0.077	↑
	Área superficial ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	15.66	31.0 – 33.56	↑
	Diámetro de poro (nm)	9.67	6.38 - 9.18	↓
	% C	49.1	51.2 – 51.9	↑
	% H	1.8	1.9 – 2.1	-
	% N	1.2	1.3 – 1.4	-
	% O	11.9	8.6 – 9.6	↓
	% C inorgánico	1.0	0.5 – 0.6	↓
Referencias	Propiedad	Biochar fresco	Biochar envejecido	Variación
Mukherjee et al., 2014 ^b	pH	6.3	5.3	↓
	Materia volátil (%)	49.6	50.8	↑
	Cenizas (%)	5.1	3.9	↓
	C (mg g^{-1})	617	667	↑
	O/C	0.5	0.5	-
	CIC ($\text{cmol}_c \text{kg}^{-1}$)	26.2	173	↑
de la Rosa et al., 2018 ^c	Biochar madera de pino			
	C/N	471	295	↓
	pH	9.4	7.9	↓
	CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	1187.7	101.3	↓
	Biochar lodo de papel y hojas de trigo			
	C/N	39	27	↓
	pH	9.2	7.8	↓
	CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	1045.7	139.5	↓
	Biochar lodos de depuradora			
	C/N	9	10	-
	pH	6.9	7.7	↑
	CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	814.0	117.3	↓
	Biochar viñedo			
	C/N	402	193	↓
	pH	9.3	7.8	↓
	CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	1082.3	74.5	↓
	Biochar madera mezclada			
	C/N	461	321	↓
	pH	9.3	7.8	↓
	CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	1096.7	93.3	↓

^a Biochar producido a partir de los residuos de producción de setas, análisis realizado después de 5 años.

^b Biochar producido a partir de restos vegetales (pino, césped, roble), análisis realizado después de 15 meses.

^c En estudio se diferencian los biochares por materia prima y el envejecimiento es de 24 meses

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Comparar los cambios en el análisis elemental (% C, N, H, O, S) y termogravimétrico (TG y dTG) de cuatro muestras de biocharres procedentes de residuos ganaderos posterior a la oxidación artificial (envejecimiento) de dichos materiales.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de C, N, H, O, S (análisis elemental) de los biocharres frescos y envejecidos.
- Determinar el análisis termogravimétrico (curvas TG y dTG) de los biocharres frescos y envejecidos.
- Calcular el índice de termoestabilidad de los biocharres frescos y envejecidos.

3. JUSTIFICACIÓN

El presente capítulo se enmarca como parte de la estancia doctoral realizada en la Universidad de Edimburgo, en donde se efectuó el envejecimiento de las muestras de biocharres en el laboratorio perteneciente al departamento de Geociencias. La investigación contó con el apoyo del: “UK Biochar Research Center (UKBRC)”. Las enmiendas se obtuvieron de la producción realizada en el proyecto: “Tratamiento de suelos contaminados por metales mediante combinación de técnicas de fitorremediación con adición de biochar (CGL2014-58322-R)” del programa Retos 2014. Dicha estancia se realizó gracias a la financiación obtenida por parte del Consejo Social de la UPM mediante la XVII convocatoria de ayudas del Consejo Social para el fomento de la formación y la internacionalización de doctorandos para el curso 2018-2019.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Selección de enmiendas

Los biocharres proceden de residuos ganaderos, específicamente estiércol de conejo (EC) y purín de cerdo (PC) fabricados en el reactor DEMEDE S.L, utilizado para las enmiendas de los anteriores capítulos. Se seleccionaron dos biocharres (BEC, BPC) de cada una de las materias primas a diferentes temperaturas como se enuncia en la Tabla IV- 2.

Tabla IV- 2. Materiales utilizados para el envejecimiento.

Muestra	Temperatura	Tiempo de residencia (h)	Proceso	Materia prima
BEC300	300 °C	3	Pirólisis	Estiércol de conejo
BEC600	600 °C	3		
BPC300	300 °C	3	Pirólisis	Purín de cerdo
BPC450	450 °C	3		

Los materiales se envejecieron mediante una oxidación química y térmica. Para esto se calculó el peso de muestra correspondiente a 0.1 g de C, luego se adicionó 7 mL de peróxido de hidrogeno H_2O_2 al 5%, gradualmente adicionado y agitando constantemente. Las muestras se transfirieron al horno a una temperatura de 80 °C, agitando los erlenmeyers varias veces en un período de 48 h. Luego se realizó el cambio de temperatura a 105 °C hasta sequedad. Finalmente las muestras se almacenaron en un desecador por 1 h (Cross y Sohi, 2013).

El análisis posterior al envejecimiento se enfocó en el análisis elemental y termogravimétrico. El contenido de C, H, N y S se determinó mediante combustión seca con un analizador LECO CHNS 932. El análisis termo-gravimétrico se realizó en una termobalanza Labsys Setaram. Tal como se describe en el primer capítulo de la presente tesis doctoral. La estabilidad se determinó considerando la pérdida de masa de los materiales y el contenido de C (Cross y Sohi, 2013), bajo la siguiente formula:

$$\text{Estabilidad de C} = \frac{B_r \times B_{rC}}{B_t \times B_{tC}}$$

Donde B_r es la masa residual del biochar posterior al envejecimiento, B_{rC} es el % de C del biochar envejecido, B_t es la masa inicial del biochar y B_{tC} es el %C del biochar fresco.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla IV- 3 contiene el análisis elemental de los materiales frescos y envejecidos. El contenido en C es menor en todos los biocharres envejecidos, al igual que el porcentaje de H. En el caso del N, los valores disminuyen con el envejecimiento exceptuando la muestra BEC600. La relación H/C es menor en los materiales frescos, mientras la relación C/N es mayor que en los envejecidos.

Las investigaciones que establecen los cambios en la composición elemental de los biocharres tras el envejecimiento reportan aumentos en el contenido de C en los biocharres envejecidos. Dong et al. (2017) registran un aumento del 2.4% en el porcentaje de C, siendo inicialmente de 49.12% y después de 51.56%. Mukherjee et al. (2014) también establecieron un mayor contenido de C en los biocharres envejecidos en comparación a los frescos. Las materias primas utilizadas en dichas investigaciones corresponden a restos vegetales y residuos de la producción de setas. No obstante, Cheng et al. (2006) encontró que el %C disminuye con el tiempo mientras que el O aumenta.

Tabla IV- 3. Análisis elemental de biocharres e hidrocharres. BEC: biochar estiércol de conejo, BPC: biochar purín de cerdo, HEC: hidrochar estiércol de conejo, HPC: hidrochar purín de cerdo.

Muestra		%C	%H	%N	%O	%S	H/C	C/N	O/C
BEC300	Fresco	31.33	3.34	2.14	12.10	0.50	1.28	17.08	0.29
	Envejecido	5.56	0.74	0.52	17.66	0	1.60	12.31	2.38
BEC600	Fresco	29.64	1.30	0.80	6.53	0.38	0.54	43.23	0.18
	Envejecido	16.18	0.95	0.86	15.88	0	0.70	21.89	0.74
BPC300	Fresco	29.73	3.33	1.92	21.51	0.51	1.35	18.07	0.54
	Envejecido	6.11	1.24	0.62	18.65	0	2.44	11.34	2.29
BPC450	Fresco	29.70	2.98	1.81	12.57	0.45	1.21	19.14	0.32
	Envejecido	7.90	1.28	0.78	13.75	0	1.95	11.78	1.31

Las relaciones atómicas indican la aromaticidad de los materiales, en donde las relaciones de H/C menores o iguales a 0.3 representan sistemas de anillos aromáticos altamente condensados, mientras valores mayores o iguales a 0.7 son los no condensados. Todos los materiales frescos y

envejecidos tienen relaciones H/C mayores a 0.7 (Tabla IV- 3). El intervalo de H/C de ≤ 0.4 y ≤ 0.6 corresponde a los valores deseados para el secuestro de C en suelos (Schimmelpfennig y Glaser, 2012). Sin embargo, todas las muestras fabricadas superan dicho rango estableciendo que son materiales fácilmente biodegradables (degradación por microorganismos). Las relaciones atómicas H/C y O/C aumentan en los materiales envejecidos mientras que la relación C/N aumenta.

La Figura IV- 1, muestra el diagrama de Van Krevelen para los materiales frescos y envejecidos. Este diagrama se utiliza comúnmente para describir el grado de carbonización de los materiales, en donde los valores menores de H/C y O/C indican alto contenido de estructuras de carbono aromático y por ende más estable (Gascó et al., 2018). Se estable que el BEC600 envejecido y fresco corresponde a uno de los materiales más estables, al igual que el BEC450 fresco, BEC300 fresco, y el BPC300 fresco. Los biocharres, BEC300 envejecido y BPC300 envejecido son enmiendas menos estables y se encuentra relacionado con la temperatura de pirólisis.

Figura IV- 1. Diagrama de Van Krevelen para los biocharres frescos y envejecidos. BEC: Biochar estiércol de conejo, BPC: Biochar purín de cerdo, a: materiales frescos, b: materiales envejecidos.

La Figura IV- 2 representa la estabilidad del C asociado a los biocharres, obtenido tras el envejecimiento. El BEC600 es el único material con alta estabilidad, siendo esta de 48.96%, mientras que para el resto de materiales no supera el 18%.

Figura IV- 2. Porcentaje de estabilidad del C asociado a los biochares envejecidos. BEC: biochar estiércol de conejo, BPC: biochar purín de cerdo.

La Figura IV- 3, contiene la correlación de la estabilidad de C y la relación O/C para todos los biochares envejecidos en general. La relación O:C, según Cross y Sohi (2013) es una medida de la estabilidad del biochar por lo cual dichos autores sugieren realizar la correlación entre las variables.

Figura IV- 3. Correlación entre la estabilidad de C y la relación O:C de los materiales envejecidos.

Los resultados encontrados en los biochares muestran una correlación baja ($R^2 = 0.75$), igual a lo sucedido en la investigación de Cross y Sohi (2013) quienes justifican que el método de envejecimiento acelerado corresponde a la degradación física y las variaciones no se ven reflejadas en las relaciones atómicas.

La Figura IV- 4 muestra la curva TG del BEC300, en donde se observa que el material fresco presenta mayor pérdida de peso al aumentar la temperatura que el material envejecido. El BEC300a en la franja entre los 300 y 550 °C pierde aproximadamente el 50% de su peso. A diferencia de ello, en el BEC600b la pérdida es constante y no supera el 80%. La Figura IV- 5 muestra la curva dTG del BEC300, nuevamente en este caso el material fresco BEC300A tiene mayores fluctuaciones en el peso que en el BEC300B (biochar envejecido). En el BEC300A la pérdida de peso es evidente a los 300 °C, lo cual se relaciona con la pérdida de la materia orgánica primero la menos evolucionada y luego a mayores temperaturas la menos evolucionada. En el BEC300B, material envejecido, en la franja de los 300 °C a 600 °C el peso es estable.

Figura IV- 4. Curva TG (%) para el BEC300 fresco (BEC300a) y envejecido (BEC300b).

Figura IV- 5. Curva dTG ($\% \text{ min}^{-1}$) para el BEC300 fresco (BEC300A) y envejecido (BEC300B).

La Figura IV- 6 contiene la curva TG del BEC600 fresco (BEC600a) y envejecido (BEC600b). En este material no existen diferencias significativas posteriores al envejecimiento y la pérdida de peso es contante. Entre 25-150 $^{\circ}\text{C}$, se da la pérdida de humedad, entre 200 $^{\circ}\text{C}$ y 600 $^{\circ}\text{C}$ hace referencia a la combustión de la materia orgánica (Pietro y Paola, 2004). Entre 550 y 600 $^{\circ}\text{C}$ podría existir contribución por la descomposición de las arcillas y por encima de los 600 $^{\circ}\text{C}$ se descomponen minerales como los carbonatos (Gascó et al., 2018). La Figura IV- 7 muestra la curva dTG del BEC600 y al igual que la curva TG el comportamiento es similar entre el BEC600A (fresco) y BEC600B (envejecido).

El análisis termogravimétrico de los biocharres de purín de cerdo, son similares a los resultados obtenidos en el BEC300. La Figura IV- 8 representa la curva TG del BPC300, en el cual las pérdidas de peso del BPC300b son menores al aumentar la temperatura a diferencia del BEC300a. El mismo comportamiento se observa en la dTG de dicho material (Figura IV- 9). En el caso del BPC450, las curvas TG (Figura IV- 10) muestran un porcentaje de pérdida de peso

menor en el BPC450b que en el BPC450a, corroborado al igual en la dTG del biochar (Figura IV-11).

Figura IV- 6. Curva TG (%) para el BEC600 fresco (BEC600a) y envejecido (BEC600b).

Figura IV- 7. Curva dTG (% min⁻¹) para el BEC600 fresco (BEC600A) y envejecido (BEC600B).

Figura IV- 8. Curva TG (%) para el BPC300 fresco (BPC300a) y envejecido (BPC300b).

Figura IV- 9. Curva dTG (% min⁻¹) para el BPC300 fresco (BPC300A) y envejecido (BPC300B).

Figura IV- 10. Curva TG (%) para el BPC450 fresco (BPC450a) y envejecido (BPC450b).

Figura IV- 11. Curva dTG (% min⁻¹) para el BPC450 fresco (BPC450A) y envejecido (BPC450B).

La Tabla IV- 4 contiene las pérdidas de peso de los biochares frescos y envejecidos y en este caso el cálculo de los $P3/P2$ también se reconoce como índice de termoestabilidad. El BEC600 como se ha comentado a lo largo del capítulo corresponde al material más estable. En los resultados se obtiene que el BEC600 fresco tiene una termoestabilidad de 5.47 mientras el BEC600 envejecido tiene un índice de 2.52. El BEC600b posee el mayor valor comparando con los otros biochares envejecidos. El índice de termoestabilidad obtenido a través de las TG y dTG, coincide con los resultados obtenidos en el porcentaje de estabilidad de C tras el envejecimiento (Figura IV- 2).

Tabla IV- 4. Perdidas de peso (P) obtenidas del análisis termo – gravimétrico para los biochares frescos y envejecidos. BEC: Biochar estiércol de conejo, BPC: Biochar purín de cerdo, a: materiales frescos, b: materiales envejecidos.

Muestras	P1	P2	P3	$P2/(P2+P3)$	$P3/(P2+P3)$	$P3/P2$
BEC300a	2.21	19.41	49.14	0.28	0.72	2.53
BEC300b	0.15	2.43	3.86	0.39	0.61	1.59
BEC600a	2.14	5.56	30.44	0.15	0.85	5.47
BEC600b	0.44	1.57	3.96	0.28	0.72	2.52
BPC300a	7.0	18.09	27.72	0.40	0.60	1.53
BPC300b	0.83	2.15	1.9	0.53	0.47	0.88
BPC450a	3.79	16.47	29.50	0.36	0.64	1.79
BPC450b	0.97	2.25	1.77	0.56	0.44	0.79

6. ONCLUSIONES

- El contenido en carbono en los materiales envejecidos disminuye mientras las relaciones atómicas H/C y O/C aumentan. Al graficar el diagrama de Van Krevelen, se concluye que el biochar de estiércol de conejo producido a 600 °C, fresco y envejecido, es el material más estable.
- El porcentaje de estabilidad del carbono obtenido tras el envejecimiento es alto en el biochar de estiércol de conejo producido a 600 °C, respecto a los otros biochares que no superan el 18% de estabilidad.
- Existe una correlación entre el porcentaje de estabilidad del carbono y la relación O/C, dos medidas de estabilidad de los biochares. Sin embargo la correlación es baja, lo que se puede deber al que el método de oxidación acelerada produce cambios evidentes a nivel físico que no se ven reflejados en su totalidad en las relaciones atómicas.
- Según las curvas TG y dTG en las muestras biochar estiércol de conejo producido a 300 °C y biochar purín de cerdo a 300 y 450 °C, la pérdida de peso con el aumento de la temperatura es constante, en los materiales envejecidos. En los biochares frescos las pérdidas de peso son evidentes a partir de los 300 °C.
- En el biochar de estiércol de conejo producido a 600 °C no existen diferencias estadísticamente significativas en el análisis termogravimétrico entre el material fresco y envejecido.

CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones generales de la presente tesis doctoral se basan en los efectos generados en tres aspectos: variación del pH y la conductividad eléctrica, cambios en las propiedades biológicas de los suelos (biomasa microbiana y actividades enzimáticas) y fluctuaciones del contenido de metales totales en las especies vegetales y en los suelos. Siendo las conclusiones las siguientes:

- En los suelos de pH ácido, la adición de biocharres, hidrocharres y residuos ganaderos aumentan los valores por encima de la neutralidad ($\text{pH} > 7$), mientras en suelos con pH alcalino, no existen diferencias estadísticamente significativas al adicionar las enmiendas. La conductividad eléctrica sigue el mismo comportamiento.
- El pH inicial de los residuos ganaderos y sus respectivos materiales carbonosos corresponden a pH alcalinos o cercanos a la neutralidad lo que favorece la remediación de los suelos incluso con materiales como los hidrocharres, que usualmente tienen valores de pH bajos.
- Todas las enmiendas orgánicas utilizadas a lo largo de los experimentos mejoran las propiedades biológicas de los suelos. La comparación entre los hidrocharres y biocharres establece que los hidrocharres producen mayor biomasa microbiana y actividades enzimáticas que los biocharres. Igualmente, al cotejar el comportamiento adicionando biocharres a diferentes temperaturas, se concluye que a mayor temperatura de pirólisis menor microbiota asociada al suelo.
- La biomasa microbiana y las actividades enzimáticas se encuentran directamente relacionadas, por ende la tendencia en los resultados de estas dos variables es similar a lo largo del documento. Las actividades son una medida del sustrato necesario para que los microorganismos del suelo sobrevivan.
- La adición de los biocharres, hidrocharres y residuos ganaderos disminuye la concentración de metales totales en el suelo, sin embargo la combinación con la fitoextracción por parte de *Sinapis alba* y *Brassica napus* no tiene un comportamiento claro ni repetitivo. Las especies vegetales son potencialmente acumuladoras pero su capacidad como hiperacumuladoras no se logró comprobar en todos los escenarios.

GENERAL CONCLUSIONS

The general conclusions for this PhD thesis were based in three principal effects: variation in soil pH and electrical conductivity, changes in soil biological properties (microbial biomass and enzyme activities) and fluctuation of metal content in the plant tissue and soils. With the following conclusions:

- In soil with an acid pH, the addition of biochars, hydrochars and animal manure increase the values above neutrality ($\text{pH} > 7$), but in soils with alkaline pH, the differences were insignificant with the addition of the amendments. The electrical conductivity have the same behaviour.
- The initial pH of the animal manure and the biochar and hydrochars were alkaline or near to neutrality, which improve the remediation process of the soils even with the addition of hydrochars that commonly present low pH values.
- All the organic amendments used in the experiments improve soil biological properties. The use of hydrochars increase soil microbial biomass and enzyme activities compare with biochar addition. Also, in soils amended with biochars at different temperatures the results were clear with the decrease of the soil microbiota with the biochar at higher temperature.
- The microbial biomass and enzyme activities are directly related, which implies the same trend in the results of these variables in all the experiments. The enzyme correspond to the substrate need for the microorganism to growth.
- The addition of biochar, hydrochars and animal manure decrease the total metal concentration in soils, but the combination with metal phytoextraction by *Sinapis alba* y *Brassica napus* did not seem to have a clear and repetitive behaviour. The plants are potential accumulator species but the capacity as hyperaccumulators was uncertain in some scenarios.

REFERENCIAS

- Abe, I., Iwasaki, S., Iwata, Y., Kominami, H., Kera, Y., 1998. Relationship between Production Method and Adsorption Property of Char. TANSO 1998, 277–284. <https://doi.org/10.7209/tanso.1998.277>
- Agegnehu, G., Bass, A.M., Nelson, P.N., Bird, M.I., 2016. Benefits of biochar, compost and biochar-compost for soil quality, maize yield and greenhouse gas emissions in a tropical agricultural soil. Sci. Total Environ. 543, 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.054>
- Agrafioti, E., Bouras, G., Kalderis, D., Diamadopoulos, E., 2013. Biochar production by sewage sludge pyrolysis. J. Anal. Appl. Pyrolysis 101, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2013.02.010>
- Ahmad, M., Lee, S.S., Lee, S.E., Al-Wabel, M.I., Tsang, D.C.W., Ok, Y.S., 2017. Biochar-induced changes in soil properties affected immobilization/mobilization of metals/metalloids in contaminated soils. J. Soils Sediments 17, 717–730. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1339-4>
- Ahmad, M., Rajapaksha, A.U., Lim, J.E., Zhang, M., Bolan, N., Mohan, D., Vithanage, M., Lee, S.S., Ok, Y.S., 2014. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. Chemosphere. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.071>
- Al Arni, S., 2018. Comparison of slow and fast pyrolysis for converting biomass into fuel. Renew. Energy 124, 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.04.060>
- Alburquerque, J.A., Calero, J.M., Barrón, V., Torrent, J., del Campillo, M.C., Gallardo, A., Villar, R., 2014. Effects of biochars produced from different feedstocks on soil properties and sunflower growth. J. Plant Nutr. Soil Sci. 177, 16–25. <https://doi.org/10.1002/jpln.201200652>
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. Chemosphere 91, 869–881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Alloway, B.J., 1995. Heavy Metals in Soils, 2nd ed. Springer Verlag.
- Alloway, B.J., 2013. Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability, Third. ed. Springer, London. <https://doi.org/10.1007/9789400744707>

- Al-Wabel, M.I., Al-Omran, A., El-Naggar, A.H., Nadeem, M., Usman, A.R.A., 2013. Pyrolysis temperature induced changes in characteristics and chemical composition of biochar produced from conocarpus wastes. *Bioresour. Technol.* 131, 374–379. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.165>
- Ameloot, N., Sleutel, S., Case, S.D.C., Alberti, G., Mcnamara, N.P., Zavalloni, C., Vervisch, B., Delle Vedove, G., De Neve, S., 2014. C mineralization and microbial activity in four biochar field experiments several years after incorporation. *Soil Biol. Biochem.* 78, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.08.004>
- Anca, F., Brindusa, C., Robu, M., Gavrilescu, M., 2011. Soil and groundwater cleanup : benefits and limits of emerging technologies 241–268. <https://doi.org/10.1007/s10098-010-0319-z>
- Angelova, V., Ivanova, R., Todorov, G., Ivanov, K., 2008. Heavy metal uptake by rape. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 39, 344–357. <https://doi.org/10.1080/00103620701826480>
- Angin, D., 2013. Effect of pyrolysis temperature and heating rate on biochar obtained from pyrolysis of safflower seed press cake. *Bioresour. Technol.* 128, 593–597. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.150>
- Antal, M.J., Grønli, M., 2003. The Art, Science, and Technology of Charcoal Production † . *Ind. Eng. Chem. Res.* 42, 1619–1640. <https://doi.org/10.1021/ie0207919>
- Bailey, V.L., Fansler, S.J., Smith, J.L., Bolton, H., 2011. Reconciling apparent variability in effects of biochar amendment on soil enzyme activities by assay optimization. *Soil Biol. Biochem.* 43, 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.10.014>
- Baker, A.J.M., Brooks, R.R., 1989. Terrestrial Higher Plants which Hyper- accumulate Metallic Elements - A Review of their Distribution , Ecology and Phytochemistry. *Biorecovery* 1, 81–126.
- Baker, D.E and senft, J.P. 1995. En: Alloway, B.J., 1995. Heavy Metals in Soils, 2nd ed. Springer Verlag.
- Bamminger, C., Marschner, B., Juschke, E., 2014. An incubation study on the stability and biological effects of pyrogenic and hydrothermal biochar in two soils. *Eur. J. Soil Sci.* 65, 72–82. <https://doi.org/10.1111/ejss.12074>

- Bargmann, I., Martens, R., Rillig, M.C., Kruse, A., Kücke, M., 2014a. Hydrochar amendment promotes microbial immobilization of mineral nitrogen. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 177, 59–67. <https://doi.org/10.1002/jpln.201300154>
- Bargmann, I., Rillig, M.C., Kruse, A., Greef, J.M., Kücke, M., 2014b. Effects of hydrochar application on the dynamics of soluble nitrogen in soils and on plant availability. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 177, 48–58. <https://doi.org/10.1002/jpln.201300069>
- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernández, T., García, C., 2008. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. *Geoderma* 147, 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2008.08.007>
- Beesley, L., Inneh, O.S., Norton, G.J., Moreno-Jimenez, E., Pardo, T., Clemente, R., Dawson, J.J.C., 2014. Assessing the influence of compost and biochar amendments on the mobility and toxicity of metals and arsenic in a naturally contaminated mine soil. *Environ. Pollut.* 186, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.11.026>
- Beesley, L., Marmiroli, M., 2011. The immobilisation and retention of soluble arsenic, cadmium and zinc by biochar. *Environ. Pollut.* 159, 474–480. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.10.016>
- Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Gomez-Eyles, J.L., 2010. Effects of biochar and greenwaste compost amendments on mobility, bioavailability and toxicity of inorganic and organic contaminants in a multi-element polluted soil. *Environ. Pollut.* 158, 2282–2287. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.02.003>
- Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Gomez-Eyles, J.L., Harris, E., Robinson, B., Sizmur, T., 2011. A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils. *Environ. Pollut.* 159, 3269–3282. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.07.023>
- Benedicto, J., Martínez- Gómez, C., Guerrero, J., Jornet, A., Rodríguez, C., 2008. Metal contamination in Portman Bay (Murcia , SE Spain) 15 years after the cessation of mining activities. *Ciencias Mar.* 34, 389–398.
- Bhargava, A., Carmona, F.F., Bhargava, M., Srivastava, S., 2012. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *J. Environ. Manage.* 105, 103–120.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.04.002>

- Blum, E.H., Schad, P., Nortcliff, S. (2018) *Essentials of Soils Science: Soil formation, functions, use and classification* (World Reference Base, WRB) (Borntraeger Science Publishers, Stuttgart).
- Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., Kirkham, M.B., Scheckel, K., 2014. Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils - To mobilize or to immobilize? *J. Hazard. Mater.* <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.018>
- Bolan, N.S., Szogi, A.A., Chuasavathi, T., Seshadri, B., Rothrock, M.J., Panneerselvam, P., 2010. Uses and management of poultry litter. *Worlds. Poult. Sci. J.* 66, 673–698. <https://doi.org/10.1017/s0043933910000656>
- Brady, N. C., & Weil, R. R. (2008). *The nature and properties of soils* (Vol. 360). Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall.
- Brown, T.T., Koenig, R.T., Huggins, D.R., Harsh, J.B., Rossi, R.E., 2008. Lime Effects on Soil Acidity, Crop Yield, and Aluminum Chemistry in Direct-Seeded Cropping Systems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 72, 634. <https://doi.org/10.2136/sssaj2007.0061>
- Brunetti, G., Farrag, K., Soler-Rovira, P., Nigro, F., Senesi, N., 2011. Greenhouse and field studies on Cr, Cu, Pb and Zn phytoextraction by *Brassica napus* from contaminated soils in the Apulia region, Southern Italy. *Geoderma* 160, 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.10.023>
- Busch, D., Kammann, C., Grünhage, L., Müller, C., 2012. Simple Biototoxicity Tests for Evaluation of Carbonaceous Soil Additives: Establishment and Reproducibility of Four Test Procedures. *J. Environ. Qual.* 41, 1023. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0122>
- Busch, D., Stark, A., Kammann, C.I., Glaser, B., 2013. Genotoxic and phytotoxic risk assessment of fresh and treated hydrochar from hydrothermal carbonization compared to biochar from pyrolysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 97, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.003>
- Calvelo Pereira, R., Kaal, J., Camps Arbestain, M., Pardo Lorenzo, R., Aitkenhead, W., Hedley, M., Macías, F., Hindmarsh, J., Maciá-Agulló, J. a., 2011. Contribution to characterisation of biochar to estimate the labile fraction of carbon. *Org. Geochem.* 42, 1331–1342. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2011.09.002>

- Cantrell, K.B., Hunt, P.G., Uchimiya, M., Novak, J.M., Ro, K.S., 2012. Impact of pyrolysis temperature and manure source on physicochemical characteristics of biochar. *Bioresour. Technol.* 107, 419–428. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.084>
- Cao, X., Harris, W., 2010. Properties of dairy-manure-derived biochar pertinent to its potential use in remediation. *Bioresour. Technol.* 101, 5222–5228. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2010.02.052>
- Cao, X., Ro, K.S., Chappell, M., Li, Y., Mao, J., 2011. Chemical structures of swine-manure chars produced under different carbonization conditions investigated by advanced solid-state¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Energy and Fuels* 25, 388–397. <https://doi.org/10.1021/ef101342v>
- Cárdenas- Aguiar, E., Gascó, G., Paz-Ferreiro, J., Méndez, A., 2017. The effect of biochar and compost from urban organic waste on plant biomass and properties of an artificially copper polluted soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 124, 223–232. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.05.014>
- CEC (Commission of the European Communities), 1986. “Council Directive of 12 June 1986, on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture”. Official journal of the European Communities, L181 (86/2781EEC): 6–12.
- Cely, P., Gascó, G., Paz-Ferreiro, J., Méndez, A., 2015. Agronomic properties of biochars from different manure wastes. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 111, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2014.11.014>
- Cely, P., Tarquis, A.M., Paz-Ferreiro, J., Méndez, A., Gascó, G., 2014. Factors driving the carbon mineralization priming effect in a sandy loam soil amended with different types of biochar. *Solid Earth* 5, 585–594. <https://doi.org/10.5194/se-5-585-2014>
- Cha, J.S., Park, S.H., Jung, S.C., Ryu, C., Jeon, J.K., Shin, M.C., Park, Y.K., 2016. Production and utilization of biochar: A review. *J. Ind. Eng. Chem.* 40, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.06.002>
- Chan, K.Y., Van Zwieten, L., Meszaros, I., Downie, A., Joseph, S., 2008. Using poultry litter biochars as soil amendments. *Aust. J. Soil Res.* 46, 437–444. <https://doi.org/10.1071/SR08036>

- Chang, T.C., Yen, J.H., 2006. On-site mercury-contaminated soils remediation by using thermal desorption technology 128, 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.07.053>
- Channiwala, S.A., Parikh, P.P., 2002. A unified correlation for estimating HHV of solid, liquid and gaseous fuels. *Fuel* 81, 1051–1063. [https://doi.org/10.1016/S0016-2361\(01\)00131-4](https://doi.org/10.1016/S0016-2361(01)00131-4)
- Chen, W.H., Ye, S.C., Sheen, H.K., 2012. Hydrothermal carbonization of sugarcane bagasse via wet torrefaction in association with microwave heating. *Bioresour. Technol.* 118, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.101>
- Chen, Y., Xu, J., Lv, Z., Xie, R., Huang, L., Jiang, J., 2018. Impacts of biochar and oyster shells waste on the immobilization of arsenic in highly contaminated soils. *J. Environ. Manage.* 217, 646–653. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.007>
- Cheng, C.H., Lehmann, J., Thies, J.E., Burton, S.D., Engelhard, M.H., 2006. Oxidation of black carbon by biotic and abiotic processes. *Org. Geochem.* 37, 1477–1488. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2006.06.022>
- Chintala, R., Mollinedo, J., Schumacher, T.E., Malo, D.D., Julson, J.L., 2014. Effect of biochar on chemical properties of acidic soil. *Arch. Agron. Soil Sci.* 60, 393–404. <https://doi.org/10.1080/03650340.2013.789870>
- Chopin, E.I.B., Alloway, B.J., 2007. Trace element partitioning and soil particle characterisation around mining and smelting areas at Tharsis, Ríotinto and Huelva, SW Spain. *Sci. Total Environ.* 373, 488–500. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.11.037>
- Conesa, H.M., Faz, Á., Arnaldos, R., 2006. Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailings of the semiarid Cartagena-La Unión mining district (SE Spain). *Sci. Total Environ.* 366, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.12.008>
- Consejería de Fomento, Ordenación del Territorio y Medio Ambiente- Principado de Asturias. 2014. Resolución del 20 de Marzo de 2014, de la Consejería de Fomento, Ordenación del Territorio y Medio Ambiente, por la que se establecen los Niveles Genéricos de Referencia para metales pesados en suelos del Principado de Asturias. Boletín Oficial del Principado de Asturias. No. 91.
- Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Junta de Andalucía. 2015. Decreto 18/2015, de 27 de Enero, por el que se aprueba el reglamento que regula el régimen

- aplicable a los suelos contaminados. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía. No. 38.
- Cross, A., Sohi, S.P., 2013. A method for screening the relative long-term stability of biochar. *GCB Bioenergy* 5, 215–220. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12035>
- Cueto- García, M. J. 2016. Potencial de producción de biochar en España a partir de residuos de la industria paperlera, de lodos de E.D.A.R., de residuos sólidos urbanos y de residuos ganaderos: Estudio de la fijación de carbono. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. 236 p.
- Danso-Boateng, E., Shama, G., Wheatley, A.D., Martin, S.J., Holdich, R.G., 2015. Hydrothermal carbonisation of sewage sludge: Effect of process conditions on product characteristics and methane production. *Bioresour. Technol.* 177, 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.096>
- de la Rosa, J.M., Rosado, M., Paneque, M., Miller, A.Z., Knicker, H., 2018. Effects of aging under field conditions on biochar structure and composition: Implications for biochar stability in soils. *Sci. Total Environ.* 613–614, 969–976. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.124>
- Demirbas, A., 2004. Bioenergy, Global Warming, and Environmental Impacts. *Energy Sources* 26, 225–236. <https://doi.org/10.1080/00908310490256581>
- Dhiman, S.S., Selvaraj, C., Li, J., Singh, R., Zhao, X., Kim, D., Young, J., Chan, Y., Lee, J., 2016. Phytoremediation of metal-contaminated soils by the hyperaccumulator canola (*Brassica napus* L .) and the use of its biomass for ethanol production. *Fuel* 183, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.06.025>
- Dias, B.O., Silva, C.A., Higashikawa, F.S., Roig, A., Sánchez-Monedero, M.A., 2010. Use of biochar as bulking agent for the composting of poultry manure: Effect on organic matter degradation and humification. *Bioresour. Technol.* 101, 1239–1246. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.024>
- Dieguez-Alonso, A., Funke, A., Anca-Couce, A., Rombolà, A., Ojeda, G., Bachmann, J., Behrendt, F., 2018. Towards Biochar and Hydrochar Engineering—Influence of Process Conditions on Surface Physical and Chemical Properties, Thermal Stability, Nutrient Availability, Toxicity and Wettability. *Energies* 11, 496. <https://doi.org/10.3390/en11030496>
- Diwan, H., Ahmad, A., Iqbal, M., 2010. Uptake-related parameters as indices of phytoremediation

- potential. *Biologia (Bratisl)*. 65, 1004–1011. <https://doi.org/10.2478/s11756-010-0106-7>
- Dong, X., Li, G., Lin, Q., Zhao, X., 2017. Quantity and quality changes of biochar aged for 5 years in soil under field conditions. *Catena* 159, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2017.08.008>
- Ebbs, S.D., Kochian, L. V., 1997. Toxicity of Zinc and Copper to Brassica Species: Implications for Phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 26, 776. <https://doi.org/10.2134/jeq1997.00472425002600030026x>
- European Comission (EC), 2002. Communication of 16 April 2002 from the Commission to the council, the European Parliament, the Economic and Social Committee and the Committee of the Regions: towards a thematic strategy for soil protection. European Commission, Brussels, Belgium, 39 pp.
- Ekpo, U., Ross, A.B., Camargo-Valero, M.A., Fletcher, L.A., 2016a. Influence of pH on hydrothermal treatment of swine manure: Impact on extraction of nitrogen and phosphorus in process water. *Bioresour. Technol.* 214, 637–644. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.05.012>
- Ekpo, U., Ross, A.B., Camargo-Valero, M.A., Williams, P.T., 2016b. A comparison of product yields and inorganic content in process streams following thermal hydrolysis and hydrothermal processing of microalgae, manure and digestate. *Bioresour. Technol.* 200, 951–960. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.018>
- Elzobair, K.A., Stromberger, M.E., Ippolito, J.A., Lentz, R.D., 2016. Contrasting effects of biochar versus manure on soil microbial communities and enzyme activities in an Aridisol. *Chemosphere* 142, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.06.044>
- Emino, E.R., Warman, P.R. 2004. Biological assay for compost quality. *Compost Sci. Util.* 12, 342–348.
- Enders, A., Hanley, K., Whitman, T., Joseph, S., Lehmann, J., 2012. Characterization of biochars to evaluate recalcitrance and agronomic performance. *Bioresour. Technol.* 114, 644–653. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.022>
- Eriksson, N., Adamek, P., 2000. The tailings pond failure at the Aznalcóllar mine , Spain 1. *Environ. Issues Manag. Waste Energy Miner. Prod.* 109–116.

- Eykelbosh, A.J., Johnson, M.S., Couto, E.G., 2015. Biochar decreases dissolved organic carbon but not nitrate leaching in relation to vinasse application in a Brazilian sugarcane soil. *J. Environ. Manage.* 149, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.09.033>
- Fang, J., Zhan, L., Ok, Y.S., Gao, B., 2018. Minireview of potential applications of hydrochar derived from hydrothermal carbonization of biomass. *J. Ind. Eng. Chem.* 57, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.08.026>
- FAO, 2015. Base Referencial Mundial del recurso del suelo 2014. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos., Base referencial mundial del recurso suelo 2014.
- Farooq, M.A., Li, L., Ali, B., Gill, R.A., Wang, J., Ali, S., Gill, M.B., Zhou, W., 2015. Oxidative injury and antioxidant enzymes regulation in arsenic-exposed seedlings of four *Brassica napus* L. Cultivars. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 10699–10712. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4269-1>
- Fauci, M.F., Dick, R.P., 1994. Soil Microbial Dynamics: Short- and Long-Term Effects of Inorganic and Organic Nitrogen. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58, 801. <https://doi.org/10.2136/sssaj1994.03615995005800030023x>
- Fernández-Caliani, J.C., Barba-Brioso, C., González, I., Galán, E., 2009. Heavy metal pollution in soils around the abandoned mine sites of the iberian pyrite belt (Southwest Spain). *Water. Air. Soil Pollut.* 200, 211–226. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9905-7>
- Figueiredo, C., Lopes, H., Coser, T., Vale, A., Busato, J., Aguiar, N., Novotny, E., Canellas, L., 2018. Influence of pyrolysis temperature on chemical and physical properties of biochar from sewage sludge. *Arch. Agron. Soil Sci.* 64, 881–889. <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1407870>
- Foged, H., Flotats Ripoll, X., Bonmatí Blasi, A., Palatsi Civit, J., Magrí Aloy, A., Schelde, K.M., 2011. Technical Report No. I to the European Commission, Directorate-General Environment, Manure Processing Activities in Europe - Project reference: ENV.B.1/ETU/2010/0007.
- Gao, P., Zhou, Y., Meng, F., Zhang, Y., Liu, Z., Zhang, W., Xue, G., 2016. Preparation and characterization of hydrochar from waste eucalyptus bark by hydrothermal carbonization.

- Energy 97, 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2015.12.123>
- García-Izquierdo, C., Gil-Sotres, F., Hernández-Fernández, T., Trasar-Cepeda, C. 2003. Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Mudi-Prensa. España. 371 p.
- Gascó, G., Paz-Ferreiro, J., Álvarez, M.L., Saa, A., Méndez, A., 2018. Biochars and hydrochars prepared by pyrolysis and hydrothermal carbonisation of pig manure. Waste Manag. 79, 395–403. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.08.015>
- Gascó, G., Paz-Ferreiro, J., Cely, P., Plaza, C., Méndez, A., 2016. Influence of pig manure and its biochar on soil CO₂ emissions and soil enzymes. Ecol. Eng. 95, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.039>
- Gascó, G., Paz-Ferreiro, J., Méndez, A., 2012. Thermal analysis of soil amended with sewage sludge and biochar from sewage sludge pyrolysis. J. Therm. Anal. Calorim. 108, 769–775. <https://doi.org/10.1007/s10973-011-2116-2>
- Gaskin, J.W., Steiner, C., Harris, K., Das, K.C., Bibens, B., 2008. Effect of Low-Temperature Pyrolysis Conditions on Biochar for Agricultural Use. Trans. ASABE 51, 2061–2069. <https://doi.org/10.13031/2013.25409>
- Ghanim, B.M., Kwapinski, W., Leahy, J.J., 2017. Hydrothermal carbonisation of poultry litter: Effects of initial pH on yields and chemical properties of hydrochars. Bioresour. Technol. 238, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.025>
- Ghanim, B.M., Pandey, D.S., Kwapinski, W., Leahy, J.J., 2016. Hydrothermal carbonisation of poultry litter: Effects of treatment temperature and residence time on yields and chemical properties of hydrochars. Bioresour. Technol. 216, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.087>
- Ghori, Z., Iftikhar, H., Bhatti, M.F., Nasar-um-Minullah, Sharma, I., Kazi, A.G., Ahmad, P., 2016. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soil, in: Parvaiz Ahmad (Ed.), Plant Metal Interaction. Elsevier, pp. 385–409. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803158-2.00015-1>
- Giesche, H., 2006. Mercury porosimetry: A general (practical) overview. Part. Part. Syst. Charact. 23, 9–19. <https://doi.org/10.1002/ppsc.200601009>

- Glaser, B., Lehmann, J., Zech, W., 2002. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal - A review. *Biol. Fertil. Soils* 35, 219–230. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0466-4>
- Gómez, A., Zubizarreta, J., Rodrigues, M., Dopazo, C., Fueyo, N., 2010. Potential and cost of electricity generation from human and animal waste in Spain. *Renew. Energy* 35, 498–505. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2009.07.027>
- Goyal, H.B., Seal, D., Saxena, R.C., 2008. Bio-fuels from thermochemical conversion of renewable resources: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 12, 504–517. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2006.07.014>
- Grimalt, J.O., Ferrer, M., Macpherson, E., 1999. The mine tailing accident in Aznalcollar, The Science of the Total Environment.
- Grummel, E. S., Davis, I. A. (1933). A new method of calculating the calorific value of a fuel from its ultimate analysis. *Fuel*, 12, 199-203.
- Guo, M., Uchimiya, S.M., He, Z., 2016. Production and Characterization of Biochar from Agricultural By- Products: Overview and Use of Cotton Biomass Residues, in: *Agricultural and Environmental Applications of Biochar: Advances and Barriers*. Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2136/sssaspecpub63.2014.0054>
- Guo, S., Dong, X., Wu, T., Zhu, C., 2016. Influence of reaction conditions and feedstock on hydrochar properties. *Energy Convers. Manag.* 123, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.06.029>
- Haynes, R.J., Naidu, R., 1998. Influence of lime, fertilizer and manure applications on soil organic matter. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 51, 123–137. <https://doi.org/10.1023/A:1009738307837>
- Heilmann, S.M., Molde, J.S., Timler, J.G., Wood, B.M., Mikula, A.L., Vozhdayev, G. V., Colosky, E.C., Spokas, K.A., Valentas, K.J., 2014. Phosphorus reclamation through hydrothermal carbonization of animal manures. *Environ. Sci. Technol.* 48, 10323–10329. <https://doi.org/10.1021/es501872k>
- Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Garbisu, C., 2008. Assessment of the phytoextraction potential of high biomass crop plants. *Environ. Pollut.* 152, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.002>

- Herrero, E.M., López-Gonzálvez, A., Ruiz, M.A., Lucas-García, J.A., Barbas, C., 2003. Uptake and distribution of zinc, cadmium, lead and copper in *Brassica napus* var. oleífera and *Helianthus annuus* grown in contaminated soils. *Int. J. Phytoremediation* 5, 153–167. <https://doi.org/10.1080/713610177>
- Hooda, P.S., 2010. *Trace Elements in Soils*. Wiley, London.
- Hosokai, S., Matsuoka, K., Kuramoto, K., Suzuki, Y., 2016. Modification of Dulong's formula to estimate heating value of gas, liquid and solid fuels. *Fuel Process. Technol.* 152, 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2016.06.040>
- Houben, D., Evrard, L., Sonnet, P., 2013. Beneficial effects of biochar application to contaminated soils on the bioavailability of Cd, Pb and Zn and the biomass production of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Biomass and Bioenergy* 57, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.07.019>
- Hwang, I.H., Ouchi, Y., Matsuto, T., 2007. Characteristics of leachate from pyrolysis residue of sewage sludge. *Chemosphere* 68, 1913–1919. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.060>
- Iqbal, H., Garcia-Perez, M., Flury, M., 2015. Effect of biochar on leaching of organic carbon, nitrogen, and phosphorus from compost in bioretention systems. *Sci. Total Environ.* 521–522, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.060>
- ISO 23479. (2007). Determination of effective cation exchange capacity (CEC) and exchangeable cations using a hexaminecobalt trichloride solution.
- Jaggi, N., 2006. *Handbook of Applied Solid State Spectroscopy*. <https://doi.org/10.1007/0-387-37590-2>
- Jefatura de estado. 2011. Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. B.O.E. No. 181.
- Jeffery, S., Verheijen, F.G.A., van der Velde, M., Bastos, A.C., 2011. A quantitative review of the effects of biochar application to soils on crop productivity using meta-analysis. *Agric. Ecosyst. Environ.* 144, 175–187. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.08.015>
- Jiménez- Ballesta, R y Navarro-Pedreño, J. Introducción a la contaminación de suelos. En:

- Jiménez- Ballesta, R. 2017. Introducción a la contaminación de suelos. Mundi-Prensa. España.p: 1- 21.
- Jing, F., Sohi, S.P., Liu, Y., Chen, J., 2018. Insight into mechanism of aged biochar for adsorption of PAEs: Reciprocal effects of ageing and coexisting Cd²⁺. *Environ. Pollut.* 242, 1098–1107. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.124>
- Jones, D.L., Rousk, J., Edwards-Jones, G., DeLuca, T.H., Murphy, D. V., 2012. Biochar-mediated changes in soil quality and plant growth in a three year field trial. *Soil Biol. Biochem.* 45, 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.10.012>
- Jordá, J.D., Juárez, M., Sánchez, J.J., Sánchez, A. (2004). Diagnóstico del potencial nutritivo del suelo. Publicaciones de la Universidad de Alicante. 86.
- JRC. 2014. Progress in the management of Contaminated Sites in Europe. <https://doi.org/10.2788/4658>
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. Trace Elements in Soils and Plants, 3rd ed.
- Kalderis, D., Kotti, M.S., Méndez, A., Gascó, G., 2014. Characterization of hydrochars produced by hydrothermal carbonization of rice husk. *Solid Earth* 5, 477–483. <https://doi.org/10.5194/se-5-477-2014>
- Kambo, H.S., Dutta, A., 2015. A comparative review of biochar and hydrochar in terms of production, physico-chemical properties and applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 45, 359–378. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.01.050>
- Kang, S., Li, X., Fan, J., Chang, J., 2012. Characterization of hydrochars produced by hydrothermal carbonization of lignin, cellulose, d-xylose, and wood meal. *Ind. Eng. Chem. Res.* 51, 9023–9031. <https://doi.org/10.1021/ie300565d>
- Kiekens, L. Zinc. In: Alloway BJ, editor. Heavy metals in soils, 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1995. p. 11 –37.
- Kim, K.H., Kim, J.Y., Cho, T.S., Choi, J.W., 2012. Influence of pyrolysis temperature on physicochemical properties of biochar obtained from the fast pyrolysis of pitch pine (*Pinus rigida*). *Bioresour. Technol.* 118, 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.094>
- Kim, M.S., Min, H.G., Koo, N., Park, J., Lee, S.H., Bak, G.I., Kim, J.G., 2014. The effectiveness

- of spent coffee grounds and its biochar on the amelioration of heavy metals-contaminated water and soil using chemical and biological assessments. *J. Environ. Manage.* 146, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.001>
- Kim, S.S., Agblevor, F.A., Lim, J., 2009. Fast pyrolysis of chicken litter and turkey litter in a fluidized bed reactor. *J. Ind. Eng. Chem.* 15, 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2008.10.004>
- Kloss, S., Zehetner, F., Dellantonio, A., Hamid, R., Ottner, F., Liedtke, V., Schwanninger, M., Gerzabek, M.H., Soja, G., 2012. Characterization of Slow Pyrolysis Biochars: Effects of Feedstocks and Pyrolysis Temperature on Biochar Properties. *J. Environ. Qual.* 41, 990. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0070>
- Kloss, S., Zehetner, F., Kitzler, B., Oburger, E., Wimmer, B., Buecker, J., Soja, G., Wenzel, W.W., 2014. Trace element concentrations in leachates and mustard plant tissue (*Sinapis alba* L.) after biochar application to temperate soils. *Sci. Total Environ.* 481, 498–508. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.093>
- KULeuven. 2014a. Determination of aqua regia soluble metals in soil. Division Soil and Water Management, Catholic University of Leuven.
- KULeuven. 2014b. Digestion of plant material for ICP- analysis. Division Soil and Water Management, Catholic University of Leuven.
- Kuppusamy, S., Thavamani, P., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R., 2016. Agronomic and remedial benefits and risks of applying biochar to soil: Current knowledge and future research directions. *Environ. Int.* 87, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.018>
- Lalande, R., Gagnon, B., Simard, R.R., Côté, D., 2011. Soil microbial biomass and enzyme activity following liquid hog manure application in a long-term field trial. *Can. J. Soil Sci.* 80, 263–269. <https://doi.org/10.4141/s99-064>
- Lammirato, C., Miltner, A., Kaestner, M., 2011. Effects of wood char and activated carbon on the hydrolysis of cellobiose by β -glucosidase from *Aspergillus niger*. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1936–1942. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.05.021>
- Lee, J.H., 2013. An overview of phytoremediation as a potentially promising technology for environmental pollution control. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 18, 431–439.

- <https://doi.org/10.1007/s12257-013-0193-8>
- Lehmann, J., Joseph, S., 2009a. Biochar for environmental management : An introduction. *Biochar Environ. Manag. - Sci. Technol.* 1, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.forpol.2009.07.001>
- Lehmann, J., Joseph, S., 2009b. *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*, First. ed. Earthscan, London, Sterling.
- Lehmann, J., Joseph, S., 2015. *Biochar for Environmental Management - Science, Technology and Implementation*, in: Routledge (Ed.), *Biochar for Environmental Management - Science, Technology and Implementation*. p. 976.
- Lehmann, J., Rillig, M.C., Thies, J., Masiello, C. a., Hockaday, W.C., Crowley, D., 2011. Biochar effects on soil biota - A review. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1812–1836. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.04.022>
- Li, M., Zhang, A., Wu, H., Liu, H., Lv, J., 2017. Predicting potential release of dissolved organic matter from biochars derived from agricultural residues using fluorescence and ultraviolet absorbance. *J. Hazard. Mater.* 334, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.03.064>
- Li, X., Wang, X., Chen, Y., Yang, X., Cui, Z., 2019. Optimization of combined phytoremediation for heavy metal contaminated mine tailings by a field-scale orthogonal experiment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 168, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.012>
- Li, Z., Jia, M., Christie, P., Ali, S., Wu, L., 2018. Use of a hyperaccumulator and biochar to remediate an acid soil highly contaminated with trace metals and/or oxytetracycline. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.061>
- Liang, C., Zhu, X., Fu, S., Méndez, A., Gascó, G., Paz-Ferreiro, J., 2014. Biochar alters the resistance and resilience to drought in a tropical soil. *Environ. Res. Lett.* 9, 064013. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/9/6/064013>
- Libra, J.A., Ro, K.S., Kammann, C., Funke, A., Berge, N.D., Neubauer, Y., Titirici, M.-M., Fühner, C., Bens, O., Kern, J., Emmerich, K.-H., 2011. Hydrothermal carbonization of biomass residuals: a comparative review of the chemistry, processes and applications of wet and dry pyrolysis. *Biofuels* 2, 71–106. <https://doi.org/10.4155/bfs.10.81>
- Liu, L., Li, W., Song, W., Guo, M., 2018. Remediation techniques for heavy metal-contaminated

- soils: Principles and applicability. *Sci. Total Environ.* 633, 206–219. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.161>
- Liu, Y., Yao, S., Wang, Y., Lu, H., Brar, S.K., Yang, S., 2017. Bio- and hydrochars from rice straw and pig manure: Inter-comparison. *Bioresour. Technol.* 235, 332–337. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.103>
- Liu, Y., Zhu, J., Ye, C., Zhu, P., Ba, Q., Pang, J., Shu, L., 2018. Effects of biochar application on the abundance and community composition of denitrifying bacteria in a reclaimed soil from coal mining subsidence area. *Sci. Total Environ.* 625, 1218–1224. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.003>
- Lomaglio, T., Hattal-Hambli, N., Bret, A., Miard, F., Trupiano, D., Scippa, G.S., Motelica-Heino, M., Bourgerie, S., Morabito, D., 2017. Effect of biochar amendments on the mobility and (bio) availability of As, Sb and Pb in a contaminated mine technosol. *J. Geochemical Explor.* 182, 138–148. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2016.08.007>
- López, M. Estudio de la Contaminación por Metales Pesados en Suelos Agrícolas de la Comarca Minera de Riotinto; Trabajo de investigación, para la obtención del Diploma de Estudios Avanzados, Universidad de Sevilla: Sevilla, Spain, 2006.
- Lu, H., Li, Z., Fu, S., Méndez, A., Gascó, G., Paz-Ferreiro, J., 2015. Combining phytoextraction and biochar addition improves soil biochemical properties in a soil contaminated with Cd. *Chemosphere* 119, 209–216. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.024>
- Lu, H.P., Li, Z.A., Gascó, G., Méndez, A., Shen, Y., Paz-Ferreiro, J., 2018. Use of magnetic biochars for the immobilization of heavy metals in a multi-contaminated soil. *Sci. Total Environ.* 622–623, 892–899. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.056>
- Major, J., Rondon, M., Molina, D., Riha, S.J., Lehmann, J., 2010. Maize yield and nutrition during 4 years after biochar application to a Colombian savanna oxisol. *Plant Soil* 333, 117–128. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0327-0>
- Mäkelä, M., Benavente, V., Fullana, A., 2015. Hydrothermal carbonization of lignocellulosic biomass: Effect of process conditions on hydrochar properties. *Appl. Energy* 155, 576–584. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.06.022>
- Malagoli, M., Rossignolo, V., Salvalaggio, N., Schiavon, M., 2014. Potential for phytoextraction

- of copper by *Sinapis alba* and *Festuca rubra* cv. Merlin grown hydroponically and in vineyard soils. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 3294–3303. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2307-4>
- Malik, M., Khan, K., Marschner, P., Fayyaz-ul-Hassan, 2013. Microbial biomass, nutrient availability and nutrient uptake by wheat in two soils with organic amendments. *J. soil Sci. plant Nutr.* 0–0. <https://doi.org/10.4067/s0718-95162013005000075>
- Marchand, L., Pelosi, C., González-Centeno, M.R., Maillard, A., Ourry, A., Galland, W., Teissedre, P.L., Bessoule, J.J., Mongrand, S., Morvan-Bertrand, A., Zhang, Q., Grosbellet, C., Bert, V., Oustrière, N., Mench, M., Brunel-Muguet, S., 2016. Trace element bioavailability, yield and seed quality of rapeseed (*Brassica napus* L.) modulated by biochar incorporation into a contaminated technosol. *Chemosphere* 156, 150–162. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.129>
- Martínez-Sánchez, M.J., Pérez-Sirvent, C., Molina-Ruiz, J., Tudela, M.L., García-Lorenzo, M.L., 2011. Monitoring salinization processes in soils by using a chemical degradation indicator. *J. Geochemical Explor.* 109, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2011.01.007>
- Méndez, A., Barriga, S., Guerrero, F., Gascó, G., 2011. Thermal analysis of growing media obtained from mixtures of paper mill waste materials and sewage sludge. *J. Therm. Anal. Calorim.* 104, 213–221. <https://doi.org/10.1007/s10973-010-1227-5>
- Méndez, A., Gascó, G., Ruiz, B., Fuente, E., 2019. Hydrochars from industrial macroalgae “*Gelidium Sesquipedale*” biomass wastes. *Bioresour. Technol.* 275, 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.074>
- Méndez, A., Paz-Ferreiro, J., Gil, E., Gascó, G., 2015. The effect of paper sludge and biochar addition on brown peat and coir based growing media properties. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 193, 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.032>
- Méndez, A., Tarquis, A.M., Saa-Requejo, A., Guerrero, F., Gascó, G., 2013. Influence of pyrolysis temperature on composted sewage sludge biochar priming effect in a loamy soil. *Chemosphere* 93, 668–676. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.004>
- Mierzwa-Hersztek, M., Gondek, K., Baran, A., 2016. Effect of poultry litter biochar on soil enzymatic activity, ecotoxicity and plant growth. *Appl. Soil Ecol.* 105, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.006>

- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). 1990. Real Decreto 1310/1990, de 29 de Octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. B.O.E. No. 262.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). 2005. Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. B.O.E. No. 15.
- Ministerio de la Presidencia (MPR). 2010. Real Decreto 865/2010, de 2 de Julio, sobre sustratos de cultivo. B.O.E. No. 170.
- Ministerio de la Presidencia (MPR). 2013. Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes. B.O.E. No. 164.
- Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente (MOPTMA). 1995. Resolución de 28 de abril de 1995, de la secretaría de Estado de Medio Ambiente y Vivienda, por la que se dispone la publicación del Acuerdo del Consejo de Ministros de 17 de febrero de 1995, por el que se aprueba el Plan Nacional de Recuperación de Suelos Contaminados. B.O.E. No. 114.
- Mokolobate, M.S., Haynes, R.J., 2002. Comparative liming effect of four organic residues applied to an acid soil. *Biol. Fertil. Soils* 35, 79–85. <https://doi.org/10.1007/s00374-001-0439-z>
- Mukherjee, A., Zimmerman, A.R., Hamdan, R., Cooper, W.T., 2014. Physicochemical changes in pyrogenic organic matter (biochar) after 15 months of field aging. *Solid Earth* 5, 693–704. <https://doi.org/10.5194/se-5-693-2014>
- Nakason, K., Panyapinyopon, B., Kanokkantung, V., Viriya-empikul, N., Kraithong, W., Pavasant, P., 2016. Characteristics of hydrochar and liquid fraction from hydrothermal carbonization of cassava rhizome. *J. Energy Inst.* <https://doi.org/10.1016/j.joei.2017.01.002>
- Nelson, D.W., Sommers, L.E. 1996. Total carbon, organic carbon and organic matter, En: *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin. 961–1010.
- Nieto, A., Gascó, G., Paz-Ferreiro, J., Fernández, J.M., Plaza, C., Méndez, A., 2016. The effect of pruning waste and biochar addition on brown peat based growing media properties. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 199, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.012>

- Nizamuddin, S., Baloch, H.A., Griffin, G.J., Mubarak, N.M., Bhutto, A.W., Abro, R., Mazari, S.A., Ali, B.S., 2017. An overview of effect of process parameters on hydrothermal carbonization of biomass. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 73, 1289–1299. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.122>
- Obia, A., Børresen, T., Martinsen, V., Cornelissen, G., Mulder, J., 2017. Vertical and lateral transport of biochar in light-textured tropical soils. *Soil Tillage Res.* 165, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.still.2016.07.016>
- Oliveira, F.R., Patel, A.K., Jaisi, D.P., Adhikari, S., Lu, H., Khanal, S.K., 2017. Environmental application of biochar: Current status and perspectives. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.122>
- Oliveira, I., Blöhse, D., Ramke, H.G., 2013. Hydrothermal carbonization of agricultural residues. *Bioresour. Technol.* 142, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.125>
- Ortiz, B., Sanz, J., Dorado, M., Villar, S., 2007. Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Univ. Alcalá. Dir. Gen. 109.
- Pachura, P., Ociepa-Kubicka, A., Skowron-Grabowska, B., 2016. Assessment of the availability of heavy metals to plants based on the translocation index and the bioaccumulation factor. *Desalin. Water Treat.* 57, 1469–1477. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1017330>
- Paneque, M., De la Rosa, J.M., Kern, J., Reza, M.T., Knicker, H., 2017. Hydrothermal carbonization and pyrolysis of sewage sludges: What happen to carbon and nitrogen? *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 128, 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2017.09.019>
- Park, J.H., Choppala, G., Lee, S.J., Bolan, N., Chung, J.W., Edraki, M., 2013. Comparative sorption of Pb and Cd by biochars and its implication for metal immobilization in soils. *Water. Air. Soil Pollut.* 224, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1711-1>
- Paz-Ferreiro, J., Gascó, G., Gutiérrez, B., Méndez, A., 2012. Soil biochemical activities and the geometric mean of enzyme activities after application of sewage sludge and sewage sludge biochar to soil. *Biol. Fertil. Soils* 48, 511–517. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0644-3>
- Paz-Ferreiro, J., Lu, H., Fu, S., Méndez, A., Gascó, G., 2014. Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: A review. *Solid Earth* 5, 65–75. <https://doi.org/10.5194/se-5-65-2014>

- Peng, C., Zhai, Y., Zhu, Y., Xu, B., Wang, T., Li, C., Zeng, G., 2016. Production of char from sewage sludge employing hydrothermal carbonization: Char properties, combustion behavior and thermal characteristics. *Fuel* 176, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.02.068>
- Pietro, M., Paola, C., 2004. Thermal analysis for the evaluation of the organic matter evolution during municipal solid waste aerobic composting process. *Thermochim. Acta* 413, 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2003.09.026>
- Puccini, M., Ceccarini, L., Antichi, D., Seggiani, M., Tavarini, S., Latorre, M.H., Vitolo, S., 2018. Hydrothermal carbonization of municipal woody and herbaceous prunings: Hydrochar valorisation as soil amendment and growth medium for horticulture. *Sustain.* 10. <https://doi.org/10.3390/su10030846>
- Puga, A.P., Melo, L.C.A., de Abreu, C.A., Coscione, A.R., Paz-Ferreiro, J., 2016. Leaching and fractionation of heavy metals in mining soils amended with biochar. *Soil Tillage Res.* 164, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.still.2016.01.008>
- Pukalchik, M., Mercl, F., Panova, M., Břendová, K., Terekhova, V.A., Tlustoš, P., 2017. The improvement of multi-contaminated sandy loam soil chemical and biological properties by the biochar, wood ash, and humic substances amendments. *Environ. Pollut.* 229, 516–524. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.021>
- Purakayastha, T.J., Viswanath, T., Bhadraray, S., Chhonkar, P.K., Adhikari, P.P., Suribabu, K., 2008. Phytoextraction of zinc, copper, nickel and lead from a contaminated soil by different species of Brassica. *Int. J. Phytoremediation* 10, 61–72. <https://doi.org/10.1080/15226510701827077>
- Qambrani, N.A., Rahman, M.M., Won, S., Shim, S., Ra, C., 2017. Biochar properties and eco-friendly applications for climate change mitigation, waste management, and wastewater treatment: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.057>
- Rahman, M.M., Azirun, S.M., Boyce, A.N., 2013. Enhanced Accumulation of Copper and Lead in Amaranth (*Amaranthus paniculatus*), Indian Mustard (*Brassica juncea*) and Sunflower (*Helianthus annuus*). *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062941>
- Reza, M.T., Andert, J., Wirth, B., Busch, D., Pielert, J., Lynam, J.G., Mumme, J., 2014. Hydrothermal Carbonization of Biomass for Energy and Crop Production. *Appl. Bioenergy*

- 1, 11–29. <https://doi.org/10.2478/apbi-2014-0001>
- Reza, M.T., Lynam, J.G., Uddin, M.H., Coronella, C.J., 2013. Hydrothermal carbonization: Fate of inorganics. *Biomass and Bioenergy* 49, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.12.004>
- Riffaldi, R., Levi-Minzi, R., Soldatini, G.F., 1976. Adsorption by Soils. *Water, Air, Soil Pollut.* 21, 119–128.
- Rodríguez-Vila, A., Asensio, V., Forján, R., Covelo, E.F., 2015. Chemical fractionation of Cu, Ni, Pb and Zn in a mine soil amended with compost and biochar and vegetated with *Brassica juncea* L. *J. Geochemical Explor.* 158, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2015.07.005>
- Rombolà, A.G., Marisi, G., Torri, C., Fabbri, D., Buscaroli, A., Ghidotti, M., Hornung, A., 2015. Relationships between Chemical Characteristics and Phytotoxicity of Biochar from Poultry Litter Pyrolysis. *J. Agric. Food Chem.* 63, 6660–6667. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01540>
- Rossi, G., Figliolia, A., Socciarelli, S., Pennelli, B., 2002. Capability of *Brassica napus* to accumulate cadmium, zinc and copper from soil. *Acta Biotechnol.* 22, 133–140. [https://doi.org/10.1002/1521-3846\(200205\)22:1/2<133::AID-ABIO133>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1521-3846(200205)22:1/2<133::AID-ABIO133>3.0.CO;2-3)
- Sadiq, M., 1997. Arsenic chemistry in soils : an overview of thermodynamic predictions and field observations. *Water; Air, Soil Pollut.* 93, 117–136. <https://doi.org/10.1023/A:1022135909197>
- Salminen, R., Batista, M., Bidovec, M., Demetriades, A., 2005. Geochemical atlas of Europe (FOREGS). Part 1–background information, methodology and maps.’.
- Saxena, R.C., Adhikari, D.K., Goyal, H.B., 2009. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 13, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2007.07.011>
- Sharpley, A.N., Smith, S.J., Bain, W.R., 1993. Nitrogen and Phosphorus Fate from Long-Term Poultry Litter Applications to Oklahoma Soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 57, 1131–1137. <https://doi.org/10.2136/sssaj1993.03615995005700040041x>
- Schimmelpfennig, S., Glaser, B., 2012. One Step Forward toward Characterization: Some

- Important Material Properties to Distinguish Biochars. *J. Environ. Qual.* 41, 1001. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0146>
- Shinogi, Y., 2004. Nutrient leaching from carbon products of sludge. *ASAE Annu. Int. Meet.* 2004 4951–4960. <https://doi.org/10.13031/2013.16774>
- Sigua, G.C., Novak, J.M., Watts, D.W., Ippolito, J.A., Ducey, T.F., Johnson, M.G., Spokas, K.A., 2019. Phytostabilization of Zn and Cd in Mine Soil Using Corn in Combination with Manure-Based Biochar and Compost. *Preprints* 1–22. <https://doi.org/10.20944/preprints201905.0019.v1>
- Silva, C.C., Melo, C.A., Soares Junior, F.H., Moreira, A.B., Ferreira, O.P., Bisinoti, M.C., 2016. Effect of the reaction medium on the immobilization of nutrients in hydrochars obtained using sugarcane industry residues. *Bioresour. Technol.* 237, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.004>
- Smith, J.L., Collins, H.P., Bailey, V.L., 2010. The effect of young biochar on soil respiration. *Soil Biol. Biochem.* 42, 2345–2347. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.09.013>
- Sohi, S., Lopez-Capel, E., Krull, E., Bol, R., 2009. Biochar, Climate Change and Soil: A Review to Guide Future Research. *CSIRO L. Water Sci.* 64. <https://doi.org/10.1139/Z03-132>
- Song, C., Shan, S., Müller, K., Wu, S., Niazi, N.K., Xu, S., Shen, Y., Rinklebe, J., Liu, D., Wang, H., 2017. Characterization of pig manure-derived hydrochars for their potential application as fertilizer. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0301-y>
- Song, W., Guo, M., 2012. Quality variations of poultry litter biochar generated at different pyrolysis temperatures. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 94, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2011.11.018>
- Sonia, M.T., Nora, F.Y.T., 2002. Characterization and composting of poultry litter in forced-aeration piles. *Process Biochem.* 37, 869–880.
- Souhila, A., Mameri, N., Abdi, N., Grib, H., Lounici, H., Drouiche, N., 2016. Phytoremediation of soil contaminated with Zn using Canola (*Brassica napus* L). *Ecol. Eng.* 95, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.064>
- Spokas, K.A., Cantrell, K.B., Novak, J.M., Archer, D.W., Ippolito, J.A., Collins, H.P., Boateng,

- A.A., Lima, I.M., Lamb, M.C., McAloon, A.J., Lentz, R.D., Nichols, K.A., 2012. Biochar: A Synthesis of Its Agronomic Impact beyond Carbon Sequestration. *J. Environ. Qual.* 41, 973. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0069>
- Sposito, G., Page, A., 1984. *Cycling of metal ions in the soil environment*. Dekker, p. 397.
- Steiner, C., Harttung, T., 2014. Biochar as a growing media additive and peat substitute. *Solid Earth* 5, 995–999. <https://doi.org/10.5194/se-5-995-2014>
- Suliman, W., Harsh, J.B., Abu-Lail, N.I., Fortuna, A.M., Dallmeyer, I., Garcia-Perez, M., 2016. Influence of feedstock source and pyrolysis temperature on biochar bulk and surface properties. *Biomass and Bioenergy* 84, 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.11.010>
- Sumner, M.E., 2000. *Handbook of Soil Science*. CRC Press.
- Sun, K., Ro, K., Guo, M., Novak, J., Mashayekhi, H., Xing, B., 2011. Sorption of bisphenol A, 17 α -ethinyl estradiol and phenanthrene on thermally and hydrothermally produced biochars. *Bioresour. Technol.* 102, 5757–5763. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.038>
- Sun, Y., Gao, B., Yao, Y., Fang, J., Zhang, M., Zhou, Y., Chen, H., Yang, L., 2014. Effects of feedstock type, production method, and pyrolysis temperature on biochar and hydrochar properties. *Chem. Eng. J.* <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.10.081>
- Tang, J., Zhu, W., Kookana, R., Katayama, A., 2013. Characteristics of biochar and its application in remediation of contaminated soil. *J. Biosci. Bioeng.* <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.05.035>
- Thomas, G. W. Soil pH and soil acidity, En: Sparks, D.L., Bartels, J.M., Bigham, J.M. 1996. *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin. 113-142.
- Tortosa Masiá, A.A., Buhre, B.J.P., Gupta, R.P., Wall, T.F., 2007. Characterising ash of biomass and waste. *Fuel Process. Technol.* 88, 1071–1081. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2007.06.011>
- Tóth, G., Hermann, T., Da Silva, M.R., Montanarella, L., 2016. Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environ. Int.* 88, 299–309.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.017>

- Turan, M., Esringü, A., 2007. Phytoremediation based on canola (*Brassica napus* L.) and Indian mustard (*Brassica juncea* L.) planted on spiked soil by aliquot amount of Cd, Cu, Pb, and Zn. *Plant, Soil Environ.* 53, 7–15. <https://doi.org/10.17221/3188-PSE>
- Uchimiya, M., Cantrell, K.B., Hunt, P.G., Novak, J.M., Chang, S., 2012. Retention of Heavy Metals in a Typic Kandudult Amended with Different Manure-based Biochars. *J. Environ. Qual.* 41, 1138. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0115>
- Ussiri, D.A.N., Jacinthe, P.A., Lal, R., 2014. Methods for determination of coal carbon in reclaimed minesoils: A review. *Geoderma* 214–215, 155–167. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.09.015>
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19, 703–707. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- Vassilev, S. V., Baxter, D., Andersen, L.K., Vassileva, C.G., 2010. An overview of the chemical composition of biomass. *Fuel* 89, 913–933. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2009.10.022>
- Vega, F.A., Covelo, E.F., Andrade, M.L., Marcet, P., 2004. Relationships between heavy metals content and soil properties in minesoils. *Anal. Chim. Acta* 524, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.06.073>
- Wang, T., Camps-Arbestain, M., Hedley, M., Bishop, P., 2012. Predicting phosphorus bioavailability from high-ash biochars. *Plant Soil* 357, 173–187. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1131-9>
- Wang, T., Zhai, Y., Zhu, Y., Li, C., Zeng, G., 2018. A review of the hydrothermal carbonization of biomass waste for hydrochar formation: Process conditions, fundamentals, and physicochemical properties. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 90, 223–247. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.071>
- Wang, X., Song, D., Liang, G., Zhang, Q., Ai, C., Zhou, W., 2015. Maize biochar addition rate influences soil enzyme activity and microbial community composition in a fluvo-aquic soil. *Appl. Soil Ecol.* 96, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.08.018>

- Watanabe, F.S., Olsen, S.R. 1965 . Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO₃ extracts from soils. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 29, 677-678.
- Wengel, M., Kothe, E., Schmidt, C.M., Heide, K., Gleixner, G., 2006. Degradation of organic matter from black shales and charcoal by the wood-rotting fungus *Schizophyllum commune* and release of DOC and heavy metals in the aqueous phase. *Sci. Total Environ.* 367, 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.12.012>
- Wong, M., 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 50, 775–780. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00232-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00232-1)
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E., 2011. Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecol.* 2011, 1–20. <https://doi.org/10.5402/2011/402647>
- Xiao, W., Hu, Z., Fu, Y., 2014. Zoning of land reclamation in coal mining area and new progresses for the past 10 years. *Int. J. Coal Sci. Technol.* 1, 177–183. <https://doi.org/10.1007/s40789-014-0024-3>
- Xu, Y., Chen, B., 2013. Investigation of thermodynamic parameters in the pyrolysis conversion of biomass and manure to biochars using thermogravimetric analysis. *Bioresour. Technol.* 146, 485–493. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.086>
- Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P.J., 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 339–353. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.007>
- Yuan, H., Lu, T., Zhao, D., Huang, H., Noriyuki, K., Chen, Y., 2013. Influence of temperature on product distribution and biochar properties by municipal sludge pyrolysis. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* 15, 357–361. <https://doi.org/10.1007/s10163-013-0126-9>
- Yuan, J.H., Xu, R.K., Zhang, H., 2011. The forms of alkalis in the biochar produced from crop residues at different temperatures. *Bioresour. Technol.* 102, 3488–3497. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.018>
- Zbytniewski, R., Buszewski, B., 2005. Characterization of natural organic matter (NOM) derived from sewage sludge compost. Part 1: chemical and spectroscopic properties. *Bioresour.*

- Technol. 96, 471–478. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.05.018>
- Zebarth, B.J., Neilsen, G.H., Hogue, E., Neilsen, D., 2011. Influence of organic waste amendments on selected soil physical and chemical properties. *Can. J. Soil Sci.* 79, 501–504. <https://doi.org/10.4141/s98-074>
- Zemanová, V., Břendová, K., Pavlíková, D., Kubátová, P., Tlustoš, P., 2017. Effect of biochar application on the content of nutrients (Ca, Fe, K, Mg, Na, P) and amino acids in subsequently growing spinach and mustard. *Plant, Soil Environ.* 63, 322–327. <https://doi.org/10.17221/318/2017-pse>
- Zhang, X., Wang, H., He, L., Lu, K., Sarmah, A., Li, J., Bolan, N.S., Pei, J., Huang, H., 2013. Using biochar for remediation of soils contaminated with heavy metals and organic pollutants. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 8472–83. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1659-0>
- Zhao, L., Cao, X., Mašek, O., Zimmerman, A., 2013. Heterogeneity of biochar properties as a function of feedstock sources and production temperatures. *J. Hazard. Mater.* 256–257, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.04.015>
- Zhao, R., Coles, N., Wu, J., 2015. Carbon mineralization following additions of fresh and aged biochar to an infertile soil. *Catena* 125, 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2014.10.026>
- Zhao, S.X., Ta, N., Wang, X.D., 2017. Effect of temperature on the structural and physicochemical properties of biochar with apple tree branches as feedstock material. *Energies* 10. <https://doi.org/10.3390/en10091293>
- Zhu, X., Liu, Y., Qian, F., Zhang, S., Chen, J., 2015. Investigation on the Physical and Chemical Properties of Hydrochar and Its Derived Pyrolysis Char for Their Potential Application: Influence of Hydrothermal Carbonization Conditions. *Energy and Fuels* 29, 5222–5230. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.5b00512>
- Zimmerman, A.R., Gao, B., Ahn, M.Y., 2011. Positive and negative carbon mineralization priming effects among a variety of biochar-amended soils. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1169–1179. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.02.005>
- Zucconi, F., Monaco, A., Forte, M., De Bertoldi, M. 1985. Phytotoxins during the stabilization of

organic matter, in: Gasser, J.K.R. (Ed.), Composting of agricultural and other wastes. Elsevier, London.