



***Recuperación y rehabilitación de suelos  
contaminados con elementos traza mediante la  
aplicación de enmiendas y el establecimiento de  
una cubierta vegetal natural o de una planta de  
crecimiento rápido (*Paulownia fortunei*).***

Memoria que presenta  
**Jian Xiong**  
Para optar al título de Doctor por la  
Universidad de Sevilla

Sevilla, septiembre de 2015



**Recuperación y rehabilitación de suelos  
contaminados con elementos traza mediante  
la aplicación de enmiendas y el  
establecimiento de una cubierta vegetal  
natural o de una planta de crecimiento rápido  
(*Paulownia fortunei*).**

Visado en Sevilla, septiembre de 2015

LOS DIRECTORES

Dr. D. Francisco de Paula Cabrera Capitán  
Profesor de Investigación  
IRNAS, CSIC

Dra. Dña. Engracia María Madejón Rodríguez  
Investigador Científico  
IRNAS, CSIC

EL TUTOR

Dra. Dña. Rosario Vaz Pardal  
Profesor Titular de la Universidad de Sevilla



**DOCTOR D. JOSÉ ENRIQUE FERNÁNDEZ LUQUE, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA (IRNAS) DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)**

**Certifica:** Que la presente Memoria de Investigación titulada “**Recuperación y rehabilitación de suelos contaminados con elementos traza mediante la aplicación de enmiendas y el establecimiento de una cubierta vegetal natural o de una planta de crecimiento rápido (*Paulownia fortunei*)**”, presentada por **D. Jian Xiong** para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de **Protección del Sistema Suelo, Planta, Agua del IRNAS**, bajo la dirección de los **Drs. D. Francisco de Paula Cabrera Capitán y Dña. Engracia María Madejón Rodríguez**, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

En Sevilla, septiembre de 2015



**El presente trabajo de investigación se ha realizado gracias a una beca predoctoral del China Scholarship Council, en el marco de las actividades del grupo de investigación de la Junta de Andalucía, Utilización de Fertilizantes. Impacto Ambiental (UTFERTIM), Programa Operativo FEDER de Andalucía 2007-2013 (PAIDI AGR108), del proyecto de Investigación de Excelencia de la Junta de Andalucía (RNM-6398) y del proyecto de Plan Nacional de Investigación (AGL2011-23617).**





## **AGRADECIMIENTOS**

A los Drs. Francisco Cabrera y Engracia Madejón, directores de este trabajo, por su interés, implicación y conocimientos transmitidos, por su ayuda en la sistematización y estructuración del trabajo, por sus correcciones y sugerencias en el contenido, por sus enseñanzas en el análisis estadístico de los datos y en la interpretación de los resultados, por su dedicación desde el inicio hasta la redacción final, y sobre todo por su paciencia y amistad, sin su ayuda no estaría aquí hoy. Muchas Gracias.

A la Dra. María del Rosario Vaz, tutor de este trabajo, por haber aceptado la tutoría del mismo, así como por su amabilidad y disponibilidad para cualquier consulta.

A la dirección del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla IRNAS-CSIC, por haber permitido el desarrollo de este trabajo en sus instalaciones.

A todo el personal del Departamento “Protección del sistema suelo, planta, agua” y a todo el personal del IRNAS, especialmente a Paula, Patri, Rosa, Iván, Lisa y Marco por su compañía, por su ayuda en mi trabajo, por haber hecho más agradables los días pasados en el Instituto y por haberme ayudado a conocer el ambiente de Sevilla.

A Piluka, Chona, Cristina, Eli, Rocío y Álvaro y todo los que trabajan en el laboratorio de análisis por el interés y la disponibilidad mostrada hacia mi trabajo y por tratarme siempre tan bien.

A Ignacio Girón por ayudarme en todas mis instalaciones y por todos los favores realizados que han facilitado muchísimo el desarrollo del experimento.

A mis padres y mis hermanas por darme lo mejor de ellos y por su apoyo constante incluso en la distancia.

A los compañeros del curso de doctorado por haber hecho más interesante y alegre todas las clases.

A todos mis amigos sevillanos o no, que aunque no hayan participado en mi trabajo me han hecho pasar buenos ratos y por todas las risas compartidas cuando más lo necesitaba.



## ÍNDICE

Resumen	i
Summary	vii
论文摘要	xii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
I.1. Concepto de contaminación del suelo. Vulnerabilidad y capacidad de atenuación natural del suelo	3
I.2. Concepto de biodisponibilidad de los contaminantes	5
I.3. Elementos traza (ET) y su origen en el medioambiente	11
I.4. Problemática de los suelos contaminados y su recuperación	17
I.4.1. Recuperación natural asistida	19
I.4.2. Biorrecuperación	20
I.4.2.1. <i>Fitorrecuperación de suelos contaminados</i>	20
I.4.3. Necesidad del uso de enmiendas	22
I.4.4. Importancia de las cubiertas vegetales en la recuperación de suelos Contaminados	24
I.4.4.1. <i>La vegetación espontánea</i>	24
I.4.4.2. <i>Uso de plantas de crecimiento rápido. Caso de Estudio</i> <i>Paulownia sp.</i>	26
I.5. Papel de las enmiendas y del establecimiento de una cubierta vegetal sobre el aumento de la biodiversidad ecológica y en el secuestro de C en suelos degradados y contaminados	27
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>37</b>
III. 1. Área de estudio	39
III. 2. Materiales	42
III.2.1 Suelos	42
III.2.2 Enmiendas	43
III.2.2.1. <i>Espuma de azucarera</i>	43
III.2.2.2. <i>Compost de biosólidos</i>	43
III.2.2.3. <i>Leonardita</i>	44
III.2.2.4. <i>Compost de alperujo</i>	44
III.3. Diseño de los experimentos	45
III.3.1. Diseño del experimento de campo	45
III.3.1.1. <i>Nuevo muestreo (realizado dentro el trabajo experimental</i> <i>de la presente Tesis)</i>	47
III.3.2. Diseño del experimento en condiciones de semicampo	47
III.3.3. Preparación de las muestras de suelo	50
III.3.4 Análisis de suelos	50
III.3.4.1. <i>Determinación de la textura del suelo original</i>	50
III.3.4.2. <i>Determinación del pH</i>	50
III.3.4.3. <i>Determinación del C orgánico oxidable (COT)</i>	50

III.3.4.4. Determinación del C hidrosoluble (COS)	51
III.3.4.5. Determinación del N-Kjeldahl	51
III.3.4.5. Determinación del P disponible	51
III.3.4.6. Determinación del K disponible	51
III.3.4.7. Determinación de elementos traza pseudototales	51
III.3.4.8. Extracción secuencial de los elementos traza	54
III.3.4.9. Determinación de los elementos traza extraíbles con $\text{CaCl}_2$ 0,01 M	54
III.3.4.10. Determinaciones de actividades enzimáticas en suelos	54
Determinación de la actividad deshidrogenasa	54
Determinación de la actividad aryl-sulfatasa	55
Determinación de la actividad $\beta$ -glucosidasa	55
Determinación de la actividad fosfatasa ácida	55
Determinación de la actividad ureasa	56
III.3.5. Análisis de aguas	56
III.3.5.1. Determinación del pH	56
III.3.5.2. Determinación de la concentración de nutrientes y elementos traza	56
III.3.6. Análisis de plantas	57
III.3.6.1. Preparación del material vegetal	57
III.3.6.2. Determinación del N-Kjeldahl	57
III.3.6.3. Extracción y determinación de nutrientes y elementos traza	57
III.3.7. Tratamiento estadístico de los datos	58
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>61</b>
IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo	63
IV.1.2. El pH de los suelos	65
IV.1.3. Carbono orgánico total (COT) y Carbono orgánico soluble (COS) de los Suelo	68
IV.1.4. Nitrógeno Kjeldhal (N-Kj), Fósforo Olsen (P-Olsen) y Potasio disponible (K-disp) de los suelos	70
IV.1.5. Concentraciones de elementos traza de los suelos	73
IV.1.5.1. Elementos traza pseudototales	73
IV.1.5.2. Especiación de los elementos traza	75
IV.1.5.3. Elementos traza extraíbles en $\text{CaCl}_2$ 0,01 M	77
IV.1.6. Actividades enzimáticas de los suelos	83
IV.1.7. Estimación del recubrimiento vegetal de las parcelas y determinación de la concentración de elementos traza en <i>Cynodon dactylon</i>	89
IV.1.8. Discusión general del experimento de campo	91
IV.1.8.1. Correlaciones de Pearson entre las variable estudiadas	91
IV.1.8.2. Índices de contaminación, de fertilidad química y de fertilidad bioquímica	94
IV.1.8.3. Análisis de componentes principales de las variables estudiadas en los suelos	99
IV.1.9. Conclusiones del experimento de campo	101

VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores al aire libre (condiciones de semicampo)	103
IV.2.1. Evolución del pH de los suelos	105
IV.2.2. Evolución de la conductividad eléctrica (CE) de los suelos	105
IV.2.3. Evolución del carbono orgánico total (COT) de los suelos	107
IV.2.4. Evolución del Nitrógeno Kjeldhal (N-Kj), Fósforo Olsen (P-Olsen) y Potasio disponible (K-disp) de los suelos	108
IV.2.5. Evolución de la disponibilidad de elementos traza de los suelos	110
IV.2.6. Evolución de las actividades enzimáticas en los suelos	115
IV.2.7. Efectos de las enmiendas sobre la planta de Paulownia	121
IV.2.7.1. <i>Efectos sobre el crecimiento vegetal</i>	121
IV.2.7.2. <i>Efectos en la producción de biomasa</i>	129
IV.2.7.3. <i>Nutrientes en hojas</i>	130
IV.2.7.4. <i>Elementos traza en hojas</i>	133
IV.2.7.5. <i>Correlaciones suelo-planta y Coeficientes de Transferencia</i>	136
IV.2.7.6. <i>Elementos traza en raíz-tronco-hoja</i>	137
IV.2.7.7. <i>Potencial uso de P. fortunei para la fitorrecuperación de suelos                 contaminados con elementos traza</i>	140
V.2.8. Discusión general y conclusiones del experimento en contenedores al aire libre (condiciones de semicampo)	143
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>147</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>151</b>



## **Recuperación y rehabilitación de suelos contaminados con elementos traza mediante la aplicación de enmiendas y el establecimiento de una cubierta vegetal natural o de una planta de crecimiento rápido (*Paulownia fortunei*)**

### **Resumen**

La recuperación de los suelos contaminados con elementos traza supone una difícil tarea por la toxicidad, inmutabilidad y relativa inmovilidad de estos elementos en el suelo. Por estas razones, la contaminación con elementos traza en el suelo es permanente, ya que la completa remoción de estos elementos del suelo, sin alterar sus propiedades es, en la mayoría de los casos, prácticamente imposible. Las tecnologías convencionales para la recuperación de suelos contaminados con elementos traza, mediante la remoción o la estabilización (aislamiento y sellado), así como otras más innovadoras (extracción físico-química por lavado ácido y electro-ósmosis, o la inmovilización *in situ* mediante vitrificación), son muy drásticas, caras y suponen un deterioro importante para el suelo y el entorno. La aplicación de dichas tecnologías afecta negativamente a la actividad ecológica de los suelos y a su productividad, por lo que no quedan aptos para el cultivo o el desarrollo de las plantas.

Existen otras técnicas de estabilización de aplicación *in situ* que no perturban el medio y garantizan el mantenimiento de la calidad del mismo, aun cuando no conllevan su estricta descontaminación. Dentro de estas técnicas se encuentra la denominada *recuperación o atenuación natural asistida*, que se basa en la potenciación, mediante la aplicación de enmiendas, de una serie de procesos, que ocurren naturalmente en los suelos y que contribuyen a la estabilización de los contaminantes. El establecimiento de una vegetación natural o inducida en los suelos enmendados favorece también la recuperación de los mismos (fitorrecuperación).

En la presente Tesis se han llevado a cabo dos experimentos de recuperación natural asistida de suelos contaminados con elementos traza, uno en condiciones de campo y otro en contenedores al aire libre (condiciones de semicampo). Los principales objetivos de dichos experimentos fueron: 1) el estudio del efecto de enmiendas en las propiedades químicas y bioquímicas de suelos contaminados con elementos traza; 2) la evaluación del efecto de las enmiendas en las variaciones de las concentraciones de elementos traza biodisponibles a medio y largo plazo; 3) el estudio del efecto de las enmiendas en el crecimiento de la vegetación espontánea; 4) la evaluación del efecto de las enmiendas en el desarrollo de la especie de crecimiento rápido (*Paulownia ssp*) y en

la cantidad y calidad de la biomasa obtenida; 5) el estudio del efecto de enmiendas en la translocación de elementos traza a la parte aérea de las plantas.

El experimento de campo se llevó a cabo en una parcela (20 x 50m) de suelo ácido contaminado con As, Cd, Cu, Zn y Pb, que se dividió en 12 subparcelas de 7 × 8 metros cada una, con un pasillo de 1 m (largo) y 2 m (ancho) entre las subparcelas. Se establecieron tres tratamientos con enmienda: SL (espuma de azucarera), BC (compost de biosólidos), y LESL (mezcla de leonardita y espuma de azucarera) y un tratamiento control (NA) sin adición de enmiendas, siguiendo un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones por tratamiento. Las dosis de enmienda fueron: BC: 30 Mg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, SL: 30 Mg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, y LESL: 25 Mg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> más 10 Mg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> de SL.

En una primera fase del experimento las enmiendas se aplicaron durante dos años consecutivos (octubre de 2002 y octubre de 2003), dosis DO2. En la segunda etapa del experimento, cada subparcela se subdividió en dos mitades iguales. Una mitad se mantuvo sin enmendar en los años siguientes (dosis, DO2) (SL2, BC2 y LESL2), mientras que la otra mitad recibió nuevas enmiendas en octubre de 2005 y octubre de 2006; dosis, DO4 (SL4, BC4 y LESL4). En 2011, a los ocho años de la primera aplicación de enmiendas, los valores medios de pH de los suelos (0-15 cm) de las parcelas enmendadas era fue más alto que el de las que no recibieron enmiendas, observándose los valores más altos en los suelos tratados con SL (hasta 3,6 unidades respecto al tratamiento NA). Los valores medios de carbono orgánico total (COT) también resultaron más altos en las parcelas enmendadas, correspondiendo el más alto al tratamiento LESL4 (2,3 veces mayor que en NA). En general, la aplicación de enmiendas aumentó las concentraciones medias de N-Kjedhal, P-Olsen y K-disponible de los suelos. Las enmiendas redujeron las “disponibilidad” de Cd, Cu y Zn estimada mediante las concentraciones en los extractos con 0,01 M CaCl<sub>2</sub>, respecto a los correspondientes en el suelo sin enmendar, obteniéndose los valores más bajos de Cd y Zn en el tratamiento con SL, y los de Cu en el tratamiento con BC. Las actividades enzimáticas estudiadas (deshidrogenasa, aril-sulfatasa, β-glucosidasa, fosfatasa ácida y ureasa) también aumentaron notablemente en las parcelas enmendadas.

El cálculo de índices de contaminación, fertilidad química y fertilidad bioquímica mediante los diagramas de Rayos de Sol, mostró que la contaminación por Cd, Cu y Zn disminuyó con las enmiendas (hasta un 83% en SL4). La fertilidad química aumentó hasta 9,2 veces en el tratamiento BC4 y 8,5 en SL2, respecto a NA. Asimismo, la fertilidad bioquímica aumento hasta 13,2 y 11,2 veces respecto a NA en los



tratamientos SL2 y BC4. Estos aumentos de la calidad de los suelos dieron lugar a aumentos de la colonización por especies espontáneas que llegó a producir recubrimientos de hasta el 98%.

La existencia de datos anteriores a 2011, permitió estudiar la evolución de algunas propiedades de los suelos durante todo el período experimental. Así por ejemplo, el valor medio pH aumentó en los suelos enmendados hasta después de la última aplicación, observándose pocas diferencias entre los tratamientos DO2 y DO4. En cambio, en los valores medios del COT que siguen una pauta similar a la del pH, sí se aprecian valores más altos con la dosis DO4 en las parcelas con enmiendas orgánicas. La “disponibilidad” de Cd, Cu y Zn sigue una pauta inversa a la del pH y COT, es decir disminuye desde el principio del experimento hasta después de la última aplicación en todos los tratamientos, incluido el suelo sin enmendar. Esto último es un signo de recuperación natural del suelo NA, debido a la reacción de los elementos traza con los componentes del suelo, que aumenta con el tiempo, así como al aumento de la materia orgánica del suelo debido a la descomposición de las partes aéreas y raíces de las plantas que colonizaron estas parcelas.

La aplicación de enmiendas a un suelo ácido contaminado con elementos traza disminuye la “disponibilidad” de los mismos a la vez que aumenta la fertilidad química y bioquímica, lo que coadyuva a la colonización por especies vegetales espontáneas de las parcelas contaminadas.

El experimento en contenedores al aire libre (condiciones de semicampo), se llevó a cabo en 27 contenedores de 90 l y 1 metro de altura, que se llenaron con los primeros 15 cm de dos suelos moderadamente contaminados con elementos traza (AZ pH 6,9 y V pH 3,7) y uno no contaminado, NC (pH 7,5). Por cada suelo se establecieron tres tratamientos: compost de alperujo (AC, pH 8,10; MO, 29,1%), compost de biosólidos (BC, pH 7,09; MO, 22,6%) y un control sin adición de enmienda. Los contenedores se dispusieron siguiendo un diseño de bloques al azar con tres réplicas por tratamiento. En cada contenedor se plantó una planta de *Paulownia. fortunei* de 10-15 cm. Las enmiendas se añadieron en noviembre 2011 a razón de 30 Mg ha<sup>-1</sup> en todos los suelos, más 25 Mg ha<sup>-1</sup> en marzo 2012 en el suelo V. Los contenedores se regaron por goteo diariamente (333 ml al día) entre mayo y octubre.

Las enmiendas dieron lugar a aumentos del pH respecto al control en los tres suelos, aunque las diferencias sólo fueron significativas en los suelos NC y V. Los

## Resumen

valores medios de COT, N-Kjeldhal y de P-Olsen también aumentaron con las enmiendas. También se observó un aumento del K-disponible medio en los tratamientos con compost de alperujo (AC), que contiene un 2,8% de K, en comparación con el BC (0,82% K). La aplicación de las enmiendas redujo los valores medios de Cd, Cu y Zn disponibles en los dos suelos contaminados, y especialmente en el suelo ácido contaminado (V). La presencia de la planta y la aplicación de enmiendas hicieron decrecer el Cd disponible al final del experimento hasta valores por debajo del límite de detección del método empleado ( $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ ). La efectividad de ambas enmiendas para reducir la concentración de Cd, Cu y Zn disponibles fue muy similar respecto a los suelos no enmendados. Las concentraciones de As y Pb disponibles fueron siempre menores que límite de detección del método utilizado ( $0,01 \text{ mg l}^{-1}$  en el extracto, equivalente a  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$  en el suelo). Los valores medios de las actividades enzimáticas también aumentaron en los suelos enmendados.

Al final del experimento, mejoraron las propiedades químicas y bioquímicas, y disminuyó la “disponibilidad” de los elementos traza de todos los suelos de los tres tratamientos. En los suelos sin enmendar, estas mejoras deben atribuirse a la presencia de la planta.

Respecto al crecimiento de las plantas de Paulownia, los valores medios de altura, diámetro y biomasa de las mismas fueron distintos en cada tipo de suelo, observándose los valores más bajos en el suelo contaminado ácido, V, en el que las enmiendas contribuyeron especialmente al aumento de los parámetros relacionados con el crecimiento.

Las concentraciones de N, P y K en hojas de Paulownia fueron mayores que los valores medios normales prácticamente en todos los casos. En general dichas concentraciones fueron muy similares en los suelos NC y AZ y algo más bajas en el suelo V. Solamente se observaron aumentos de las concentraciones de dichos elementos, atribuibles a las enmiendas, en el contenido en N de las plantas que crecieron en el suelo NC y de los tres nutrientes de las plantas que crecieron en el suelo V, si bien no siempre las diferencias fueron significativas. Los valores medios de las concentraciones de As, Cd, Cu, Pb y Zn en hojas de Paulownia de los tres suelos estudiados no mostraron diferencias significativas atribuibles a las enmiendas, y estuvieron dentro de los intervalos normales, a excepción de las de Cu, que superaron el límite superior del intervalo debido a la capacidad de esta planta para acumular de este elemento. La tendencia de los coeficientes de transferencia fue la misma en los tres

suelos:  $Pb < As < Cd < Zn < Cu$ , con las únicas anomalías en Pb y Zn en el suelo V, que en este caso es  $Cu < Zn$ . En el tronco y las raíces tampoco se observaron diferencias significativas atribuibles a las enmiendas en las concentraciones medias de los elementos traza, cuyos valores siguieron distintas tendencias para cada elemento. Así, los elementos menos móviles (As y Pb) se acumulan en las raíces, y el Cd, más móvil, en las hojas. Las concentraciones medias de Zn y Cu fueron muy similares en las tres partes estudiadas de la planta. Las cantidades totales extraídas del suelo por la planta fueron muy bajas,  $< 2\%$  del contenido en el suelo, por lo que esta planta no puede considerarse como una especie fitoextractora, al menos bajo las condiciones del presente estudio. Sin embargo, el hecho de que esta planta crezca en suelos contaminados y que su crecimiento mejore con la adición de enmiendas, la hacen viable para la fitoestabilización de dichos elementos, permitiendo a su vez la utilización de esos suelos para la obtención de su biomasa con fines energéticos.

Los resultados obtenidos muestran que el uso combinado de *P. fortunei* y la adición enmiendas orgánicas al suelo podría ser una estrategia factible para la recuperación de áreas contaminadas con elementos traza bajo clima mediterráneo y promover su valorización económica.

**Remediation and rehabilitation of soils contaminated with trace elements by applying amendments and the establishment of a natural vegetative cover or of a fast growth plant (*Paulownia fortunei*).**

**Summary**

The remediation of soils contaminated with trace elements is a difficult task, because of the toxicity, immutability and relative immobility of these elements in the soil. For these reasons, the contamination with trace elements in soils is permanent, because the complete removal of these elements from soil, without altering its properties is in most cases practically impossible. The conventional technologies for the remediation of soils contaminated with trace elements, by removing or stabilizing (isolation and sealed), and by more innovative ones (physical-chemical acid extraction and electric-osmosis washing, or *in situ* immobilization by vitrification), are very drastic, expensive and pose an important deterioration for the soil and the environment. The application of these technologies affects negatively the ecological activity of the soil and its productivity, so they are no longer suitable for the cultivation or the development of plants.

There are others techniques of *in situ* stabilization which do not disturb the environment and that at the same time ensure the maintenance of its quality, though not involve strict decontamination. Among these techniques is the so-called *assisted natural remediation or attenuation*, based on the enhancing, through the application of amendments, of series processes that occur naturally in the soils and contribute to the stabilization of the contaminants. The establishment of a natural or induced vegetation in the amended soils also favors their remediation (phytoremediation).

In the present Thesis two experiments of assisted natural remediation of soils contaminated with trace elements were carried out, one under field conditions and another in outdoor containers (semi-field conditions). The main objectives of both experiments were: 1) to study effect of amendments on the chemical and biochemical properties of contaminated soils with trace elements; 2) to evaluate the effect of the amendments on the changes of the trace elements bioavailable concentrations in middle and long terms; 3) to study the effect of the amendments on the growth of spontaneous vegetation; 4) to evaluate the effect of the amendments on the development of a fast-growing species (*Paulownia fortunei*) and on the quantity and quality of its biomass; 5) to study the effect of the amendments on the trace elements translocation to plant shoot.

The field experiment was carried out in a plot (20 × 50m) of acid soil contaminated with As, Cd, Cu, Zn and Pb, which was divided in 12 subplots of 7 × 8

meters each, with spacing of 1 m (long) and 2 m (wide) between the plots. Three treatments with amendments were established: SL (sugar beet lime), BC (biosolid compost) and LESL (mixture of leonardite and sugar beet lime) and one treatment control (NA) without amendment addition, according a complete randomized block design with four treatments and three replicates. The amendment doses were: BC: 30 Mg ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>, SL: 30 Mg ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>, y LESL: 25 Mg ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup> más 10 Mg ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup> de SL.

In a first phase of the experiment the amendments were applied during two consecutive years (October 2002 and October 2003), dose DO2. In the second stage of the experiment each subplot were subdivided in two equal halves. One half did not received any more amendment in the following years (dose, DO2; SL2, BC2 and LESL2), meanwhile the other half received new dose of amendments in October 2005 and October 2006 (dose, DO4; SL4, BC4 and LESL4). In 2011, eight years after the first amendment application, the mean pH values of the soils (0-15 cm) of the amended plots were much higher than those not receiving amendments; the highest pH values were observed in soils treated with SL (up to 3.6 unites respect to treatment NA). The highest mean values of TOC also were found in amended plots, and the highest of them in treatment LESL4 (2.3 times more than in NA). In general, the application of amendments increased the mean concentrations of Kjeldhal-N, Olsen-P, available-K of the soils. Amendments reduced the “availability” of Cd, Cu and Zn (estimated by the concentration of the 0.01 M CaCl<sub>2</sub> extracts) compared to the value in non-amended soil; the lowest values of Cd and Zn were found in the treatment with SL, and those of Cu in the treatment with BC. The enzymatic activities studied (dehydrogenase, aryl-sulfatase, β-glucosidase, acid phosphatase and urease) also increased notably in the amended plots.

The calculated index of pollution and chemical and biochemical fertility by the diagram Sun Ray Plots, showed that the contamination by Cd, Cu and Zn diminished with amendments (up to a 83% in SL4). The chemical fertility increased until 9.2 times in the treatment BC4 and 8.5 in SL2, compared to NA. At the same time, the biochemical fertility increased until 13.2 and 11.2 times compared to NA in the treatments SL2 and BC4. The increases of the soils quality gave rise to increases of the colonization by spontaneous species, producing plant covering of up to 98%.

The existence of data before 2011, allowed the study of the evolution of some soil properties throughout the experimental period. For example, the average pH values

## Summary

went on increasing in the amended soils up to after the last application; few differences were found between DO2 and DO4 treatments. The mean total organic carbon (TOC) values had similar pattern than pH, but the highest values were found in organic amendment plots of dose DO4. Cadmium, Cu and Zn “availability” followed an inverse that those of pH and TOC, i.e.: means values diminished from the beginning of the experiment till the amendment applications ceased in all the treatments, including the no amended soils. The latter is a sign of natural remediation of soil NA, due to the reaction of the trace elements with the soil components, which increase with time, and also to the increase of the organic material in soil due to the breakdown of plant shoots and roots colonized these plots.

The application of amendments to a trace element contaminated acid soil decreased their “availability” and at the same time increased the chemical and biochemical fertility of the soil, and enhances the colonization of contaminated plots by spontaneous vegetable species.

The experiment in containers outdoor (semifield condition), was carried out in 27 containers of 90 l and 1 meter height, filled with the upper layer (15 cm) of two soils moderately contaminated with trace elements (AZ pH 6.9 and V pH 3.7) and of a not contaminated soil, NC (pH 7,5), as control. Three treatments were established for each soil: alperujo compost (AC, pH 8.10; MO, 29.1%), biosolid compost (BC, pH 7.09; MO, 22.6%) and one control without amendment addition. The containers were arranged following a design of random blocks with three replicates per treatments. In each container, was planted one plant of *Paulownia fortunei* of 10-15 cm, height. The amendments were added in November 2011 at dose of 30 Mg ha<sup>-1</sup> in all the soils, plus 25 Mg ha<sup>-1</sup> in March 2012 only in the soil V. The containers were irrigated by drip daily (333 ml every day) between May and October.

The amendments caused increases of pH compared to control in the three soils, although the differences were only significant in the soils NC and V. Mean values of TOC, Kjeldhal-N and Olsen-P also increased with the amendments. An increase of mean available-K in the treatments with alperujo compost (AC) was observed; AC contains 2.8% of K, while BC only contains 0.82% K. The application of amendments reduced the mean values of “available” Cd, Cu and Zn in the two contaminated soils, especially in the acid contaminated soil (V). The presence of the plant and the application of amendments decreased available Cd at the end of the experiment down to values lower than the detection method limit (0.01 mg kg<sup>-1</sup>) of the analytical method.

The effectiveness of both amendments to reduce the concentration of available Cd, Cu and Zn regarding non-amended soils were very similar. The concentrations of available As and Pb were always lower than the detection method limit used ( $0.01 \text{ mg l}^{-1}$  in the extract, equivalent to  $0.1 \text{ mg kg}^{-1}$  in the soil). The mean values of enzymatic activities also increased in the amended soils.

At the end of the experiment, both amendments improved the chemical and biochemical properties and decreased the “availability” of the trace elements in the soils. In the non-amended soils, these increases should attribute to the presence of the plant.

Regarding the growth of the *Paulownia* plants, their mean values of height, diameter and biomass were different in each type of soil. The lowest values were observed in contaminated acid soil (V), in which amendments enhanced the parameters related with the plant growing

Practically in all the cases the concentrations of N, P and K in *Paulownia* leaves were higher than the mean normal values for this species. In general these concentrations were very similar in the soils NC and AZ and some lower in the soil V. It was only observed increases of the concentrations of the three nutrients, attributed to the amendments, in the concentration of N of the plants growing in soil NC, and in the concentrations of N, P, and K of the plants of soil V, although the differences were not always significant. The mean concentrations of As, Cd, Cu, Pb and Zn in leaves of *Paulownia* of the three soils studied showed no significant differences due to the amendments, and were within normal ranges, except for Cu, that they exceeded the upper limit of the range due to the ability of the plant to accumulate this element. The trend of the transfer coefficients was the same in the three soils:  $\text{Pb} < \text{As} < \text{Cd} < \text{Zn} < \text{Cu}$ , with the only anomaly of Pb and Zn in soil V, which in this case is  $\text{Cu} < \text{Zn}$ . In the trunk and roots no significant differences due to amendments were observed in the mean concentrations of the trace elements. These values followed different trends for each element. Thus, the less mobile elements (As and Pb) accumulated in the roots, while Cd, more mobile, accumulated in the leaves. Mean concentrations of Zn and Cu were very similar in the three parts of the plant. The total amount of trace elements extracted from soil by this plant was very low ( $< 2\%$  of the content in the soil), and consequently this plant cannot be considered as a phytoextractor species, at least under the conditions of this study. However, this plant is able to grow in contaminated soils, improving its development with the addition of amendments. This fact makes this species viable for

## Summary

the phytostabilization of these elements, allowing the use of these soils for the production of biomass for energetic purpose.

The results show that the combined use of *P. fortunei* and the application of organic amendments to trace elements contaminated soils could be a feasible strategy for the remediation of areas contaminated with trace elements under Mediterranean climate, thus promoting their economic valuation.



被微量元素污染土壤的修复和再生通过施用添加剂和一个自然覆盖植被的建立或者一种快速生长植物（白花泡桐）

论文摘要

修复被微量元素污染的土壤意味着一项困难的任务，由于在土壤中这些元素的毒性，不变性和相对不移动性。因为这些原因，土壤被微量元素污染是永久的，要完全从土壤中去掉这些元素，而不改变它的性质，从大多数案例来说，基本上是不可能的。常规的修复土壤被微量元素污染的技术，通过去除或者稳定（隔绝和封印），同时还有其他创新者（通过酸洗和电渗透物理-化学提取，或者通过玻璃化原位固定），是非常猛烈的，昂贵的和意味着一个重要的恶化土壤和环境的因素。这些技术的应用对土壤生态活力和它的生产力带来负面影响，所以不适合农作物和植物的生长。

存在其他可以原位施展的稳定技术而不会扰乱环境和确保同时维持土壤质量，尽管不是严格的去污染。在这些技术中有被命名的辅助自然修复或减轻，它基于潜力，通过施加添加剂，和一系列的过程，自然地发生在土壤中并有贡献于污染物的稳定。一个自然或引入植被的建立和被添加的土壤中同时帮助其自身的修复（植物修复）。

在本论文中开展了两个辅助自然修复被微量元素污染土壤的实验，一个是在野外条件下和另一个在室外实验大桶（半野外条件）。这些实验的主要目的是：1）研究添加剂对被微量元素污染土壤的化学和生物化学性质的影响；2）评估添加剂对微量元素中期和长期的生物有效态含量变化的影响；3）研究添加剂对自生植被生长的影响；4）评估添加剂对快速生长树种（泡桐）的生长和获得的生物量的数量和质量的影响；5）研究添加剂对微量元素向植物地上部迁移的影响。

野外实验建立在一个被砷，镉，铜，锌和铅污染的酸性土壤试验田（20\*50米），它被等分为12个7\*8米每个的小田块，和一个过道1米（长）和2米（宽）在小田块之间。建立了三个有添加剂的处理：SL（甜菜石灰），BC（生物堆肥），和LESL（甜菜石灰和遏煤）和一个对照处理（NA）不施加添加剂，根据一个区域的完全随机设计和每种处理三个重复。添加剂的剂量为：BC：30 Mg 公顷<sup>-1</sup> 年<sup>-1</sup>，SL：30 Mg 公顷<sup>-1</sup> 年<sup>-1</sup>，和 LESL：25 Mg 公顷<sup>-1</sup> 年<sup>-1</sup> 加 10 Mg 公顷<sup>-1</sup> 年<sup>-1</sup> 的SL。

在实验的第一阶段连续两年（2002年10月和2003年10月）施加添加剂，剂

## 论文摘要

量D02。在实验的第二阶段每个小田块被均分为两个一样的半块。一半块维持不添加在接下来的年限里（剂量，D02）（SL2，BC2和LESL2），同时另一半块在2005年10月和2006年10月受到新的添加剂；D04（SL4，BC4和LESL4）。在2011年，在第一次施加添加剂的8年后，被添加地块的土壤（0-15厘米）pH平均值比未添加的高很多，发现添加SL土壤的值高很多（直到3,6单位与NA处理相比）。TOC的平均值在被添加的地块也表现出更高，相应的最高值是LESL4处理（2,3倍高于NA）。总的来说，施加添加剂提高了土壤N-Kjedhal, P-Olsen 和 K-available 平均含量。添加物减少了镉，铜和锌的”有效性”通过0,01M  $\text{CaCl}_2$ 提取评估含量，和相应的未施加土壤相比，发现用SL处理的镉和锌的值更低，铜用BC处理。研究的酶活性（脱氢酶，芳基硫酸酯酶， $\beta$ -葡萄糖苷酶，酸性磷酸酶和脲酶）在被施加的地块显著的提高。

计算污染，化学肥力和生物化学肥力指数通过太阳晕图案，证明镉，铜和锌污染在有添加剂时降低（直到83%在SL4）。化学肥力提升直到9,2倍在BC4处理和8,5在SL2，与NA相比。同时，生物化学肥力提升直到13,2和11,2倍与NA相比在SL2和BC4处理下。这些土壤质量的提升发生在自生种类的植被垦殖的提高产生了恢复覆盖直到98%。

2011年之前存在的数据库，允许研究土壤某些性质的演变在所有的实验期里。这样例如，pH平均值提高在被施加土壤里直到在最后一次施用以后，发现很少的不同在D02和D04处理之间。反过来，有机全碳（TOC）平均值保持一个相似的规律如同pH，估计值更高在剂量D04在施加有机添加剂的田块里。镉，铜和锌的有效性跟从一个相反的规律与pH和TOC相比，也就是说下降从实验开始时直到最后一次添加之后在所有的处理中，包括土壤未添加。这最后是NA土壤自然修复的标志，由于微量元素与土壤成分的反应，随时间而增加，这样就像土壤有机质的增加由于同时垦殖这些地块的植物地上部和根系的分解。

施加土壤添加剂到一个酸性微量元素污染的土壤里降低他们的有效性同时提高化学和生物化学肥力，这还帮助自然生长种类的植被垦殖被污染的地块。

室外大桶实验（半野外条件），在27个大桶90升和1米高里进行，用两种中度微量元素污染的表层15厘米土壤装满（AZ pH 6,9和V pH 3,7）和一个未污染，NC（pH 7,5）。每种土壤建立三个处理：alperujo堆肥（AC，pH 8,10；MO, 29.1%），生物堆肥（BC，pH 7,09；MO, 22,6%）和一个对照未施加添加

剂。大桶放置根据一个区域随机设计三个重复每种处理。在每一个大桶里种植一株10-15厘米的泡桐。添加剂在2011年11月施加剂量30 Mg 公顷<sup>-1</sup>在所有的土壤中，加上25 Mg 公顷<sup>-1</sup>在2012年三月在土壤V中。大桶采用每日滴灌灌溉（333毫升每天）在五月和十月之间。

添加剂引起pH增加在这三种土壤中与对照相比，尽管差异只在NC和V土壤中显著。TOC, Kjeldhal-N和Olsen-P的平均值也同添加剂提高。同时也发现available-K平均值提高在alperujo堆肥（AC）处理中，它包含2,8%的K，与BC相比（0,82% K）。施加添加剂降低镉，铜和锌的有效平均值在这两个被污染的土壤中，和特别是在酸性污染土壤（V）。植物的出现和添加剂的施用实验的最后减少了镉的有效性直到值低于测定方法的下限（0,01毫克 千克<sup>-1</sup>）。两种添加剂对于减少镉，铜和锌有效性含量的效果与没有添加的土壤相比非常相似。砷和铅的有效性含量总是小于使用的测定方法的下限（0,01毫克 升<sup>-1</sup>在提取剂中，相当于0,1毫克 千克<sup>-1</sup>在土壤中）。酶活性的平均值也提高了在被添加了的土壤里。

实验的最后，在所有土壤中所有的处理提高了化学和生物化学性质同时降低了微量元素的”有效性”。在未添加的土壤中，这些提高应该归功于植物的出现。

关注植物泡桐的生长，高度，直径和生物量的平均值本身在每种土壤中就不相同，发现值最低是在被污染的酸性土壤，V，添加剂贡献于特别是有关生长参数的增加。

N, P和K在泡桐叶里的含量实际上比一般平均值高在所有的案例里。总的来说这些含量与土壤NC和AZ非常相似和一些偏低在土壤V里。仅仅发现上述元素的含量增加，归功于添加剂，生长在土壤NC里植物N的含量和植物的这三种元素生长在土壤V中，然而差异不总是显著的。砷，镉，铜，铅和锌在泡桐叶里的平均含量值在三种研究土壤中没有表现出显著差异归功于添加剂，和在一般范围中，铜是一个例外，它超过了范围的上限由于这种植物的富集这种元素的能力。三种土壤中的转移系数有一个相同的趋势：铅<砷<镉<锌<铜，只有土壤V中铅和锌异常，在这个案例里是铜<锌。在树干和根系也没有发现微量元素的平均含量显著差异归功于添加剂，它的值保持不同趋势对于每种元素。这样，这些少活动元素（砷和铅）会富集在根系，镉，多活动，在叶里。锌和铜的平均含量在植物

## 论文摘要

被研究的三个部分非常相似。植物从土壤中提取的全量非常小，< 2%土壤含量，所以这种植物不能够被考虑为一种提取植物，至少在这个研究条件下。但是，这种植物在被污染土壤中的生长行为和它的生长在施加添加剂后提高了，这是切实可行的对于植物稳定这些元素，这样允许使用这些土壤来获得生物量以能源为目的。

获得的结果表明联合使用泡桐和有机添加剂到土壤中是一个切实可行的策略对于修复被微量元素污染的区域在地中海气候下和提升它的经济价值。

# **I. INTRODUCCIÓN**



### **I.1. Concepto de contaminación del suelo. Vulnerabilidad y capacidad de atenuación natural del suelo.**

Un contaminante es cualquier sustancia o forma de energía con potencial para provocar daños, irreversibles o no, en un medio. Se denomina contaminación ambiental a la presencia en el ambiente de cualquier agente (físico, químico o biológico) o combinación de agentes en concentraciones tales que sean o puedan ser nocivos para la salud, la seguridad o para el bienestar de la población, o que puedan ser perjudiciales para la vida vegetal o animal, o que impidan el uso normal del medio.

Según el medio afectado la contaminación puede ser atmosférica, hídrica, o del suelo. En este último aspecto se basará la presente memoria de tesis. Un suelo se puede degradar al acumularse en él sustancias a niveles tales que alteren negativamente su comportamiento, originando su degradación química que provoca la pérdida parcial o total de su productividad y un daño o alteración de los organismos que habiten en él. Además hay que tener en cuenta que el suelo actúa como barrera protectora de otros medios más sensibles, como son los hidrológicos y los biológicos. El conjunto de propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, lo convierten en un sistema clave en los ciclos biogeoquímicos superficiales, capaz de realizar funciones de filtración, descomposición, neutralización, inactivación, almacenamiento de los contaminantes, lo que constituye la capacidad de depuración del suelo.

La vulnerabilidad de un suelo es su susceptibilidad para degradarse y depende de su capacidad de resiliencia (de la Rosa, 2008). La resiliencia del suelo es la capacidad de un suelo para recuperar su integridad funcional y estructural después de una perturbación y depende del tipo de suelo y vegetación, del clima, del uso de la tierra, del tipo de perturbación y del tiempo de la perturbación. (Seybold et al., 1999). A la capacidad inherente del suelo a oponerse a los cambios originados por las posibles perturbaciones como puede ser la presencia de un contaminante, se denomina capacidad amortiguadora que depende de la naturaleza de cada suelo y es inversamente proporcional a la vulnerabilidad. La capacidad amortiguadora del suelo tiene lugar a través de reacciones de neutralización, intercambio iónico, adsorción, complejación, precipitación y degradación. Por tanto, se define como suelo contaminado aquél que ha superado su capacidad de amortiguadora para una o varias sustancias contaminantes. Como consecuencia, el suelo contaminado pasa, de actuar como un sistema protector, a ser causa de efectos negativos para el agua, la atmósfera y los organismos que en él habitan. La pérdida de capacidad de amortiguación hace que se modifique su equilibrio

## I. INTRODUCCIÓN

biogeoquímico y que aparezcan en él cantidades anómalas de determinadas sustancias, lo que origina modificaciones importantes en sus propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Dichas modificaciones dan lugar a la disminución de la amortiguación o a la pérdida de la capacidad de depuración del suelo, afectando negativamente a la salud del mismo (Adriano 2001; Bolt and Bruggenwert 1976). El término “salud del suelo” está relacionado con el de calidad del suelo, para muchos autores ambos términos son sinónimos, pero que se diferencian en que el segundo hace referencia a la aptitud del suelo para un uso específico, mientras que el primero está relacionado con la sostenibilidad (Doran y Zeiss, 2000). Según Doran y Safley (1997) la salud del suelo es la capacidad continua de un suelo para funcionar como un sistema vital dentro de los límites del ecosistema y de su uso, sustentar la productividad biológica, potenciar la calidad del aire y del agua y mantener la salud de las plantas, de los animales y de los seres humanos. La salud del suelo es de vital importancia para el buen funcionamiento de nuestra sociedad, puesto que el suelo está implicado en una amplia variedad de funciones como son la producción de alimento y biomasa, y el almacenamiento de nutrientes y carbono. En nuestros días, estas funciones se encuentran amenazadas por la potencial degradación causada por la interacción de factores bio-físicos, socio-económicos y políticos (EC 2012; Jones, 2012; Warren, 2002). En la actualidad, la contaminación del suelo es uno de los principales problemas ambientales a escala global. A nivel europeo, se estima que el número de enclaves potencialmente contaminados es superior a los 2,5 millones (Panagos et al., 2013). De entre las formas de contaminación de suelo, los metales pesados y los hidrocarburos constituyen el principal grupo de contaminantes en la contaminación edáfica en la Unión Europea, contribuyendo al 60 % de los casos de contaminación.

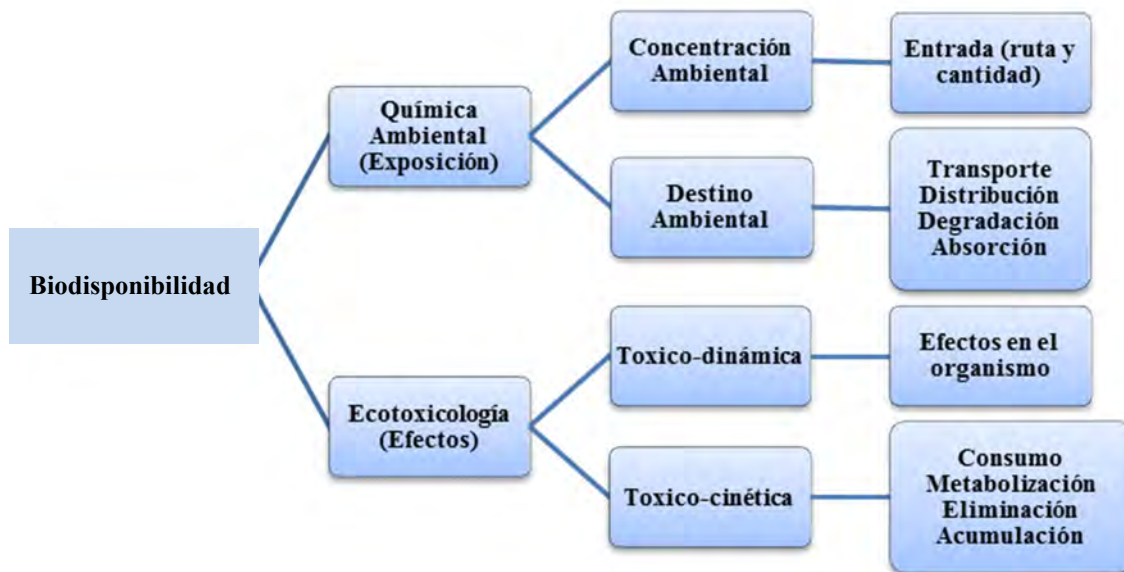
Otras de las amenazas que afectan a la salud del suelo es su degradación, que resulta de la acción de múltiples procesos que ocasionan la pérdida o disminución de la productividad y afectan sus propiedades físicas, químicas y/o biológicas. Entre los procesos que más degradan el suelo, destacan algunos sistemas de manejo agrícola de los mismos, que producen cambios físicos de la estructura, principalmente por la compactación y formación de costras. La pérdida de nutrientes, la salinización, acidificación y la contaminación son indicadores de procesos de degradación química que sufren los suelos como consecuencia de prácticas agrícolas inadecuadas.



## **I.2. Concepto de biodisponibilidad de los contaminantes**

Como se ha comentado anteriormente, la contaminación del suelo tiene lugar cuando la concentración de una determinada sustancia sobrepasa su capacidad amortiguadora. Un suelo está contaminado cuando contiene una determinada sustancia, resultado de su exposición a una determinada actividad humana, que no tiene otro suelo similar no expuesto a dicha actividad. Sin embargo, la presencia de un contaminante no implica necesariamente el daño a la funcionalidad del propio suelo, o a los organismos que viven en él. Un suelo se considera dañado cuando produce cosechas insatisfactorias en cantidad y calidad y /o en sus aguas de escorrentía o de drenaje se detecta alguna sustancia indeseable. Por tanto, hay que tener en cuenta que los efectos negativos de los contaminantes no están provocados directamente por la concentración total del propio contaminante en el suelo, sino por la proporción del contaminante que es capaz de afectar negativamente a los organismo que viven en él o a sus aguas de escorrentía y drenaje, es decir, la cantidad de contaminante móvil o biodisponible. Por consiguiente, es necesario conocer en cada caso particular, de la manera más exacta y realista posible la concentración de un contaminante (dentro de la matriz total) a la que está expuesto los organismos que viven en él, o que afecte a la disolución del suelo, esto es: la concentración de contaminante que móvil o biodisponible. En principio, los contaminantes que se encuentran en el medio externo al que se encuentra un organismo no son perjudiciales para éste, sin embargo, cuando los absorbe o asimila, pueden ocasionarles efectos negativos. Para que una sustancia pueda ser asimilada por un determinado organismo es necesario que se encuentre en forma biodisponible.

La biodisponibilidad es un concepto central que atañe de dos disciplinas: la química ambiental (relacionada con la exposición del medio a los contaminantes) y ecotoxicología (relacionada con los efectos que tienen estos contaminantes en los organismos vivos). El concepto de biodisponibilidad integra aspectos tales como la concentración, el destino y la evolución de los contaminantes y toda la dinámica de los mismos en el suelo dentro de la disciplina de la química ambiental. Por otra parte, incluye los efectos en el ambiente y los organismos que viven en él, y cómo estos organismos vivos son capaces de establecer mecanismos por los cuales, a pesar de verse afectados por los contaminantes, pueden acumularlos, metabolizarlos o incluso eliminarlos (Hamelink *et al.*, 1994). La Figura I.1 ilustra esta idea.



**Figura I.1.** Biodisponibilidad de contaminantes

En términos de química ambiental y de ecotoxicología, la definición de biodisponibilidad de un contaminante es bastante poco específica. No existe una única definición para este término sino más bien una multitud de descripciones e interpretaciones centradas en diferentes aspectos. Algunas definiciones de biodisponibilidad o de contaminante biodisponible más relevantes, propuestas por diferentes autores son las siguientes (Frische et al., 2003):

a) Cantidad/porcentaje de un compuesto que realmente es tomado por un organismo como el resultado del equilibrio dinámico de procesos de consumo del organismo, y procesos de cambio relacionados con las partículas del suelo, todos ellos relacionados con un conjunto dinámico de condiciones ambientales (Eijsackers et al., 1997).

b) Es un proceso complejo que incluye todas las clases de relaciones entre la concentración ambiental del contaminante y la parte de concentración que un organismo consume (Sijm et al., 2000).

c) Especie química que es biológicamente accesible y que puede ser asimilada por un organismo y reaccionar con su metabolismo (Campbell, 1995).

d) Fracción de la concentración total de un elemento que interacciona con un determinado organismo (Vangrosveld y Cunningham, 1998).

Como resultado de la integración de estas definiciones y de las discusiones llevadas a cabo en el “Workshop” “Bioavailability of Soil Contaminants: Problems and Perspectives”, 18-19 Julio, 2002, Universidad de Bremen”, Frische et al., (2003) propusieron la siguiente definición: La biodisponibilidad describe procesos complejos de transferencia de masa y la ingesta de contaminantes por los organismos del suelo, que está determinada por las propiedades del contaminante y las del suelo, por la biología de los organismos y por las influencias climáticas. La fracción de contaminante biodisponible en el suelo representa la concentración de exposición relevante para los organismos de suelo.

A partir de esta última definición general, probablemente la más completa, podemos deducir los factores que influyen en la biodisponibilidad de los contaminantes y que pueden clasificarse en tres categorías, según estén relacionadas con: 1) las características del organismo; 2) las propiedades del suelo; 3) las propiedades fisico-químicas del contaminante, todas ellas influenciadas por el clima y las condiciones ambientales (Figura.I.2).



*Figura I.2. Factores que influyen en la biodisponibilidad de contaminantes.*

- **Factores relacionados con el propio organismo.** En el caso del presente estudio los organismos implicados son las plantas y los microorganismos del suelo. Hay que tener en cuenta que no todas las plantas tienen los mismos mecanismos de importación de las sustancias del suelo, ya que no tienen el mismo hábitat, morfología y fisiología. En el caso de los microorganismos no todos están adaptados de la misma manera a un determinado hábitat.
- **Factores relacionados con la naturaleza del contaminante:** estereoquímica del compuesto (cuando se trata de moléculas), solubilidad en agua (cuanto más

## I. INTRODUCCIÓN

soluble sea el compuesto más fácil tendrá la entrada al organismo), presión de vapor, pK, etc.

- **Factores relacionados con el propio suelo.** El suelo es un sistema complejo con tres fases bien definidas: sólida, líquida y gaseosa. Estas fases están en equilibrio y relacionadas por procesos de intercambio. La composición del suelo y sus propiedades (especialmente pH, contenido de materia orgánica y capacidad de intercambio catiónico) tienen una gran influencia en todos los procesos de intercambio entra dichas fases.

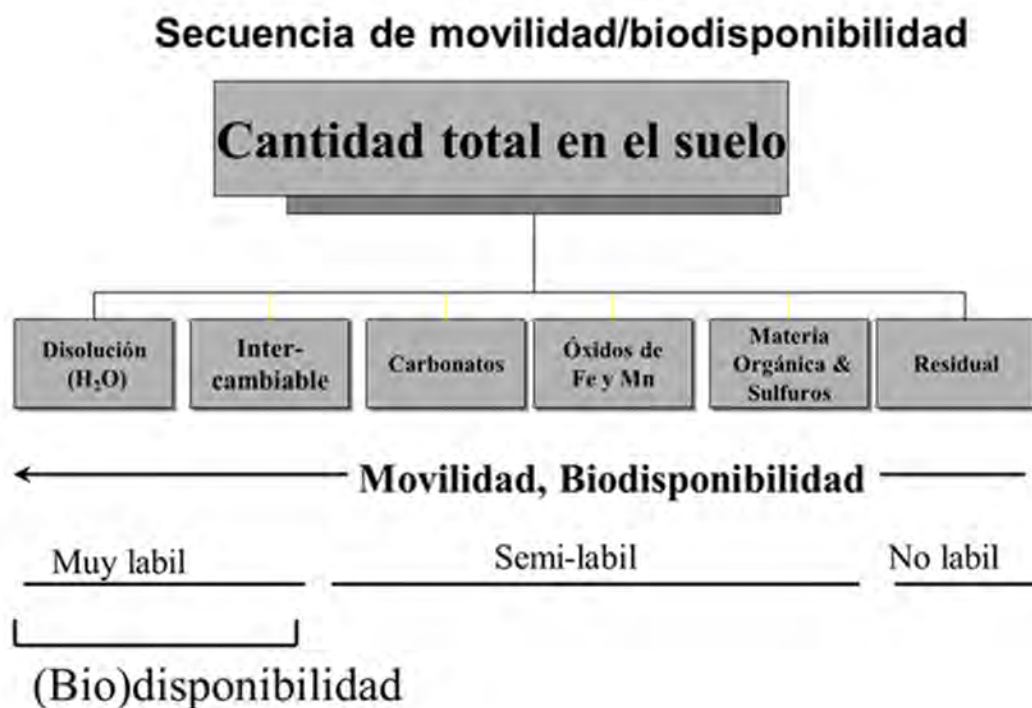
Muchos autores coinciden en que la fase líquida (el agua de la disolución del suelo) es el factor más influyente relacionado con la biodisponibilidad de los contaminantes. Así, todos aquellos procesos físico-químicos que afectan a esta fase afectarán a la biodisponibilidad. En este sentido hay que empezar a diferenciar entre dos grupos de contaminantes que normalmente son los más frecuentes en los suelos: los contaminantes inorgánicos (v.gr.: elementos traza) y contaminantes orgánicos. De hecho entre ambos tipos de contaminantes existe una gran diferencia en su comportamiento en el suelo. Los orgánicos son susceptibles de degradarse, descomponerse, volatizarse e incluso desaparecer por acción de la biota del suelo. En cambio, los inorgánicos, como es el caso de los elementos traza, no se descomponen, ni se volatilizan en el suelo, con excepción de algunos metales, metaloides y halógenos que mediante procesos biológicos pueden reducirse a formas elementales volátiles (e.gr.: Hg), o a la síntesis de compuestos volátiles metilados o dimetilados (Wenzel et al., 1999; Chaney et al., 2010).

En el caso particular de los elementos traza, según su biodisponibilidad (movilidad) éstos se encuentran en los suelos en las siguientes formas (orden creciente): 1) fácilmente solubles (en la disolución del suelo); 2) intercambiables (en el complejo de intercambio del suelo); 3) en forma de carbonatos; 4) asociados a los óxidos de Al, Fe y Mn; 5) unidos la materia orgánica y formando y sulfuros; 6) formando parte de las redes cristalinas de los minerales de la arcilla (Adriano, 2001) (Figura I.3).

La fracción biodisponible está constituida fundamentalmente por las fracciones del elemento soluble e intercambiable (existente en los sitios de intercambio catiónico o aniónico de los componentes del suelo). Para que una sustancia esté biodisponible para las plantas (fitodisponible), tiene que estar en contacto con las raíces, ser móvil y estar en una forma accesible para las mismas. En los suelos, sólo una pequeña fracción del contenido total de un elemento traza, es fitodisponible, por lo que su determinación es

tanto o más importante como la de su contenido total. La fitodisponibilidad de un determinado elemento traza en un suelo depende de factores del propio suelo (pH, potencial redox, textura, materia orgánica, composición mineral, régimen hídrico), así como de la propia planta (Kabata-Pendias, 2004).

Existen métodos que permiten estimar la concentración de los elementos traza en cada una de las fracciones en que estos se encuentran distribuidos entre los



**Figura I.3.** Secuencia de movilidad y biodisponibilidad de los elementos traza en el suelo.

componentes del suelo (Figura I.3). Estos son los denominados métodos de fraccionamiento o especiación, métodos operacionales, en los que se somete al suelo a una serie de extracciones secuenciales. En cada una de las extracciones se utilizan diferentes disoluciones para extraer selectivamente los elementos traza de cada uno de los componentes del suelo, estableciéndose distintas fracciones. El número de fracciones puede variar según el método, aunque tradicionalmente se han distinguido las siguientes: a) elementos solubles y fácilmente intercambiables o disponibles, b) elementos unidos a los carbonatos, c) elementos unidos a los óxidos de Fe y Mn, d) elementos unidos a la materia orgánica y a los sulfuros y e) elementos en la fracción

## I. INTRODUCCIÓN

residual (Tessier et al., 1979; Salomons y Forstner, 1980; Pickering, 1986; Lena y Gade, 1997). En la primera fracción se encuentran las formas químicas más lábiles de los elementos, mientras que en la fracción residual se encuentran aquellas más fuertemente retenidas, como son las que forman parte de la estructura cristalina de los minerales del suelo. En el resto de fracciones los elementos traza muestran un grado de retención variable que está en función de algunos factores, como el pH y el potencial redox del suelo (Ahumada y Schalscha, 1993; Gambrell, 1994). En consecuencia, la separación de las diferentes formas químicas y mineralógicas de un elemento en el suelo puede ser útil para evaluar su movilidad y disponibilidad (Allen, 1997).

A pesar de su amplia utilización, las fracciones definidas en estos procedimientos son completamente operacionales, por lo que la información que proporcionan es básicamente cualitativa y los datos obtenidos deben considerarse como orientativos. También es importante tener en cuenta que la utilización de diferentes metodologías puede dar lugar a resultados muy distintos (Ramos et al., 1994). Algunos problemas que surgen en este tipo de procedimientos, independientemente del protocolo empleado se deben a: a) la selectividad limitada de los extractantes empleados, lo que origina contaminación entre las distintas fracciones, b) la redistribución de los elementos traza durante el proceso de extracción o c) una sobrecarga del sistema químico si la concentración del elemento es demasiado alta (Shuman 1985; Pickering 1986; Rauret et al., 1989). Además estos métodos requieren métodos analíticos con alto grado de sensibilidad debido a que en muchos casos la cantidad de elementos traza extraído de alguna de las fracciones es muy pequeña. Por otra parte, estos métodos son tediosos y requieren especial pericia de personal de laboratorio (Adriano et al., 2004).

Uno de los métodos más usados en la actualidad es la extracción secuencial en tres pasos, que da lugar a 4 fracciones distintas: 1) elementos solubles, fácilmente intercambiables y asociados a los carbonatos ( $F_1$ ), 2) elementos asociados a la fracción reducible ( $F_2$ ), 3) elementos asociados a la fracción oxidable ( $F_3$ ) y 4) elementos en la fracción residual ( $F_4$ ) (Rauret et al., 1999).

Existen además métodos consistentes en una simple extracción con ácidos, con agentes quelatantes o con disoluciones salinas, tamponadas o sin tamponar (AEDT, ADTP,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , Coca-Cola, etc.), para estimar la fitodisponibilidad. Estos métodos intentan diluir la disolución del suelo, extraer los elementos intercambiables e imitar la acción de los exudados de las raíces implicados en los mecanismos de importación de la planta. El extractante ideal sería aquel que

reaccionase suavemente con los componentes del suelo y que cuyos resultados estuvieran correlacionados con las cantidades de elementos traza tomados por la mayoría de las plantas. Los resultados que se obtienen por estos métodos, si bien están en concordancia con las interacciones entre los elementos traza y los componentes del suelo, frecuentemente no sirven para predecir su interacción con los organismos vivos. Las plantas por ejemplo, no siempre toman un nutriente o contaminante proporcionalmente a la cantidad estimada por esos métodos (indicadoras), ya que pueden tener mecanismos, tanto para la importación de nutrientes y contaminantes, incluso cuando están en concentraciones muy bajas en los suelos (acumuladoras), como para excluirlos (excluseras), incluso cuando la concentración externa es muy alta (Kabata-Pendias, 2004).

Según algunos autores la medida de la concentración de elementos traza en organismos vivos (bioindicadores) es una aproximación más real para la estimación de la disponibilidad de contaminantes (Madejón et al., 2004; Remón et al., 2013).

### **I.3. Elementos traza (ET) y su origen en el medioambiente.**

El presente estudio se centra en los suelos contaminados por elementos traza (ET) por lo que el tema se irá focalizando precisamente en este tipo de elementos. En primer lugar hay que indicar que los ET forman parte del patrimonio geológico terrestre en el que se distinguen tres grupos de elementos en función de su abundancia (White, 2001):

- Elementos mayoritarios (O, Si, Al, Na, Mg, Ca y Fe).
- Elementos minoritarios (H, C, S, K, P, Ti, Cr, Mn), que pueden ser mayoritarios en determinadas ocasiones.
- Elementos traza, que son el resto de elementos.

El término "elemento traza" se usa ampliamente en la literatura científica y puede tener distintos significados en diferentes disciplinas científicas. Generalmente este nombre se aplica a elementos que se encuentran en pequeñas concentraciones en los distintos compartimentos ambientales, tanto alterados, como no alterados, que cuando su biodisponibilidad es alta, son tóxicos para los organismos vivos, por lo que algunos autores los denominan elementos potencialmente tóxicos. Algunos elementos trazas son esenciales para el desarrollo de los organismos vivos (Fe, Mn, Cu, Zn, B, Mo, Co, Cl, Se, F, I, Si, Cr, V, Ti, As y Ni), y a otros no se les conoce función fisiológica alguna (Cd, Hg, Pb y As). Es frecuente encontrar otras denominaciones como micronutrientes, microelementos, elementos minoritarios, metales traza o metales

## I. INTRODUCCIÓN

pesados, para referirse a estos elementos, pero que no siempre incluyen a la totalidad de ellos (Adriano, 2001; Blum et al., 1998). Los términos micronutrientes, microelementos, elementos minoritarios, son aproximadamente equivalente, e incluyen elementos que son necesarios para el desarrollo de los seres vivos en concentraciones muy pequeñas. En el caso de las plantas Fe, Mn, Cu, Zn, B, Mo, Co, Cl, se encuentran en concentraciones  $< 50 \text{ mg kg}^{-1}$ . En los animales, los microelementos son los mismos que los de la plantas, a excepción del B, además de Se, F, I, Si, Cr, V, Ti, Sn y Ni (Brady y Weil, 2002; Wild, 1988). Un término muy usado en estudios medioambientales es el de metal pesado que incluye metales y metaloides con densidades  $> 5 \text{ g cm}^{-3}$ , asociados a la contaminación y toxicidad, pero que también incluye elementos requeridos por los organismos en concentraciones muy bajas (Adriano 2001). Para algunos autores este término es un tanto arbitrario y no recomiendan su uso (Duffus, 2002; Hodson, 2004; Madrid, 2010).

Aceptando el término elemento traza como uno de los más generalizados en los estudios ambientales, es interesante saber las concentraciones a las que se encuentran estos elementos en distintos compartimentos ambientales. En Ciencia del Suelo elementos traza son aquellos cuya concentración en el suelo es  $< 1000 \text{ mg kg}^{-1}$  (0,1%). A este grupo pertenecen Mn, Cr, Ni, Pb y Zn ( $1 - 1500 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Co, Cu y As ( $0,1 - 250 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y Cd y Hg ( $0,01 - 2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Tabla I.1; Bowen 1979). En bioquímica y biomedicina, elementos traza son aquellos que se encuentran en los tejidos animal y vegetal en concentraciones  $< 100 \text{ mg kg}^{-1}$  (ms). Desde el punto de vista nutricional, elementos traza son los que raramente exceden los  $20 \text{ mg kg}^{-1}$  en los alimentos (Adriano, 2001; Blum et al., 1998).

**Tabla I.1. Elementos traza más abundantes en la naturaleza (Bowen 1979)**

<b>Elemento traza</b>	<b>Intervalos de concentración(mg/kg)</b>
<b>Cr, Zn, Ni, Pb</b>	<b>1-1500</b>
<b>Co, Cu, As</b>	<b>0.1-250</b>
<b>Cd,Hg</b>	<b>0.01-2</b>



Los elementos traza, por tanto, se encuentran en el suelo en concentraciones relativamente bajas, aunque algunos de ellos son esenciales para el desarrollo de los organismos, si bien a partir de ciertas concentraciones y en función de su disponibilidad pueden ser tóxicos para los seres vivos. La Tabla I.2. muestra valores normales y críticos de algunos ET en suelos y plantas.

**Tabla I.2.** Concentraciones de elementos traza en suelos y plantas.

Elemento	Intervalo normal en suelos <sup>(1)</sup>	Concentración total crítica en suelos <sup>(2)</sup>	Intervalo de suficiencia o normalidad en plantas <sup>(3)</sup>		Concentración crítica en plantas <sup>(3)</sup>
			a	b	
mg/kg					
Ag	0,01-8	2	0,1-0,8	0,5	5-10
As	0,1-40	20-50	0,02-7	1-1,7	5-20
Au	0,001-0,02	-	<0,0017	-	-
Cd	0,01-2,0	3-8	0,1-2,4	0,05-0,2	5-30
Co	0,5-65	25-50	0,02-1	0,02-1	15-50
Cr	5-1500	75-100	0,03-14	0,1-0,5	5-30
Cu	2-250	60-125	5-20	5-30	20-100
Hg	0,01-0,5	0,3-5	0,005-0,17	-	1-3
Mn	20-10000	1500-3000	20-1000	30-300	400-1000
Mo	0,1-40	2-10	0,03-5	0,2-5	10-50
Ni	2-750	100	0,02-5	0,1-5	10-100
Pb	2-300	100-400	0,2-20	5-10	30-300
Sb	0,2-10	5-10	0,0001-0,2	7-50	150
Se	0,1-5	5-10	0,001-2	0,01-2	5-30
Sn	1-200	50	0,2-6,8	-	60
Tl	0,1-0,8	1	0,03-3	-	20
U	0,7-9	-	0,005-0,06	-	-
V	3-500	50-100	0,001-1,5	0,2-1,5	5-10
W	0,5-83	-	0,005-0,15	-	-
Zn	1-900	70-400	1-400	27-150	100-400

Notas y Fuentes:

<sup>1</sup>Datos principalmente de Bowen (1979).

<sup>2</sup>La concentración total crítica en el suelo es el intervalo de valores por encima de los cuales la toxicidad se considera que es posible (Kabata-Pendias y Pendias, 1992).

<sup>3</sup>La concentración crítica en las plantas es el nivel que se considera excesivo, o por encima del cual son probables efectos tóxicos: (Kabata-Pendias y Pendias, 2001).

Los ET del suelo tienen varios orígenes: 1) litogénicos que provienen de la litosfera (materiales precursores, roca madre); 2) pedogénicos, procedentes también de la litosfera pero después de los procesos de formación del suelo; 3) antropogénicos, que tienen como origen la actividad humana.

## I. INTRODUCCIÓN

Los ET son constituyentes de los minerales primarios en las rocas ígneas que se formaron a partir del magma fundido. Se incorporaron a estos minerales por sustituciones isomorfas de algunos de los elementos mayoritarios durante la cristalización. Las rocas ígneas ultramáficas (ultra básicas), como las serpentinas y las peridotitas, presentan los contenidos más altos de elementos traza (Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni) (Ross, 1994; Kabata-Pendias y Adriano, 1995), mientras que las rocas ígneas máficas o básicas (como los basaltos) pueden contener cantidades considerables de Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Sr, Ti, V y Zn (Pfeifer et al., 2000). Las rocas ígneas ácidas (como los granitos) contienen concentraciones menores de elementos traza, aunque existen excepciones como U, Zr, Pb, F, Ba, Mo, Pb, Sn, W, Zn (Pfeifer et al., 2000; Kabata-Pendias y Adriano, 1995). Dentro de las rocas sedimentarias, los esquistos son las que presentan mayores concentraciones de elementos traza, destacando su contenido en Ba, Mn, Pb, Sr, Rb, V (Ross, 1994a; Pfeifer et al., 2000).

Los ET también aparecen en las rocas sedimentarias, que comprenden el 75% de las rocas de la corteza terrestre, siendo por tanto más importantes que las ígneas en la constitución de la roca madre de los suelos. Las rocas sedimentarias se formaron por litificación de sedimentos compuestos por fragmentos de roca o minerales primarios resistentes, minerales secundarios como las arcillas, o precipitados químicamente como el  $\text{CaCO}_3$ .

La concentración de ET en las rocas sedimentarias depende las propiedades de sus componentes y de la concentración de ET en las aguas en que se depositaron. Las arcillas y las margas, por ejemplo contienen altas concentraciones de ET debido a su alta capacidad de absorción/adsorción. Las margas bituminosas contienen altas concentraciones de Ag, As, Cd, Cu, Pb, Mo, U, V y Zn y los sedimentos de los que se formaron contiene apreciables cantidades de materia orgánica que actúan como absorbente de ET y sustrato para los microorganismos. En condiciones reductoras se produce acumulación de sulfuros metálicos por precipitación. Otras rocas como la arenisca contienen pequeñas concentraciones de ET (Alloway, 1990).

Los ET litogénicos son relativamente inmóviles en los suelos, pero están sujetos a transformarse en especies más móviles bajo ciertas condiciones, especialmente bajo la influencia de los microorganismos y de los exudados de las raíces de las plantas (Kabata-Pendias y Adriano, 1995).

La meteorización de minerales constituyentes de las rocas produce la acumulación local de los elementos traza en los suelos (Ross, 1994). No obstante, esta

acumulación no suele sobrepasar los umbrales de toxicidad y, además, los elementos traza suelen encontrarse bajo formas poco disponibles para los organismos (Aguilar et al., 1999). Junto a la meteorización de las rocas, las emisiones volcánicas, los fuegos, las tormentas de polvo y otros fenómenos pueden introducir de forma natural ET en los ecosistemas (Ross, 1994; Naidu et al., 2001). Las altas concentraciones de ciertos ET que a veces se encuentran en los suelos pueden deberse a causas naturales, como son p.ej., los suelos desarrollados sobre serpentinas, que tienen altos contenidos en Cr, Ni, Cu y Mn.

Existen además numerosas causas antrópicas que pueden dar lugar a altas concentraciones de elementos traza en los suelos, que pueden superar las de origen natural (Campbell et al., 1983). Jones (1991) y Van Driel y Smilde (1990) pusieron de manifiesto que las actividades humanas han llevado a la modificación de los ciclos naturales de los ET, de forma que los aportes al suelo superan ampliamente a las pérdidas por volatilización, lixiviación o retiradas por las cosechas.

Desde la II Guerra Mundial las actividades de minería y fundición han extraído un volumen de minerales mayor que el extraído durante el resto de la historia de la humanidad (Förstner, 1999). Las operaciones derivadas de la minería: extracción de menas, procesado, retirada de residuos y transporte de los productos semiprocesados, liberan metales y ET al medioambiente que repercuten negativamente en el aire, agua y suelo del entorno en el que se desarrolla la actividad (Aguilar et al., 1999). El abandono de muchas de las minas una vez terminado el proceso de explotación, también constituye un riesgo importante de contaminación con elementos traza (Gustafsson et al., 1999). Concretamente, España que es un país históricamente minero, las antiguas actividades mineras han dejado zonas con contaminación crónica de metales y metaloides. Un ejemplo en Andalucía de degradación medioambiental es la producida en la Faja Pirítica Ibérica por las actividades minero-metalúrgicas desarrolladas desde hace más de 5000 años, con especial incidencia en épocas tartésica, fenicia y romana y posteriormente a gran escala desde mediados el siglo XIX. Estas actividades han dejado un territorio muy degradado, con innumerables escombreras y labores mineras abandonadas que producen un fuerte impacto paisajístico, y aún continúan generando aguas ácidas, sulfatadas, cargadas con metales pesados. Los drenajes ácidos de las minas contaminan los suelos circundantes y, finalmente, son descargados en el cauce de los ríos Tinto y Odiel (Fernández Caliani, 2008; Madejón et al., 2009b; Tornos Arroyo, 2003).

## I. INTRODUCCIÓN

Además, hay que tener en cuenta que aunque han sido hechos esporádicos, los accidentes producidos por las actividades mineras, como el vertido de Aznalcóllar en abril de 1998 en la provincia de Sevilla (Grimalt et al., 1999), contribuyen a la propagación de la contaminación a zonas alejadas de dónde se desarrolló la actividad minera.

Las actividades industriales también son fuente de contaminación. Así, las fábricas de hierro y acero emiten metales asociados con las menas de hierro y níquel (Aguilar et al., 1999). Las fábricas de baterías generan cantidades considerables de Pb, mientras que las industrias del plástico, del textil, y las refinerías, entre otras, pueden generar Al, As, Cd, Co, Cu, Hg, Sn, Ti, Zn y otros elementos. Un ejemplo de población afectada por este tipo de contaminación es el caso de la bahía de Minamata en Japón donde en 1953, un millar de personas padecieron enfermedades neurológicas producidas por el consumo de pescado con altas concentraciones de Hg, procedente de una fábrica de plásticos que vertía a dicha bahía (Hamade y Osame, 1996).

La deposición de partículas contaminadas constituye una importante vía de entrada de los elementos traza en los suelos (Cooke y Abbott, 2008; Querol et al., 1999). Las chimeneas de las centrales eléctricas y térmicas, junto con las emisiones de gases producidos por vehículos, buques y aeronaves, suponen las principales fuentes. Un ejemplo de cómo esta contaminación puede afectar a la población es el caso de la Oroya (Perú) donde las casas, las calles, el hospital, el colegio y unas pocas áreas verdes están cubiertos por un polvo gris con alta concentración de plomo que sale de las chimeneas de una fundición de metales. Esta fundición que ha dado lugar a puestos de trabajo, ha originado también que la mayoría de los niños y mujeres gestantes que habitan en las proximidades sufran las consecuencias de la contaminación con plomo.

La aplicación de fertilizantes fosforados y de lodos de depuradora (Adriano 2001) es la principal fuente de contaminación de elementos traza generada por las actividades agrícolas. Los fertilizantes fosforados contienen normalmente altas concentraciones de elementos traza, entre los que destacan As, Cd, Cu, F, U y Zn (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Los lodos de depuradora pueden presentar también altos contenidos de micronutrientes, ET, además de N, P, K, y materia orgánica y (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). No obstante, la entrada en vigor de la normativa europea sobre la aplicación de lodos de depuradora en agricultura (CEC 1986), ha producido una reducción de los contenidos de elementos traza y una mejora substancial en la calidad de estas enmiendas (Bode, 1998).

Los residuos sólidos urbanos constituyen también una vía de contaminación por elementos traza. Los residuos sólidos urbanos, que se denominan “residuos urbanos” en la Ley de Residuos (Ley 10/1998, del 21 de abril, de Residuos), son aquellos que se generan en las actividades desarrolladas en los núcleos urbanos o en sus zonas de influencia, v.gr.: los domicilios particulares, los comercios, las oficinas y los servicios. Si los residuos no se reciclan, las aguas de lixiviación de los vertederos pueden contaminar con ET las aguas subterráneas, mientras que las incineradoras pueden liberar ET volátiles como el Hg. Siguiendo con los productos de aplicación agrícola, los plaguicidas también pueden introducir cantidades considerables de As y Hg (Kabata-Pendias y Pendias 2001).

#### **I.4. Problemática de los suelos contaminados y su recuperación**

La contaminación del suelo es uno de los principales problemas ambientales a escala global. En Europa, se estima que el número de enclaves potencialmente contaminados es superior a los 2,5 millones y se prevé que este número se incremente un 50% en 2025. La contaminación por elementos traza es una de las más preocupantes, ya que más de 35% de los suelos contaminados está afectados por tipo de contaminantes (Mench et al., 2010). Un dato más a añadir a toda la problemática expuesta es que el coste de gestión y recuperación de estos enclaves asciende a más 6 billones de euros anuales (Panagos et al., 2013). En España Plan Nacional de Recuperación de suelos contaminados (1995-2005) se inventariaron 4.532 emplazamientos como potencialmente contaminados (Real Decreto 9/2005).

En concreto, la recuperación de los suelos contaminados con ET supone una difícil tarea por varias razones: a) la toxicidad de los mismos, b) su resistencia (no pueden ser degradados por los microorganismos, al contrario que los contaminantes orgánicos) y c) su relativa inmovilidad en el suelo (Kabata-Pendias y Pendias 2001). Por tanto, la contaminación con metales pesados y ET es permanente y la completa remoción de estos elementos del suelo es en la mayoría de los casos prácticamente imposible. La recuperación de suelos contaminados con ET es un problema difícil de solventar por medio de las tecnologías convencionales de descontaminación, siendo generalmente necesario diseñar métodos específicos para cada sistema ET-suelo-planta (Kabata-Pendias y Pendias, 2001).

La selección de la técnica o conjunto de técnicas a aplicar para recuperar un suelo contaminado, va a depender fundamentalmente del nivel de limpieza deseado, de la

## I. INTRODUCCIÓN

duración de las tareas de limpieza, de la cantidad y de la forma en que se encuentren los contaminantes, de las características de la zona afectada y del coste de las operaciones (Adriano, 2001). Entre las estrategias para la recuperación de suelos contaminados con ET cabe destacar: la remoción o retirada, la contención, la descontaminación (*ex situ* o *in situ*) y la estabilización (*in situ*).

La *remoción o retirada* del suelo se aplica cuando las técnicas de descontaminación o estabilización no ofrecen garantías a corto o largo plazo. El suelo se traslada a un vertedero donde se trata de aislar adecuadamente. Normalmente se utiliza cuando se trata de episodios de contaminación puntual y severa.

Cuando el grado de contaminación es alto y no afecta exclusivamente a la superficie del terreno sino que hay una clara amenaza a otros compartimentos sobre todo el hidrológico, es necesario el *aislamiento o sellado* del emplazamiento y el control de los lixiviados, bien mediante barreras geoquímicas construidas en la dirección del flujo interno, bien extrayendo las disoluciones o tratándolas en el exterior. El área contaminada se rodea por barreras impermeables de arcilla o de otros materiales que se anclan al sustrato o se introducen bajo el suelo mediante la perforación de pozos de inyección.

Como alternativa a la remoción y al sellado han surgido una serie de técnicas más innovadoras basadas en la aplicación de procesos químicos y físicos (USEPA, 1996; Evanko y Dzombak, 1997). Sin embargo, la mayoría de las técnicas basadas en procesos físicos o físico-químicos, como la extracción físico-química de metales por lavado ácido y electro-ósmosis, o la inmovilización *in situ* mediante vitrificación, son muy drásticas y caras, precisan de equipos y personal especializado, sólo son adecuadas para la descontaminación *ex situ* o/y de áreas pequeñas y además suponen un deterioro muy importante para el suelo y el entorno. Además por esta técnica la actividad ecológica de los suelos y su productividad queda mermada, por lo que los suelos no quedan aptos para el cultivo o el desarrollo de las plantas (Brown, 1997; USEPA, 1997; Evanko y Dzombak, 1997). Por ello las técnicas de *estabilización*, que no perturban el medio, se establecen para garantizar el mantenimiento de la calidad del mismo, aun cuando no su estricta descontaminación. En los últimos años las investigaciones basadas en la recuperación de suelos contaminados con ET se han centrado en el desarrollo de métodos alternativos de aplicación "*in situ*", capaces de inmovilizar ET, que fueran económicamente viables y sobre todo, más respetuosos con el medio ambiente. Dentro

de estas técnicas se encuentran la denominada *recuperación o atenuación natural asistida* y la *biorrecuperación*.

Estas tecnologías proporcionan herramientas medioambientalmente eficientes y respetuosas con el medio ambiente para la restauración/rehabilitación de suelos, mejorando la calidad de los mismos y la de los seres vivos que se desarrollan en ellos, contribuyendo además al secuestro de C y a reducir en parte el problema del calentamiento global, así como a mantener el uso sostenible del ecosistema (Vangrosveld et al., 2009). Estas tecnologías suelen aplicarse cuando el grado de contaminación no es muy intenso, como un método paliativo de los riesgos ambientales o como un complemento de otros métodos (contención, sellado etc.). Se trata de técnicas blandas, de bajo coste, escasa demanda de infraestructura y fácil ejecución.

#### **I.4.1. Recuperación natural asistida**

Según la USEPA (1999) la *atenuación natural* es “el uso de procesos naturales para contener la propagación de la contaminación por vertidos químicos y reducir la concentración y la cantidad de contaminantes en los sitios contaminados”. También suele denominarse *recuperación intrínseca*, *bioatenuación* y *biorrecuperación intrínseca*. En la *atenuación natural* (AN) o *recuperación natural* (RN) tienen lugar una serie de procesos que reducen la masa, la toxicidad, la movilidad, el volumen o la concentración de los contaminantes en el medio. Dichos procesos son físicos, químicos o biológicos y comprenden la biodegradación, la dispersión, la dilución, la adsorción/absorción, la volatilización y la estabilización química o bioquímica de los contaminantes (van Cauwenberghe y Root, 1998; Declercq et al., 2012; Adriano et al., 2004).

Este método es válido para sustancias orgánicas e inorgánicas, aunque la forma de actuación es distinta en cada caso. En el caso de los ET, al ser generalmente persistentes e inmutables, no pueden ser degradados, por lo que el objetivo de estas técnicas es la reducción de la movilidad o de la disponibilidad, en definitiva la estabilización de los ET en el suelo. Los procesos que dan lugar a la inmovilización son: 1) adsorción sobre las superficies de los minerales y materia orgánica del suelo; 2) formación de sólidos insolubles (precipitación); 3) importación por los microorganismos y por las plantas; y ocasionalmente 4) volatilización (Hg, y compuestos metilados de Hg, As y Se). Tanto en los procesos de adsorción, como en la

## I. INTRODUCCIÓN

precipitación tienen gran importancia las propiedades del suelo: pH, potencial redox, presencia de agente quelantes, presencia de ligandos capaces de precipitar los ET (Waters et al., 1998; Adriano et al., 2004). Un paso más en esta filosofía de estabilizar en vez de extraer, es la *recuperación natural asistida* (RNA), consistente en la potenciación de esos procesos naturales mediante la aplicación de enmiendas y la utilización de plantas (Adriano et al., 2004).

### I.4.2. Biorrecuperación

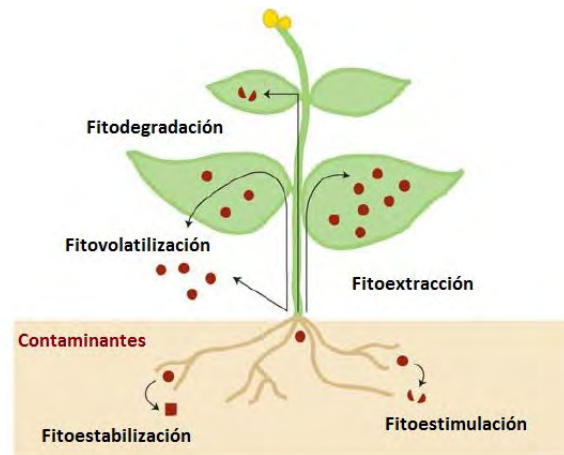
Las técnicas de *biorrecuperación* están basadas en la acción de los microorganismos y/o en los efectos de las plantas y sus microorganismos asociados sobre los ET del suelo (Mench et al., 2009). En concreto las “*fitotecnologías*” están fundamentalmente en las ventajas que ofrecen las plantas y sus microorganismos asociados.

#### I.4.2.1. Fitorrecuperación de suelos contaminados

Las plantas capaces de crecer en ambientes contaminados con ET, desarrollan complejos mecanismos para protegerse de tal contaminación. Estos mecanismos no son fáciles de identificar, debido a su gran variedad y complejidad, aunque se han descrito unas tendencias generales que permiten clasificar las plantas superiores en tres grandes grupos, en función de los mecanismos de resistencia a los elementos traza: exclusoras, indicadoras y acumuladoras (Baker, 1981). Las plantas exclusoras mantienen niveles muy bajos del ET en su parte aérea y sólo a concentraciones muy altas, las barreras que limitan la absorción y transporte de dichos elementos pueden perder su funcionalidad (niveles tóxicos), aumentando entonces la concentración de ET en los tejidos de la planta, a veces hasta niveles letales. En las plantas indicadoras la concentración interna del ET en ellas refleja la concentración del suelo, gracias a la regulación de la absorción y transporte a la parte aérea. Las plantas acumuladoras almacenan los ET preferiblemente en la parte aérea, gracias a un transporte eficaz desde la raíz, resultando una razón de concentración entre parte aérea y raíz mayor que uno.

Las fitotecnologías tienen muy en cuenta estos mecanismos o estrategias que las plantas desarrollan naturalmente para protegerse de la contaminación (Figura I.4). Así, dentro de las fitotecnologías, las técnicas de *fitoestabilización* o *fitoinmovilización* tienen como estrategia la contención de la contaminación (Robinson et al., 2009). La *fitoestabilización* está basada en la acción mecánica de las raíces, que evita la erosión y el transporte del suelo, así como en la disminución de la lixiviación, debido al aumento





**Figura I.4.** Procesos de fitorecuperación. Imagen tomada desde <http://www.hemp.com/2012/06/soil-contamination-phytoremediation-with-hemp/>.

de la evapotranspiración. La *fitoinmovilización* (o *rizofiltración*) implica la absorción, precipitación y acumulación de los contaminantes en la zona radicular, que se lleva a cabo en colaboración con los microorganismos existentes en dicha zona. En ambos casos, tienen como finalidad la prevención la movilidad de los contaminantes en la cadena trófica, evitar su percolación a aguas subterráneas y facilitar la retención de partículas que puedan ser directamente ingeridas o inhaladas (Méndez y Maier, 2008). Las plantas más eficaces utilizadas en estas técnicas son las exclusoras y a veces las indicadoras.

Por otra parte, la *fitoextracción* se basa en la utilización de plantas capaces de tolerar y acumular elementos traza a altas concentraciones en la parte aérea (plantas acumuladoras o hiperacumuladoras) de manera que la biomasa se pueda cortar y guardar o tratar para recuperar si el elemento acumulado es de interés (Brown et al., 1994). Para que este tipo de técnicas sean eficaces las plantas extractoras deben ser capaces de crecer en suelos contaminados, acumular elementos traza y ser resistentes a plagas y enfermedades (Salt y et al., 1998; Bhargava et al., 2012). La mayor parte de los estudios de fitoextracción hasta la fecha se han basado en la identificación y en el uso de plantas hiperacumuladoras. Estas plantas tienen la habilidad natural de acumular elementos traza como Ni, Zn, Cu y Mn a elevadas concentraciones en su parte aérea (0,1-5 % de la masa foliar) (Chaney et al., 1997). A pesar de que algunos trabajos han demostrado la eficacia acumuladora de algunas especies, este tipo de técnicas presenta múltiples inconvenientes para constituir una verdadera alternativa a los métodos de recuperación existentes: a) generalmente las plantas hiperacumuladoras desarrollan poca biomasa, b) sólo son capaces de acumular al mismo tiempo uno o dos elementos, por lo

## I. INTRODUCCIÓN

que no son eficaces en suelos contaminados con varios elementos, c) la eficacia de la extracción disminuye tras cada cosecha, ya que la reposición de los ET en la disolución del suelo disminuye con el tiempo, con lo que disminuye la biodisponibilidad y d) ésta técnica implica un alto riesgo de entrada de los contaminantes en la cadena trófica si no se controla la herbivoría (Clemente et al., 2005; Bhargava et al., 2012). Muchos autores han utilizado la aplicación al suelo de diversas sustancias como agentes quelantes sintéticos para aumentar la biodisponibilidad de los ET en el suelo. A esto se le ha denominado *fitoextracción asistida* o *inducida*, pero los resultados no han sido generalmente positivos, debido a diversas causas: a) los quelatos formados suelen ser muy estables, no liberando los ET a la disolución del suelo para que sean tomados por las plantas; b) los agentes quelantes pueden producir toxicidad para las plantas, extraer y movilizar ET que las plantas no tienen capacidad de absorber, producir contaminación de las aguas subterráneas, etc. (Kahn et al., 2000; Chaney et al., 2010)

La *fitovolatilización* consiste en el uso de plantas que absorben los contaminantes del suelo y los transforman en especies volátiles (Wenzel et al., 1999). Esta técnica se puede emplear en la descontaminación de suelos contaminados con algunos elementos traza (volátiles), haluros y compuestos orgánicos. La *fitodegradación* se ocupa de los procesos en que los contaminantes son absorbidos y transportados a la parte aérea de la planta donde se degradan a metabolitos no tóxicos o rizodegradación si se degradan a nivel de la raíz. Esta técnica se aplica para contaminantes orgánicos ya que los ET no se pueden degradar.

### **I.4.3. Necesidad del uso de enmiendas**

Los suelos contaminados tienen normalmente poca fertilidad, bajos contenidos de materia orgánica y en ocasiones pH muy ácidos. El establecimiento de una cubierta vegetal en estos de suelos resulta muy difícil a no ser que se le aplique enmiendas orgánicas o inorgánicas (Madejón et al., 2006a, 2010; Wong, 2003; García Izquierdo y Lobo Bedmar, 2007; Pérez de Mora et al., 2006bc, 2011). Por otra parte la RNA contempla la aplicación de enmiendas al suelo para potenciar los mecanismos de AN que se producen en el suelo (v. gr.: reacciones de adsorción/absorción, precipitación y complejación), que reducen la movilidad y la biodisponibilidad de los contaminantes, dando lugar a la estabilización de la contaminación (Adriano et al., 2004). Además, las enmiendas pueden facilitar el establecimiento de plantas en suelos degradados y mejorar la actividad microbiana (Pérez de Mora et al, 2005; Madejón et al, 2006a; Bolan et al.,

2011). Sin embargo, el potencial de los tratamientos de estabilización *in situ* (RNA) de los suelos contaminados por ET requiere la validación a largo plazo en experimentos de campo para evaluar su sostenibilidad o durabilidad, especialmente cuando se aplican enmiendas orgánicas (Pérez de Mora et al., 2007).

La utilización de subproductos como enmiendas del suelo, tiene gran importancia desde el punto de vista del mantenimiento de la calidad ambiental, ya que es una forma de reducir la eliminación de residuos y de revalorizarlos (Lombi et al., 2002).

Se han utilizado numerosos productos como enmiendas para recuperar suelos contaminados con ET (Knox et al., 2001). Algunos ejemplos son: cal, zeolitas, apatito, óxidos de Fe y Mn, biosólidos estabilizados compostados, minerales de la arcilla y subproductos industriales tales como la beringita. Además de la estabilización de los ET, el uso de estos materiales en la rehabilitación de suelos cumple dos objetivos: i) el reciclaje de subproductos, ya que en las sociedades modernas la gestión adecuada de los residuos y desechos se ha convertido en esencial y ii) la regeneración del suelo. La aplicación de alcalinizantes y composts estabilizados parece ser muy eficaz para aumentar el pH y el contenido de materia orgánica del suelo (Pérez de Mora et al., 2006b). Además, la aplicación de las enmiendas puede actuar como una fuente de nutrientes disponibles a largo plazo que mejoran la fertilidad del suelo (Alburquerque et al., 2011).

Desde un punto de vista agrícola y forestal, la reutilización de residuos con una importante carga orgánica supone un efecto muy positivo para el suelo, ante el preocupante problema, cada vez más extendido, de la degradación de los suelos cultivados (Agele et al., 2007; López Piñeiro, 2007). En el caso de suelos contaminados por ET, la *estabilización y fitorrecuperación*, en los que se usan enmiendas y plantas que alteran las formas físicas de los ET y en definitiva su movilidad, son técnicas muy a tener en cuenta como viables desde el punto de vista ambiental y económico (Madejón et al., 2009a, 2010; Vangronsveld et al., 2009; Pardo et al., 2014).

La aplicación de enmiendas y el establecimiento de plantas en suelos contaminados constituyen la llamada *fitoestabilización asistida*; las enmiendas contribuyen al aumento del pH del suelo y a la disminución de la concentración de ET disponibles, con lo que se mejoran las condiciones físico-químicas del suelo para un mejor establecimiento de la cubierta vegetal. Dicha cubierta vegetal también contribuye a la inmovilización física del suelo contaminado y a la estabilización de los

contaminantes en la rizosfera (Adriano et al., 2004; Vangrosveld et al., 2009). La aplicación de enmiendas, sobre todo las enmiendas orgánicas, promueve la diversidad y la actividad microbiana del suelo (Bernal et al., 2006; Pérez de Mora et al., 2005; Renella et al., 2008). Los microorganismos del suelo también juegan un papel notable en la *fitorreparación*, ya que no sólo afectan a la movilidad de los ET, sino también al desarrollo de las plantas (Kidd et al., 2009). La comunidad microbiana del suelo puede aumentar o disminuir la fitodisponibilidad de los ET mediante la biodegradación y la mineralización de la materia orgánica. Los cambios sobre la fitodisponibilidad pueden ser beneficiosos en uno u otro sentido, pues al aumentar la biodegradación, se favorece la *fitoextracción* de los ET por plantas hiperacumuladoras, mientras que al aumentar la mineralización, mejora la eficacia de la *fitoestabilización/fitoinmovilización*.

#### **I.4.4. Importancia de las cubiertas vegetales en la recuperación de suelos contaminados**

La vegetación juega un papel crucial en la restauración de las zonas degradadas y contaminadas, ya que en primer lugar es un gran anclaje físico del suelo que reduce la erosión, amortigua la dispersión de partículas contaminantes y reduce la contaminación de los suelos adyacentes y de las aguas superficiales y subterráneas (Tordoff et al., 2000). La revegetación ha sido tradicionalmente usada para recuperar la cubierta vegetal las áreas degradadas, lo que evita la pérdida del suelo por los procesos erosivos y restituye la calidad ambiental y paisajística de la zona (Moreno, 2005; Domínguez et al., 2008). Sin embargo, la posible absorción por las plantas de ET implica varios peligros como es la introducción en la cadena alimentaria de dichos elementos (McLaughlin, 2001). Así, el estudio de las propiedades del suelo y de la vegetación elegida es necesario para evaluar la eficacia de las medidas de recuperación en la ecología de los ecosistemas y el riesgo que supone el contenido de ET (Madejón et al., 2006a).

Entre las estrategias de revegetación de zonas contaminadas por elementos traza, se puede optar por potenciar la proliferación de la vegetación espontánea que surge del banco de semillas de la zona, o por el contrario inducir una vegetación que conlleve algún tipo de beneficio económico y paisajístico. En la presente memoria de tesis se contemplan ambas posibilidades.

##### *I.4.4.1. La vegetación espontánea*

La vegetación espontánea tiene lugar cuando un conjunto de especies vegetales autóctonas se instala sobre el terreno desnudo, o cuando otras sustituyen a las

anteriormente existentes sin intervención directa del hombre a través de siembras, plantaciones, eliminación selectiva, etc. Es la vegetación natural correspondiente a una etapa de la sucesión natural, que las condiciones del clima, suelo y otros factores ambientales determinan en el momento actual del territorio (Seoánez, 1999).

La vegetación natural puede proporcionar información acerca de las condiciones del medio (suelo-clima), pues el que consigan implantarse unas y otras plantas en un determinado lugar viene condicionado por el propio medio (Porta et al., 2003). En los suelos contaminados con ET, las plantas pueden evitar sus efectos tóxicos colonizando áreas donde la concentración sea menor, o mediante mecanismos de exclusión o absorción selectiva (Madejón et al., 2006a). Una de las condiciones básicas para la colonización de suelos contaminados con ET es la capacidad de las plantas para la resistencia de a los mismos (Ross, 1994).

El papel directo de la vegetación sobre el suelo deriva de su acción pantalla frente a la radiación solar y al agua de lluvia, lo que afecta el régimen de humedad del suelo, la infiltración, la escorrentía y la erosión. La vegetación también tiene efecto sobre la fertilidad del suelo, mediante el aporte de materia orgánica, que contribuye tanto a la inmovilización de contaminantes, como a la liberación de nutrientes (Porta et al., 2003). A su vez, a través de su sistema radicular las plantas excluseras contribuyen a la inmovilización de los elementos contaminantes. Una vez establecida la cubierta vegetal pionera, el sistema puede actuar como autosostenible. Pastor y Hemández (2002), en su estudio de suelos contaminados con elementos traza en vertederos sellados de diferentes características litológicas del substrato (arenosos, granitos, yesosos y calizo-margosos), encontraron una gran diversidad de especies espontáneas (más de 300) de la familia de las gramíneas, leguminosas, cariofiláceas, crucíferas y compuestas, que corresponde por lo general a las especies herbáceas de los ecosistemas de entorno.

En las zonas semiáridas, las comunidades de plantas pioneras en suelos afectados con ET están muy bien adaptadas a la presencia de contaminantes, a la pobreza en nutrientes y a la baja disponibilidad de agua (Freitas et al., 2004; Madejón et al., 2009a). Esta vegetación juega un papel fundamental en el ciclo de los ET y los nutrientes durante las primeras etapas y condiciona la sucesión secundaria en áreas contaminadas, sobre todo en estas condiciones. La principal ventaja de adoptar esta estrategia es que los gastos de manejo de la vegetación son prácticamente nulos. En este caso, lo que se requiere es reducir al mínimo la acumulación de ET en la biomasa aérea, lo que supone es un desafío importante para cualquier programa de fitomanejo a gran

escala (Domínguez et al., 2008). Por lo tanto, es necesario el estudio de estas plantas desarrolladas espontáneamente para determinar el riesgo asociado a la acumulación de elementos traza en la parte aérea, así como la su posible uso como bioindicador de la contaminación del suelo.

### *1.4.4.2. Uso de plantas de crecimiento rápido. Caso de Estudio Paulownia sp.*

Otra de las técnicas con mayor potencial para el uso y recuperación de suelos contaminados y degradados, tanto desde el punto de vista sostenible y medioambiental, como económico, es el uso de plantas de crecimiento rápido (Conesa et al, 2012; Dauber et al., 2012; Shortall, 2013). La implantación de plantas arbóreas y arbustivas en zonas deterioradas y contaminadas es importante por los beneficios que se obtienen sobre la calidad del suelo, prevención de la erosión del mismo, adición de materia orgánica y enriquecimiento de la abundancia y diversidad de los microorganismos del suelo (Mertens et al., 2007; Ciadamidaro et al., 2014a, 2014b). Además de los efectos beneficiosos para el suelo, la biomasa de estas plantas podría ser usada como una posible fuente de energía.

El uso de árboles de crecimiento rápido es una herramienta prometedora para reducir el CO<sub>2</sub> atmosférico y para la producción de biomasa (Calfapietra et al., 2010). Sin embargo, a este tipo de árboles se les han atribuido efectos negativos sobre la fertilidad del suelo (Alfaia et al., 2004), ya que suelen demandar altas concentraciones de nutrientes (Szott et al., 1991). El uso de enmiendas en este tipo de plantaciones podría ser una alternativa a los fertilizantes minerales, y podría proporcionar, como se ha comentado anteriormente, una solución interesante para reciclaje de residuos. La aplicación de enmiendas orgánicas, además de la liberación de nutrientes (Larchevêque et al., 2006), pueden ofrecer beneficios adicionales a los fertilizantes minerales, ya que también pueden mejorar la estructura del suelo y, en consecuencia, crear mejores condiciones para el desarrollo de las raíces.

De entre los árboles más utilizados con fines energéticos en zonas degradadas destacan el álamo y el sauce, que han sido implantados en numerosas partes del mundo, especialmente en aquellas afectadas por la contaminación de ET (Meers et al., 2005, Lavoie et. al., 2010; Zalesny et al, 2012; Ciadamidaro et al., 2013, 2014a, 2014b). Además, se han probado otras especies arbóreas como la *Paulownia fortunei*, tanto en suelos contaminados con ET, como en suelos muy degradados (contenido en COT

menor 1%). En concreto es esta la especie elegida como vegetación inducida en los estudios llevados a cabo en la presente memoria.

Paulownia es un árbol de crecimiento rápido de hoja caduca con propagación vegetativa y tolerancia a las diferentes condiciones de suelo y clima (Wang y Shogren, 1992). Este árbol es originario de China donde hay más de 15 millones de hectáreas plantadas, y su distribución natural se extiende desde climas tropicales a climas templados. Este árbol podría ser considerado como una planta de baja demanda hídrica, a pesar de no ser capaz de crecer espontáneamente en zonas áridas (Lucas-Borja et al., 2011). Esta especie tiene una elevada producción de biomasa durante su fase de crecimiento (Chirko et al., 1996), y habiéndose calculado que cada árbol, a la edad de 5-7 años, podría producir un metro cúbico de madera, produciendo anualmente  $150 \text{ t ha}^{-1}$  de biomasa en plantaciones intensivas con cerca de 2.000 árboles por hectárea (Lucas-Borja et al., 2011).

Una de las propiedades de la Paulownia para la producción de biomasa es su facilidad de secado al aire libre (alcanza 10-12% humedad desde aprox. 50% humedad en menos de 40 días.). Esto significa que no es necesario emplear costosos sistemas de secado artificial, permitiendo entregar la biomasa en centrales termoeléctricas a precios inferiores que otros tipos de biomasa.

El cultivo de Paulownia a gran escala, para la producción de biomasa con fines energéticos, tiene su fundamento en su buena adaptación de la misma a los suelos y la climatología existente en algunas zonas de España, donde desde hace más de 8 años se han realizado ensayos con buenos resultados. Paulownia presenta ventajas como son la ausencia de enfermedades, la menor necesidad de agua que otros cultivos con la misma producción, la gran ventaja del rebrote de cepa después de la corta, la escasa necesidad de cuidados especializados, la posibilidad de asociar cultivos herbáceos entre sus calles de plantación, etc.

### **I.5. Papel de las enmiendas y de las cubiertas vegetales sobre la fertilidad bioquímica del suelo, el aprovechamiento energético de biomasa vegetal y en el secuestro de C en suelos degradados y contaminados.**

Como se ha comentado anteriormente, las enmiendas pueden aumentar la fertilidad y estabilizar la contaminación de los suelos, siendo ambas estrategias fundamentales en los programas de recuperación de suelos contaminados. Por ello, reciclar residuos para poder suplir la escasez de materia orgánica y aumentar la fertilidad, contribuye a paliar

## I. INTRODUCCIÓN

la degradación de los suelos, coadyuvando al secuestro de C, a la mejora de su calidad y al aumento de la biodiversidad. Por otra parte el establecimiento de una cubierta vegetal natural o inducida también contribuye a la regeneración de los suelos contaminados debido a que la rizosfera es una fuente de alimento y un refugio para los microorganismos, por lo que aumenta la actividad microbiológica (Kozdroj y van Elsas, 2000; Macek et al., 2000; Pérez de Mora et al., 2005; Tordoff et al., 2000).

Tanto las formas de materia orgánica exógena, p. ej. la que se añade con las enmiendas, como los compuestos orgánicos exudados por las raíces de las plantas, activan los procesos químicos y biológicos del suelo, recuperando y promoviendo la actividad microbiana del suelo. (Vangronsveld y Cunningham, 1998; Rajkumar et al., 2012; Ciadamidaro et al., 2013).

En el suelo tienen lugar una serie de procesos de intercambio de moléculas e iones entre las fases sólidas, líquidas y gaseosas, que tienen gran importancia para mantener su salud. En estos procesos que tienen lugar entre los componentes físicos, químicos y biológicos, están dominados por estos últimos. El componente biológico, a pesar de representar menos del 5% del volumen de suelo de la capa arable y menos del 10% de la materia orgánica total, juega un papel fundamental en los ciclos del N, S y P, en la descomposición de los residuos orgánicos y por tanto el ciclo global del C. Además, los microorganismos tienen efectos positivos sobre las propiedades físicas del suelo, mediante la producción de sustancias que facilitan la agregación de las partículas de suelo, coadyuvando al mantenimiento de la estructura del mismo (Nielsen y Widing, 2002).

Los microorganismos responden rápidamente a los cambios, por lo tanto, se adaptan rápidamente a las condiciones ambientales. Esta adaptación permite que el análisis microbiano sirva para la evaluación de la calidad/salud del suelo, de los cambios en las poblaciones y las actividades microbianas, y por tanto, funcionar como un excelente indicador de cambio en la salud del suelo. Por tanto, debido a su importancia en la funcionalidad del suelo, la actividad y la población microbiana, se han considerado como indicadores útiles para evaluar tanto la mejora, como la degradación del mismo (Dick et al., 1996) y pueden servir como indicadores de los cambios que tienen lugar en el suelo (Fabiani et al., 2009). Sin embargo, no existe un único indicador, o un indicador universal, de la calidad/salud, debido a la multitud de componentes microbiológicos y a las numerosas rutas bioquímicas existentes. Existen muchos parámetros biológicos que se tienen en cuenta para evaluar la calidad del suelo



(Carter et al., 1999; Nielsen y Widing, 2002), aunque no existe un consenso acerca de cuáles son los mejores (Gil-Sostres et al., 2004; Hartley et al., 2008).

El “bioindicador” ideal debería ser fácil de medir, servir para todo tipo de ecosistema, y ser capaz de revelar cuál es el posible problema que ocurre en un determinado suelo. Quizás los bioindicadores más usados por su fácil medida son la biomasa microbiana, la respiración microbiana y las actividades enzimáticas.

Los microorganismos son vitales para la calidad del suelo, ya que tienen un papel destacado en la fertilidad y producción primaria del suelo, por sus funciones relacionadas con la descomposición de la materia orgánica y el ciclo de nutrientes (Alexander, 1977). Asimismo, los microorganismos pueden verse afectados por cambios en las propiedades físico-químicas (pH, potencial redox, materia orgánica, textura, estructura etc.), biológicas (poblaciones, interacciones entre organismos) y/o por la presencia de contaminantes (metales pesados, xenobióticos), por lo que han sido frecuentemente empleados como “bioindicadores” de la calidad del suelo en programas de monitorización medioambiental (Nielsen y Winding, 2002). Así por ejemplo, los ET a determinadas concentraciones, pueden constituir un riesgo para el funcionamiento de los ecosistemas (Majer et al., 2002), alterando negativamente los procesos biológicos de los mismos (Lee et al., 2002). La acumulación de ET en el suelo puede reducir la biomasa microbiana (Chander et al., 1995) y varias actividades enzimáticas, dando lugar a una disminución de la diversidad funcional en el suelo (Kandeler et al., 1996), y a cambios en la estructura de la comunidad microbiana (Pennanen et al., 1998). No obstante, la presencia de ET en el suelo, también puede propiciar el desarrollo de poblaciones tolerantes a los mismos (Ellis et al., 2003). Las actividades enzimáticas por tanto, pueden servir como estimadores rápidos de las alteraciones tanto naturales, como antropogénicas que tienen lugar en los suelos (Giller et al., 1998). Dichas actividades son muy útiles para evaluar los resultados de las técnicas de RNA, ya que no sólo favorecen la estabilización de los elementos traza en el suelo, sino que también mejoran su fertilidad, estimulando los procesos microbiológicos y mejorando la funcionalidad del mismo (García-Gil et al., 2000; Moreno et al., 2003).

Por último, es interesante indicar que el establecimiento de cultivos energéticos, sin fines alimentarios, en zonas contaminadas y degradadas podría ser una alternativa que propiciaría un aumento de la revegetación de estas zonas marginales. A pesar de que la contribución de los cultivos energéticos en la producción de combustibles es aun relativamente pequeño, se va incrementado anualmente (REN21, 2013), y se estima que

## I. INTRODUCCIÓN

para el 2050 los cultivos energéticos contribuirán al 25 % de la producción global de combustibles destinados al transporte (IEA, 2009). Este aumento de la participación de la biomasa en el mercado energético supondría una reducción importante de emisiones de CO<sub>2</sub> con respecto a los combustibles fósiles (Sims et al., 2006; Sartori et al., 2006). La producción de biofuel, biochar, madera y productos agrícolas no consumibles puede ser una alternativa económica para los suelos degradados y contaminados. La Unión Europea está dando prioridad a la producción de biomasa y bioenergía, teniendo en cuenta que la demanda actual es de 5,7 EJ y en 2020 se estima que será de 10.0 EJ (Bentsen y Felby, 2012).

Respecto a la contribución de las enmiendas orgánicas al secuestro de carbono, las estrategias de recuperación de suelos contaminados y degradados, según Van Camp (2004) la materia orgánica exógena constituye una fuente inestimable de materia orgánica para el suelo, y contribuye además a fijar C en el mismo, y por tanto, a disminuir, en parte, el efecto invernadero derivado de la emisión de CO<sub>2</sub> a la atmósfera. La recuperación de suelos y ecosistemas contaminados y degradados tiene, por tanto, un alto potencial para el secuestro de carbono en el suelo. Aunque son numerosos los estudios realizados sobre la recuperación de suelos contaminados y degradados, hay pocos datos sobre la contribución de las enmiendas orgánicas, a la fijación de carbono en el suelo. Lal et al. (1998) han estimado que, a nivel mundial, 2000 millones de 2 ha de los suelos sufren algún tipo de degradación y serían capaces de secuestrar hasta 3 Pg de C al año (Hernández y García, 2014).

La adición de enmiendas orgánicas a los suelos da lugar a un aumento inmediato del contenido de carbono orgánico, que es, en general, proporcional a la cantidad de enmienda aplicada. Esta materia orgánica exógena se mineraliza en gran medida, a una velocidad variable dependiente de la naturaleza y dosis de la enmienda aplicada. Sin embargo, se ha observado que a largo plazo los suelos enmendados contienen mayores cantidades de carbono que los no tratados (Ros et al., 2003; Bastida et al., 2008; Tejada et al., 2009; García et al., 2012), lo que se atribuye en parte al mayor desarrollo de una cobertura vegetal en estos suelos restaurados, debido a la mejora de la calidad de los mismos, conseguida con la enmienda. La cobertura vegetal, contribuye además a la mejora de la calidad física y bioquímica del suelo, y al mantenimiento de niveles adecuados de su materia orgánica. Además, parte de la materia orgánica aplicada como enmienda queda retenida en el suelo asociada a la fracción mineral del mismo, donde quede protegida frente a la descomposición, con lo que aumenta el contenido total de

carbono del suelo (Six et al., 2000; Larney et al., 2009; Nicolás et al., 2012; García et al., 2012). La cantidad de carbono así almacenado en el suelo, depende de la naturaleza, cantidad y calidad de la enmienda orgánica añadida. Los biosólidos, estiércoles animales y otras enmiendas similares, son una excelente fuente de nutrientes fácilmente disponibles para los microorganismos, que reactivan la vida microbiana del suelo (Bendfeldt et al., 2001; Bullock y Ristaino, 2002; Bastida et al., 2008), pero contribuirán, probablemente, en menor medida a largo plazo al secuestro de carbono que las enmiendas orgánicas de tipo lignocelulósico, más recalcitrante, y que tienen una mayor afinidad para unirse a las partículas minerales del suelo. Además, la oxidación microbiana de la lignina a polifenoles, que es una de las vías del proceso de humificación, conducirá a la formación a largo plazo de humus, quedando así retenido el carbono de forma estable en el suelo (Hernández y García, 2014).



## **II. OBJETIVOS**



Aprovechando la existencia de zonas con suelos contaminados afectadas por el accidente minero de Aznalcóllar en los que sólo se había retirado la capa de lodo depositada sobre el mismo, se ha pretendido evaluar la eficacia y la durabilidad de la aplicación de varias enmiendas, así como su influencia en el restablecimiento de una cubierta vegetal espontánea. Asimismo, se estudiará los efectos de las enmiendas y la implantación de una especie de crecimiento rápido (*Paulownia*) en la recuperación (fitorecuperación) de la fertilidad química y bioquímica de los suelos y en la evolución de la contaminación en los mismos.

## HIPÓTESIS

La aplicación de enmiendas:

- Afecta a las propiedades químicas y bioquímicas del suelo.
- Puede disminuir las concentraciones de elementos traza biodisponibles a corto y largo plazo.
- Puede aumentar la fertilidad y la calidad del suelo.
- Puede favorecer el desarrollo de la vegetación espontánea.
- Puede favorecer el desarrollo de las especies de crecimiento rápido y la obtención de biomasa.
- Puede disminuir la translocación de elementos traza a la parte aérea de las plantas.
- Puede ser un método eficiente para la Recuperación Natural Asistida de suelos contaminados con elementos traza.
- Los efectos de las enmiendas dependen del tipo y de las dosis utilizadas.

Para comprobar estas hipótesis se llevarán a cabo dos experimentos, uno en condiciones de campo y otro en contenedores al aire libre (condiciones de semicampo). En el experimento de campo se determinará el estado de las propiedades químicas y bioquímicas de los suelos, con especial atención a la disponibilidad de los elementos traza, a los ocho años de la primera aplicación de tres enmiendas. Asimismo, se estudiará la vegetación espontánea, prestando especial atención a la cobertura vegetal, biomasa y concentración de elementos traza en la parte aérea de las plantas. Además, haciendo uso de los resultados obtenidos en anteriores campañas de muestreo, se

## II. OBJETIVOS

analizará la evolución de las principales propiedades químicas del suelo y de la disponibilidad de los elementos traza durante los ocho años de experimentación.

En el segundo experimento se estudiarán los efectos de dos enmiendas orgánicas sobre la recuperación de un suelo contaminado y sobre el desarrollo de una especie vegetal de crecimiento rápido (*Paulownia fortunei*).

En ambos experimentos los objetivos específicos son los siguientes

1. Estudiar el efecto de enmiendas en las propiedades químicas y bioquímicas de suelos contaminados con elementos traza.
2. Evaluar el efecto de las enmiendas en las variaciones de las concentraciones de elementos traza biodisponibles a medio y largo plazo.
3. Estudiar el efecto de las enmiendas en el crecimiento de la vegetación espontánea.
4. Estudiar el efecto de las enmiendas en el desarrollo de la especie de crecimiento rápido (*Paulownia fortunei*) y en la cantidad y calidad de la biomasa obtenida.
5. Estudiar el efecto de enmiendas en la translocación de elementos traza a la parte aérea de las plantas.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



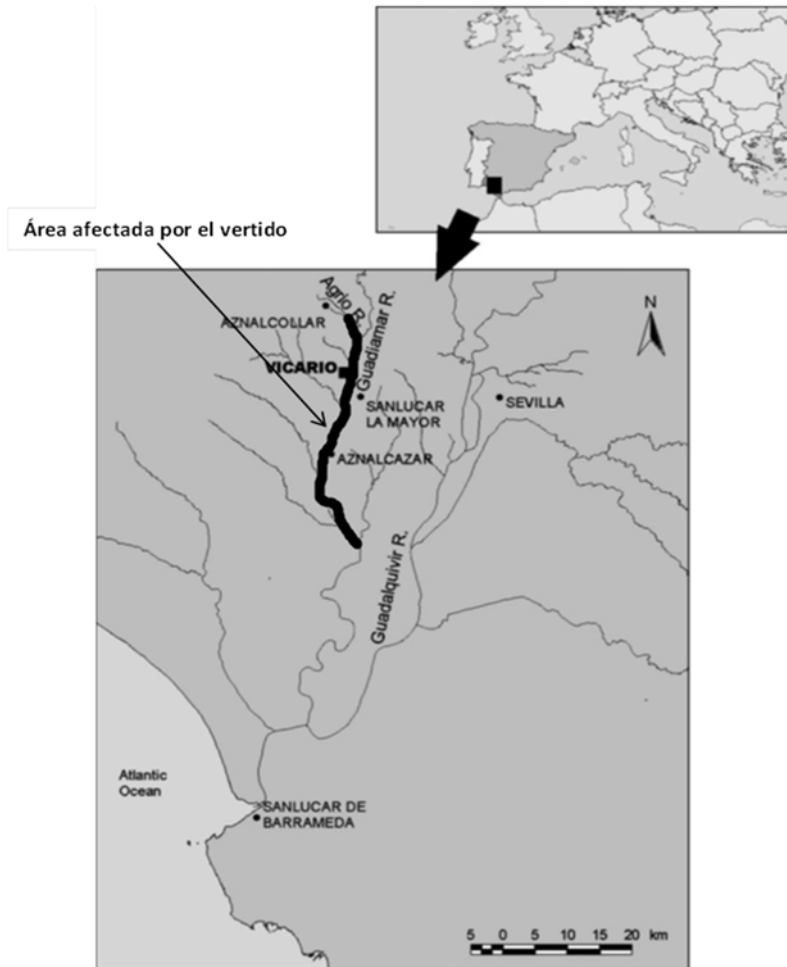
### III. 1. Área de estudio

El complejo minero de Aznalcóllar está situado en el extremo suroccidental del Cinturón Píritico Ibérico, que constituye la más vasta e importante provincia vulcanogénica de sulfuros masivos (depósitos polimetálicos) del oeste de Europa, e incluye a Río Tinto, Aljustrel, Neves Corvo, Tharsis, Sotiel y Aznalcóllar. Se extiende a través de 200 km (unos 8000 km<sup>2</sup> de superficie) desde el suroeste de Portugal hasta Sevilla (Alastuey et al., 1999; López-Pamo et al., 1999).

El 25 de abril de 1998, el dique de contención de la balsa minera de decantación de la mina de los Frailes se desplazó produciéndose una rotura del muro, ocasionando un vertido al río Agrio, afluente del Guadiamar. A través de la brecha de la balsa se vertieron unos 2 hm<sup>3</sup> de lodos y 3-4 hm<sup>3</sup> de aguas ácidas, que inundaron las cuencas de los ríos Agrio y Guadiamar, llegando, hasta la zona de Entremuros, límite del Parque Nacional de Doñana. Los lodos se depositaron en el cauce (985.497 m<sup>3</sup>) y sobre los suelos de las márgenes (996.347 m<sup>3</sup>). La ola de la riada alcanzó hasta 3 m de altura, dejando una franja de unos 300 m a cada margen de los ríos Agrio y Guadiamar, cubierta por una capa de lodo cuyo espesor dependió de la distancia a la balsa y de la elevación con respecto al nivel del río. En las inmediaciones de la balsa el espesor llegó a tener 1,7 m; en 79% de la superficie afectada el espesor de la capa de lodo tenía 2-30 cm (López Pamo et al., 1999). La riada afectó a un total de 4.286 ha, dedicadas en su mayoría a la agricultura y pastos, de las cuales 2.710 ha correspondían a superficie cubierta por lodo y las restantes a zonas afectadas por las aguas (Cabrera, 2000) (Figura III.1)

El yacimiento de los Frailes estaba formado fundamentalmente por sulfuros polimetálicos de Fe, Cu, Pb, Zn y As: pirita (S<sub>2</sub>Fe) con arsenopirita (FeAsS), calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>), galena (PbS), esfalerita o blenda (ZnS), minerales con concentraciones apreciables de Ag, Cd, Hg, Sb y Tl, que se encuentran en sustituciones isomorfas. La composición de los lodos era muy parecida a la del yacimiento, y estaban fundamentalmente compuestos por pirita (con arsenopirita) (75-80%), esfalerita y galena (5%), silicatos (cloritas, nontronitas, montmorillonitas), cuarzo y yeso (15-20%) (ITGE, 1998).

Los suelos afectados por el vertido mostraron concentraciones totales de As, Cd, Cu, Pb, Sb, Tl y Zn en la capa superficial (0-50 cm) mayores que las concentraciones de



*Figura III.1. Área afectada por el vertido y localización de la parcela experimental “El Vicario” y de la zona de muestreo de Aznalcázar.*

fondo de los suelos del valle del Guadiamar (Cabrera et al., 1999, 2008a y b; López Pamo et al., 1999; Simón et al., 1999). En la mayoría de los suelos la contaminación con elementos traza era severa en los primeros centímetros de suelo, decreciendo en profundidad, hasta alcanzar valores normales por debajo de los 20 cm en los suelos con más de un 25% de fracción arcilla, mientras que en los suelos más arenosos la contaminación penetró hasta al menos 50-80 cm (Cabrea et al., 1999).

Los suelos contaminados se sometieron a un programa de recuperación consistente en: a) remoción de los lodos depositados sobre ellos y de una capa superficial de suelo de 5 a 20 cm de espesor. Con la retirada de esta capa superficial, los suelos perdieron gran parte de su contenido en materia orgánica, lo que repercutió negativamente sobre sus propiedades físicas, químicas y biológicas. La remoción de los lodos y suelos contaminados constituyó una tarea de gran envergadura en la que se retiraron 7 hm<sup>3</sup> de material contaminado en una primera fase de limpieza, hasta

diciembre de 1998, y 0,82 hm<sup>3</sup> en la fase de relimpieza, hasta febrero de 2000 (Arenas et al., 2001); b) adición de materiales ricos en carbonato cálcico (espuma de azucarera y cenizas de pasta de celulosa, a razón de 20-40 Mg ha<sup>-1</sup>), con objeto de aumentar el pH y disminuir la movilidad de los elementos traza catiónicos; c) adición de materiales ricos en óxidos de hierro para disminuir la movilidad de los elementos traza aniónicos y d) aplicación de materiales orgánicos (estiércol y compost, a razón de 20-25 Mg ha<sup>-1</sup>), cuyo primer objetivo fue el de reponer la materia orgánica de los suelos. En todos los casos se homogeneizó la capa superficial (0-25 cm) de los suelos, mediante una labor de grada. (Cabrera et al., 2008b).

Finalizado el plan de medidas puesto en marcha por la administración para controlar el impacto ambiental del accidente minero, se dio paso al denominado Proyecto del Corredor Verde del Guadiamar, cuyos objetivos fundamentales fueron:

- Controlar y recuperar la contaminación generada por el vertido de las minas de Aznalcóllar;
- Recuperar una de las funciones que ejercía el río Guadiamar y su cuenca en el territorio que se había perdido con anterioridad al accidente: su papel como corredor de especies y procesos naturales entre Doñana y Sierra Morena Occidental;
- Mejorar la calidad de vida de los habitantes de la cuenca (CMA, 2001).

Una de las medidas tomadas dentro de este proyecto fue la reforestación de la zona afectada con distintas especies autóctonas (más de 3 millones de plantas), bien adaptadas a las condiciones locales y relativamente tolerantes a la contaminación (Arenas et al., 2008)

Durante todo el proceso de configuración del Corredor Verde, desde el accidente minero hasta la actualidad, se ha desarrollado una intensa actividad científica en torno a la dinámica de la contaminación del suelo y sus efectos sobre los ecosistemas de la zona. Durante los primeros años, esta actividad se centró en la monitorización de los elementos traza en los suelos, aguas superficiales y subterráneas, y en distintos grupos de seres vivos (programas PICOVER I y II; CMA, 2003). Posteriormente en el marco de otros proyectos regionales, nacionales y europeos se ha continuado con el seguimiento de la zona, incluyendo la recuperación de los procesos biogeoquímicos del suelo, el estudio de la diversidad de distintos grupos funcionales de seres vivos y la funcionalidad como corredor ecológico para distintas especies animales (programa SECOVER; CMA, 2008). Asimismo, el Corredor Verde ha servido como zona de

experimentación en multitud de trabajos sobre técnicas de recuperación de suelos contaminados por elementos traza (Walker et al., 2004; Clemente et al., 2006; Madejón et al. 2006; Vázquez et al., 2006; Pérez-de-Mora et al., 2011).

### III. 2. Materiales

#### III.2.1 Suelos

Los dos suelos contaminados elegidos para los experimentos de presenta estudio se localizan en la zona afectada por el vertido de Aznalcóllar. A ambos suelos se les había retirado la capa de lodo y la capa de suelo superficial, de 10-15 cm, en las labores de remoción efectuadas justo después del accidente minero (Cabrera et al., 1999). Los suelos en esta región de España se caracterizan generalmente por un bajo contenido de agua que puede alterar la disponibilidad de elementos traza. La Tabla III.1 muestra las características más relevantes de estos suelos contaminados.

El suelo V procede de la parcela experimental “El Vicario” (N 37°26’21’’; O 6°12’59’’), situada a unos 100 m del río Guadiamar en su margen derecha, a medio

**Tabla III.1.** Valores medios (Media) y desviación estándar (DE) de algunas características de los suelos empleados en los experimentos.

Variable	Suelo V		Suelo AZ		Suelo NC	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
pH	3,86	1,32	6,93	0,09	7,50	0,07
TOC (g kg <sup>-1</sup> )	6,15	0,16	14,7	3,99	5,10	0,15
N-Kjeldhal (g kg <sup>-1</sup> )	0,16	0,14	0,54	0,17	0,31	0,12
P-Olsen (mg kg <sup>-1</sup> )	3,47	0,57	13,9	0,16	11,9	0,78
K-disponible (mg kg <sup>-1</sup> )	55,0	7,55	154	9,56	121	12,2
Total (mg kg <sup>-1</sup> )						
As	211	103	112	53	8,40	1,90
Cd	2,44	1,16	3,82	1,23	0,59	0,05
Cu	169	26,6	166	42,9	19,4	2,01
Pb	571	206	236	13,5	15,7	0,04
Zn	380	36,5	507	34,9	52,0	3,30
Soluble (CaCl <sub>2</sub> ) (mg kg <sup>-1</sup> )						
Cd	0,37	0,26	0,02	0,00	0,01	0,00
Cu	15,0	12,2	0,25	0,07	0,05	0,002
Zn	98,6	64,6	0,03	0,001	0,01	0,00

camino entre el puente de las Doblas y el pueblo de Aznalcóllar. Esta parcela se vio afectada por el accidente minero, y la única medida de recuperación que se llevó a cabo en ella fue la retirada de la capa de lodo y una capa de suelo de 10-20 cm. Es un suelo Typic Xerofluent (Soil Survey Staff, 1996) franco-arcilloso, ácido, con bajos de

fertilidad química y bioquímica, y concentraciones de elementos traza superiores a los valores normales de los suelos no contaminados de la zona. Este suelo se ha utilizado tanto en el experimento de campo, como en el experimento en condiciones de semi-campo para el cultivo de la Paulownia.

El suelo AZ procede de la zona de Aznalcázar (N 37° 18' 4,7" O 6° 15' 39,1'). Es un suelo de bosque, situado en la margen izquierda en rívera del Guadiamar, también afectado por el vertido de Aznalcóllar, que fue sometido a labores de limpieza y aplicación de enmiendas, aunque no se tienen datos concretos a este respecto. El suelo es Typic Xerofluvent (Soil Survey Staff, 1996) franco, con pH cercano a la neutralidad y bastante fértil, tanto desde el punto de vista químico como biológico, a pesar de los niveles de elementos traza. Este suelo se ha utilizado para el experimento en condiciones de semi-campo del cultivo de Paulownia.

En el experimento en condiciones de semi-campo se utilizó además el suelo no contaminado NC, procedente de la finca experimental "La Hampa" perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), situada en el término municipal de Coria del Río (Sevilla), (N 37° 17' 08" 6° 04' 1,5"). Se trata de un suelo Xerochrept (Soil Survey Staff, 1996) arenoso-franco, con pH cercano a la neutralidad, niveles muy bajos de fertilidad.

### **III.2.2 Enmiendas**

#### *III.2.2.1. Espuma de azucarera*

La espuma azucarera (SL) es un producto residual del proceso de obtención del azúcar con un contenido en peso seco de CaCO<sub>3</sub> de 70-80%. Es un material muy empleado para neutralizar el pH en suelos ácidos (Adriano et al., 2004), así como para inmovilizar y disminuir la biodisponibilidad de elementos traza como Cd, Ni o Zn (Geebelen et al., 2003). La espuma de azucarera empleada en este trabajo fue cedida por la empresa Azucarera Ebro SA (San José de la Rinconada, Sevilla) (Tabla III.2.).

#### *III.2.2.2. Compost de biosólidos*

El compost de biosólidos (BC) utilizado fue suministrado por EMASESA y está compuesto por lodos de depuradora de aguas residuales y de restos de poda de parques y jardines de la ciudad de Sevilla (Tabla III.2.). Los biosólidos han sido empleados durante más de 25 años en la recuperación de zonas degradadas por diferentes tipos de actividades (Sopper, 1993). Recientemente, su utilización se ha extendido también a la recuperación de zonas contaminadas por metales pesados (Compton et al., 2001).

*III.2.2.3. Leonardita*

La leonardita (LE) es una forma oxidada del carbón de origen lignítico formada, principalmente, por sales de ácidos húmicos y fúlvicos. La leonardita empleada en este estudio proviene de una cantera en las minas de Ariño (Teruel), explotada por DAYMSA S.A. (Zaragoza) (Tabla III.2.). Aunque su uso más común es como fertilizante y acondicionador del suelo en agricultura y horticultura, diversos autores han comprobado la eficacia de este material en la absorción/adsorción de metales pesados (Allen et al., 1997; Solé et al., 2003).

*III.2.2.4. Compost de alperujo*

El compost de alperujo (AC) fue suministrado por la cooperativa de Cotobajo (Guadalcazar, Córdoba). El alperujo es un subproducto de las almazaras de sistemas de dos fases. Es una la mezcla de aguas de vegetación, partes sólidas de la aceituna (hueso, mesocarpio y piel) y restos grasos. El co-compostaje se ha realizado mediante la mezcla de alperujo con restos de leguminosas y estiércoles procedente de agricultura ecológica (Tabla III.2.).

**Tabla III.2.** Valores medios ( $\pm$ DS) de algunas características de las enmiendas empleadas en ambos experimento.

	Enmiendas				
	SL	AC	BC1	BC2	LE
pH	9,04 $\pm$ 0,08	8,10 $\pm$ 0,05	6,93 $\pm$ 0,03	7,09 $\pm$ 0,28	6,08 $\pm$ 0,07
Humedad (%)	25,0	14,9	45,0	15,6	27,5
COT (%)	6,70 $\pm$ 1,55	16,4 $\pm$ 1,12	19,5 $\pm$ 1,22	16,6 $\pm$ 0,23	28,9 $\pm$ 0,39
N (%)	0,98 $\pm$ 0,04	1,56 $\pm$ 0,25	2,31 $\pm$ 0,06	2,27 $\pm$ 0,29	1,17 $\pm$ 0,02
P (%)	0,51 $\pm$ 0,06	2,54 $\pm$ 0,10	1,24 $\pm$ 0,02	1,49 $\pm$ 0,05	0,04 $\pm$ 0,001
K (%)	0,53 $\pm$ 0,05	2,30 $\pm$ 0,05	0,93 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,03	3,97 $\pm$ 0,08
As (mg kg <sup>-1</sup> )	1,63 $\pm$ 0,34	2,45 $\pm$ 0,22	5,63 $\pm$ 1,48	13,5 $\pm$ 0,60	34,9 $\pm$ 3,46
Cd (mg kg <sup>-1</sup> )	0,43 $\pm$ 0,15	0,25 $\pm$ 0,01	0,73 $\pm$ 0,40	1,94 $\pm$ 0,09	0,83 $\pm$ 0,11
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	51,0 $\pm$ 8,20	94,2 $\pm$ 1,12	121 $\pm$ 5,66	188 $\pm$ 10,9	28,2 $\pm$ 2,40
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	297 $\pm$ 10,3	360 $\pm$ 5,34	257 $\pm$ 24,8	570 $\pm$ 36	66,2 $\pm$ 1,41
Pb (mg kg <sup>-1</sup> )	39,2 $\pm$ 6,70	9,77 $\pm$ 0,06	137 $\pm$ 26,2	61,4 $\pm$ 4	22,0 $\pm$ 2,33
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	138 $\pm$ 31,0	187 $\pm$ 11,1	258 $\pm$ 18,4	600 $\pm$ 32	64,5 $\pm$ 1,06

COT: Carbon orgánico total

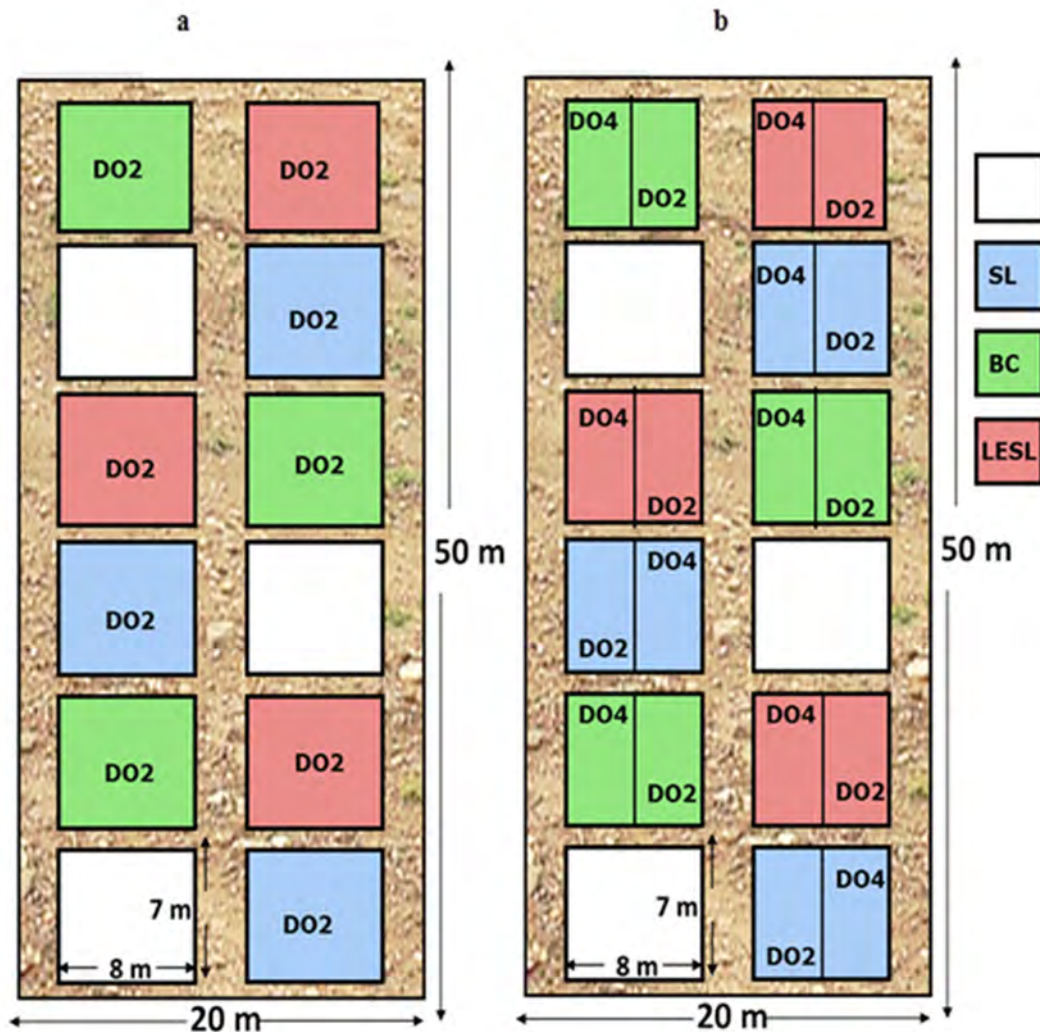
SL: espuma de azucarera; AC: compost de alperujo, BC: compost de biosolidos; LE: leonardita; (n=3) BC1: compost de biosólidos utilizados en el experimento de campo; BC2: compost de biosólidos utilizados en el experimento en contenedores.



### III.3. Diseño de los experimentos

#### III.3.1. Diseño del experimento de campo

El experimento se estableció en una parcela localizada en la finca “El Vicario” (20 x 50m) (Figura III.1), dividida en 12 subparcelas de 7 × 8 metros cada una, con un pasillo de 1 m (largo) y 2 m (ancho) entre las subparcelas (Figura III.2). El experimento se



**Figura III.2.** Distribución de los tratamientos y localización de los puntos de muestreo en la parcela experimental. NA, control sin enmienda; SL, espuma de azucarera; BC, compost de biosólidos; LESL, leonardita + espuma de azucarera. D02, parcelas que recibieron dos dosis (en 2002 y 2003); D04, parcelas que recibieron cuatro dosis (en 2002, 2003, 2005 y 2006). Ver texto, párrafo III.3.1.

comenzó en octubre de 2002, estableciéndose tres tratamientos con enmienda: SL (espuma de azucarera), BC (compost de biosólidos), y LESL (mezcla de leonardita y espuma de azucarera). Asimismo, se estableció un tratamiento control (NA) sin adición de enmiendas. Las dosis de enmienda fueron las siguientes (peso fresco): BC: 30 Mg ha<sup>-1</sup>

año<sup>-1</sup>, SL: 30 Mg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, y LESL: 25 Mg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> más 10 Mg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> de SL. Las enmiendas se incorporan en la parte superior de los 15 cm del suelo usando un apero mecánico (RL328 Honda). Las dosis fueron comparables a las que se aplicaron en la totalidad de zona afectada por vertido tóxico (Antón Pacheco et al., 2001) y se encuentran por debajo de los límites máximos permitidos para la carga establecida por la Unión Europea (Directiva 86/278 / CEE) (CEC, 1986) de aplicación de elementos traza a través de enmiendas.

En una primera fase del experimento las enmiendas se aplicaron durante dos años consecutivos (octubre de 2002 y octubre de 2003). Las subparcelas NA se manejaron de manera idéntica. El experimento se realizó siguiendo un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones por tratamiento (Figura III.2a).

Las muestras de suelo (0-15 cm y 15-30 cm) se tomaron de 48 puntos de muestreo (cuatro puntos por subparcela) en una cuadrícula de 14 m × 15 en la parcela experimental. Los suelos se muestrearon en tres ocasiones: septiembre de 2002 (antes de la aplicación de las enmiendas), septiembre de 2003 (un año después de la aplicación de la primera enmienda y antes de la segunda aplicación) y septiembre de 2004 (un año después de la segunda aplicación). En diferentes momentos se realizó un muestreo de (diciembre de 2003, marzo de 2004 y junio de 2004) de las plantas silvestres que colonizaban las parcelas. En diciembre de 2003, marzo de 2004, junio de 2004 y marzo-abril de 2005 fueron recogidas muestras de las especies gramíneas más frecuentes para su análisis. Asimismo, se identificaron y enumeraron las especies de plantas, y se estimó la biomasa vegetal y recubrimiento vegetal.

En la segunda etapa de los experimentos, que se inició en octubre de 2005, cada subparcela se subdividió en dos mitades iguales (Figura III.2b). Una mitad se mantuvo sin enmendar en los años siguientes (dosis, DO2) (SL2, BC2 y LESL2), mientras que la otra mitad recibió la misma enmienda a la misma dosis que en 2002 y 2003 por dos años más (octubre de 2005 y octubre de 2006; dosis, DO4) (SL4, BC4 y LESL4). La Tabla III.3. muestra un resumen de los tratamientos.

En noviembre de 2006 y diciembre de 2007 se tomaron muestras de suelo (0-15 cm y 15-30 cm) en cada subparcela, mientras que los muestreos de plantas se realizaron en las primaveras de 2006, 2007 y 2008. Más detalles de todo el diseño experimental se encuentran recogidos en los trabajos (Madejón et al., 2009a, 2010; Pérez de Mora et al., 2011)

**Tabla III.3.** Resumen de los tratamientos.

Tratamientos			octubre 2002	octubre 2003	octubre 2005	octubre 2006
NA			-	-	-	-
SL	SL2	DO2	x	x	-	-
	SL4	DO4	x	x	x	x
BC	BC2	DO2	y	y	-	-
	BC4	DO4	y	y	y	y
LESL	LESL2	DO2	z	z	-	-
	LESL4	DO4	z	z	z	z

x, 30 Mg ha<sup>-1</sup> de espuma de azucarera (SL); y, 30 Mg ha<sup>-1</sup> de compost de biosólidos(BC); z, 25 Mg ha<sup>-1</sup> de leonardita (LE) más 10 Mg ha<sup>-1</sup> de espuma de azucarera (SL)

#### II.3.1.1. Nuevo muestreo (realizado dentro el trabajo experimental de la presente Tesis)

Durante la primavera de 2011 se llevó a cabo una nueva campaña de muestreo en la parcela experimental de "El Vicario".

##### Muestreo de suelo

Las muestras de suelo fueron recolectadas en marzo de 2011 a dos profundidades (0-15 y 15-30 cm) de 84 puntos (cuatro sitios por cada subparcela). Las cuatro muestras se mezclaron para hacer una muestra compuesta representativa para cada subparcela.

##### Muestreo de plantas

La toma de muestras vegetal se llevó a cabo en junio de 2011 en los mismos puntos en los que se había muestreado el suelo. En cada sitio de muestreo se estimó recubrimiento vegetal antes del muestreo de la planta, usando un cuadrante de 30x30 cm que se colocó tres veces al azar en cada subparcela. Se recogió la parte aérea del *Cynodon dactylon* (L.) Pers, una de las especies más representativas de la vegetación silvestre y que se encontraba en todas las subparcelas.

### III.3.2. Diseño del experimento en condiciones de semicampo

Para llevar a cabo el experimento en condiciones de semi-campo se tomaron cantidades suficientes de suelo procedente de los primeros 30 cm del suelo en los distintos puntos de las zonas de estudio (AZ, V y NC).



**Fotografía III.1.** Vista de los 27 contenedores

En la finca experimental La Hampa de Coria (Sevilla) del IRNAS, se establecieron en condiciones de “semi-campo” contenedores (90 litros de capacidad) con los suelos descritos anteriormente. Se llenaron 9 contenedores con cada suelo contaminado (V y AZ) y otros 9 con un suelo control sin contaminar (NC), en total 27 contenedores (Fotografía III.1). En cada uno de los suelos se establecieron 3 tratamientos: NA (sin adición de enmienda); AC adición de 30 Mg ha<sup>-1</sup> de compost de alperujo, BC adición de 30 Mg ha<sup>-1</sup> de compost de biosólido. Se dispusieron 3 replicados por tratamiento y suelo. La aplicación de las enmiendas se realizó en octubre de 2011. En los contenedores correspondientes al suelo V se realizó una segunda aplicación correspondiente a 25 Mg ha<sup>-1</sup> en marzo 2012 de ambas enmiendas (debido a la naturaleza ácida del suelo). En cada contenedor se plantó un ejemplar de *Paulownia fortunei* (noviembre 2011) procedente de los viveros del grupo de Ciencias Agroforestales de la Universidad de Huelva. Algunas de las plantas sufrieron daños durante el invierno por lo que se tuvo que proceder a una replantación en marzo de 2012. Además para evaluar el efecto de las raíces de estas plantas en la disolución del suelo, se instalaron lateralmente en los contenedores a 20 cm de profundidad en cada



**Fotografía III. 2.** Imagen de los muestreadores de agua de poro (Rhizon samplers).



**Fotografía III.3.** Imagen de los goteros instalados en cada contenedor.

contenedor muestreadores de agua de poro (“Rhizon samplers” Eijkelkamp Agrisearch Equipos, Países Bajos) (Fotografía III.2).

Los contenedores se regaron diariamente durante la fase de crecimiento (de mayo a octubre), mediante riego por goteo con dos emisores de 3 L/h por contenedor (Fotografía III.3). La dosis media de agua durante el periodo del experimento fue 3,3 mm de riego por contenedor y día. Este valor se calculó dependiendo de la demanda de evapotranspiración con el fin de mantener la humedad adecuada.

Durante el periodo de estudio realizaron tres muestreos de suelos: en noviembre de 2011, en junio de 2012 y en mayo de 2013.

A partir de mayo de 2012, mes en el que las plantas empezaron su crecimiento de forma manifiesta, se

empezaron a realizar medidas de las plantas. Durante el periodo de mayor desarrollo (marzo-octubre) se midió mensualmente el crecimiento (altura, diámetro basal del tronco).

En mayo de 2013 se muestrearon las hojas y se realizó el primer corte de la planta (primer ciclo de crecimiento). En octubre de 2013 tras el rebrote se volvió a cortar la planta (segundo ciclo de crecimiento). En ambos muestreos se determinaron las concentraciones de nutrientes y elementos traza, tanto hojas como tronco, y se determinó la biomasa total de cada planta.



#### **III.3.3. Preparación de las muestras de suelo**

Las muestras de suelos se dividieron en dos submuestras, una para los análisis químicos y otra para las determinaciones bioquímicas. Para el análisis químico, las submuestras de suelo se secaron en una estufa con circulación de aire forzado a 40 °C, durante el tiempo necesario para su total secado, se disgregaron, se homogeneizaron, se tamizaron (< 2 mm) y se conservaron en botes de plástico. Para la determinación de los elementos traza pseudo-totales, una submuestra de suelo (< 2 mm) se molió en mortero de ágata hasta un tamaño <60 µm.

Para los análisis bioquímicos y microbiológicos, las submuestras sin secar, se disgregaron y tamizaron (< 2 mm) y se guardaron en cámara fría (4-6 °C) hasta su análisis, que tuvo lugar aproximadamente a las 2 semanas después del muestreo.

#### **III.3.4 Análisis de suelos**

##### *III.3.4.1. Determinación de la textura del suelo original*

La granulometría del suelo se realizó de acuerdo con el procedimiento establecido por Gee y Bauder (1986). Para ello las muestras de suelo (2 mm) se dispersaron empleando hexametáfosfato sódico. Las fracciones de arena gruesa (2-0,2 mm) y fina (0,2 mm-50µm) se determinaron por tamizado en húmedo y posterior pesada. Las fracciones de limo (50-2 µm) y arcilla (<2 µm) se determinaron por las lecturas obtenidas con un hidrómetro de Bouyoucos.

##### *III.3.4.2. Determinación del pH*

Se pesaron 10 g de suelo (< 2 mm) en tubos de centrifuga y se añadieron 25 ml de una disolución de KCl 1 M. Los tubos se agitaron (140 agitaciones min<sup>-1</sup>) en un agitador de vaivén (Selecta Rotabit) durante 30 min a temperatura constante (22 ± 1°C). Seguidamente, se dejaron decantar las muestras y se midió el pH en el sobrenadante mediante un pH-metro (CRISON micro pH con compensación automática de la temperatura).

##### *III.3.4.3. Determinación del C orgánico oxidable (COT)*

Se siguió el método propuesto por Walkley y Black (1934), consistente en la oxidación de 1 g de muestra (< 2 mm) con K<sub>2</sub>CrO<sub>7</sub> 1 N en medio ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado), y posterior valoración del exceso de dicromato con sal de Mohr (disolución 0,5 N de sulfato ferroso-amónico), empleando difenilamina como indicador. El contenido de Corg se expresó en g kg<sup>-1</sup>.

*III.3.4.4. Determinación del C orgánico hidrosoluble (COS)*

La extracción del COS se realizó con agua destilada usando una suspensión 1:10 (suelo(< 2 mm)/disolución) que se agitó (140 agitaciones  $\text{min}^{-1}$ ) durante 1 h a temperatura ambiente ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) en un agitador de vaivén (Selecta Rotabit), se centrifugó 6 min a 10000 rpm (12000 g) y se filtró por filtro Whatman 1 (diámetro de poro < 11  $\mu\text{m}$ ). El COS se determinó en el extracto con un analizador de Carbono TOC-VCSH Shimadzu.

*III.3.4.5. Determinación del N-Kjeldahl*

Se llevó a cabo tratando muestras de 1 g de suelo (< 2 mm) con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado en presencia de catalizador (mezcla de Se y  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) a  $420^\circ\text{C}$ , en bloque digestor TECATOR. Después de la digestión y de la adición de agua destilada (75 ml), las muestras se trataron con NaOH al 40 % y se destilaron en una unidad de destilación Kjeltex System 1002. El destilado se recogió sobre una disolución de ácido bórico al 4 % en matraz Erlenmeyer, y se valoró con una disolución de HCl de normalidad conocida, en presencia de rojo de metilo y verde de bromocresol (Hesse 1971). El contenido de N orgánico total se expresó en  $\text{mg kg}^{-1}$  de N en peso seco.

*III.3.4.5. Determinación del P disponible*

El P disponible se determinó por el método de Olsen et al. (1954), extrayendo el P del suelo (< 2 mm) con una disolución 0,1 N de  $\text{NaHCO}_3$  a pH 8,5 (relación suelo:agua 1:20), en presencia de carbón activo. Después de agitar durante 30 min., las mezclas se filtraron por papel de filtro Whatman 40 (diámetro de poro < 8  $\mu\text{m}$ ), y el P en disolución se determinó por el método del Murphy y Riley (1962) en un autoanalizador (Bran + Luebbe AIII). Los resultados se expresaron en  $\text{mg kg}^{-1}$ .

*III.3.4.6. Determinación del K disponible*

La determinación del K-disponible se realizó según el método de Bower et al. (1952). Para ello el K-disponible se extrajo con una disolución de acetato amónico 1 N (relación suelo/disolución 1:10) a pH 7 durante 45 min con agitación (140 agitaciones  $\text{min}^{-1}$ ) en un agitador de vaivén (Rotabit Selecta). Los extractos se decantaron y filtraron por papel de filtro Whatman 2 (< 8  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro). En el extracto filtrado, se determinó el K-disponible mediante el método del indofenol en un autoanalizador (Bran + Luebbe AIII). La concentración de K-disponible se expresó en  $\text{mg kg}^{-1}$ .

*III.3.4.7. Determinación de elementos traza pseudototales*

En el presente estudio se ha optado por determinar las concentraciones de elementos traza pseudototales en vez de los totales, debido a que este última implica la utilización

de HF para la disolución total de los silicatos componentes del suelo, lo que entraña serios peligros y dificultades de manipulación de las muestras. Sin embargo, la fracción de elementos traza existente en la red cristalina de los silicatos es poco relevante desde

**Tabla III.4.** Valores certificados totales (Total) y solubles en *aqua regia* (*Aqua regia*), y solubles en *aqua regia* obtenidos en el laboratorio del IRNAS (*Aqua regia* IRNAS) y recuperación respecto a los certificados con *aqua regia*. Resultados expresados sobre muestra seca. Muestra de referencia BCR-143R, suelo enmendado con lodo de depuradora.

Elemento	Total	<i>Aqua regia</i>		<i>Aqua regia</i> IRNAS <sup>1</sup>		
	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	Recup. <sup>2</sup> %	mg kg <sup>-1</sup>	Recup. <sup>3</sup> %	Recup. <sup>4</sup>
As	-			11,51	-	
Cd	71,8	72,0	100,3	70,3	97,6	97,9
Co	12,3	(11,8)	95,9	11,2	94,9	91,1
Cr	-	426	-	428	100,5	
Cu	130,6	(128)	98,0	130	101,6	99,5
Mn	904	858	94,5	873	101,7	96,6
Ni	299	296	99,0	283	95,6	94,6
Pb	179,7	174	96,8	169	97,1	94,0
Zn	1055	1063	100,8	1022	96,1	96,9

Los valores entre paréntesis no están certificados

<sup>1</sup>Valor medio de 6 repeticiones

<sup>2</sup>Recuperación respecto al total

<sup>3</sup>Recuperación respecto a valores de *aqua regia* certificados

<sup>4</sup>Recuperación respecto al total

el punto de vista medioambiental por lo que también lo es para la estimación de la movilidad y biodisponibilidad de los elementos traza. Por esta razón, en estudios medioambientales se suelen usar métodos, que si bien no disuelven totalmente las muestras, dan una estimación razonable de las concentraciones de elementos traza susceptibles de movilizarse y hacerse disponible para los microorganismos y plantas (Díaz-Barrientos et al. 1991). Uno de estos métodos es el del *aqua regia* recomendado por la USEPA (1998) e ISO (1995). A este respecto, las Tablas III.4 y III.5 muestran que los porcentajes de elementos traza extraídos con *aqua regia* son mayores del 94,5% en un suelo enmendado con lodo de depuradora y del 63,9% en otro ligero arenoso.

El ataque de las muestras de suelo se llevó a cabo en vasos de teflón, herméticamente cerrados, en horno microondas (MILESTONE ETHOS 900, Milestone



s.r.l., Sorisole, Italia). Para ello se pesaron 0,5 g de muestra (<60  $\mu\text{m}$ ) a la que se añadieron 3 ml de HCl concentrado y 1 ml de  $\text{HNO}_3$  concentrado (agua regia). Tras la digestión y enfriamiento de los extractos, estos se diluyeron con agua deionizada hasta 50 ml. Finalmente, los extractos diluidos se filtraron a través de filtro de Nylon (0,45  $\mu\text{m}$ ) y se conservaron en botes de PVC hasta su análisis. Las concentraciones de los distintos elementos en los extractos se midieron por espectrofotometría de emisión de plasma, ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optic Emission Spectrometry) en un

**Tabla III.5.** Valores certificados totales (Total) y solubles en agua regia (Aqua regia), y solubles en agua regia obtenidos en el laboratorio del IRNAS (Aqua regia IRNAS) y recuperación respecto a los certificados con agua regia. Resultados expresados sobre muestra seca. Muestra de referencia BCR-142R, suelo ligero arenoso.

Elemento	Total	Aqua regia		Aqua regia IRNAS <sup>1</sup>		Recup. <sup>4</sup> %
	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	Recup. <sup>2</sup> %	mg kg <sup>-1</sup>	Recup. <sup>3</sup> %	
As	-	-	-	14,6	-	-
Cd	0,34	0,25	73,5	0,27	108	79,4
Co	12,1	(10,2)	84,3	9,65	94,6	79,8
Cu	69,7	(69,8)	100,1	66,1	94,7	94,8
Mn	970	(800)	82,5	803	100,4	82,8
Ni	64,5	61,1	94,7	52,7	86,3	81,7
Pb	40,2	25,7	63,9	23,7	92,2	60,0
Zn	(101)	93,3	92,4	79	84,7	78,2

Los valores entre paréntesis no están certificados

<sup>1</sup>Valor medio de 6 repeticiones

<sup>2</sup>Recuperación respecto al total

<sup>3</sup>Recuperación respecto a valores de *aqua regia* certificados

<sup>4</sup>Recuperación respecto al total

Colinet et al. (1983a y b).

equipo Varian ICP (Inductively Coupled Plasma-Optic Emission Spectrometry) 720-ES. Las concentraciones de elementos traza se expresaron en mg kg<sup>-1</sup>.

La exactitud y la precisión del método empleado se determinó analizando muestras de materiales de referencia BCR 142 R y 143R. Las Tabla III.4. y III.5. muestran que los resultados obtenidos en los laboratorios del IRNAS son muy similares a los valores certificados con *aqua regia*.

#### *III.3.4.8. Extracción secuencial de los elementos traza*

La extracción secuencial de los elementos traza de los suelos se llevó a cabo por el método BCR descrito por (Rauret et al., 1999). El método consiste en la extracción de los elementos traza de una muestra de suelo (<60µm) en tres etapas sucesivas que da lugar a tres fracciones: 1) primera etapa (fracción F1): extracción con ácido acético 0,11M (pH 2,85); 2) segunda etapa (fracción F2): extracción con cloruro de hidroxilamina 0,5M; 3) tercera etapa (fracción F3): digestión con peróxido de hidrógeno 8,8M y posterior extracción con acetato amónico 1M (pH 2,00). Finalmente la muestra se trata con *aqua regia* para obtener la fracción residual.

Tradicionalmente a este tipo de metodología se le denomina “especiación” porque a cada fracción del elemento extraído se le suele relacionar con una especie química o con su asociación con algún componente específico del suelo. Aunque (Rauret et al., 1999) no relacionan esas fracciones con especies químicas específicas de los elementos traza o con su asociación con los componentes del suelo, se admite que en: F1 incluye fundamentalmente elementos traza solubles, cambiables y asociados a los carbonatos; F2 incluye elementos traza asociados a compuestos reducibles, especialmente óxidos e hidróxidos de Fe; F3 incluye elementos traza asociados a compuestos oxidables, especialmente orgánicos y sulfuro. La fracción residual comprende los elementos trazas existentes en compuestos más recalcitrantes como los minerales de la arcilla, cuya movilidad es mínima (Pérez de Mora et al., 2007).

#### *III.3.4.9. Determinación de los elementos traza extraíbles con CaCl<sub>2</sub> 0,01 M*

Se pesaron 3 g de muestra de suelo (<60µm) en tubos de centrifuga y se añadieron 30 ml de una disolución de CaCl<sub>2</sub> 0,01 M (Houba et al., 1996). Las muestras se agitaron durante tres horas (140 agitaciones min<sup>-1</sup>) en un agitador automático de vaivén (Selecta Rotabit) a temperatura constante (22 ± 1°C). A continuación, las muestras se centrifugaron a 10000 rpm (12000 g) durante 10 min, filtrándose el sobrenadante con papel de filtro Whatman 1 (diámetro de poro <11 µm). El filtrado se recogió y se guardó en botes de PVC hasta su análisis. La determinación de los elementos traza en la disolución se realizó por ICP-OES.

#### *III.3.4.10. Determinaciones de actividades enzimáticas en suelos*

##### *Determinación de la actividad deshidrogenasa*

La actividad deshidrogenasa se determinó según el método de Trevors (1984), basado en la incubación de la muestra de suelo (1 g en húmedo) durante 20 h en oscuridad en presencia de 1 ml de tampón Tris-HCl (pH 7,5) y de una disolución de cloruro 2-p-

iodofenil-3-p-nitrofenol 5 fenil tetrazolio (INT) al 0,4 %. Al final de la incubación, el producto formado (iodonitrofenil formazano (INTF)) se extrajo del suelo con metanol, agitando vigorosamente durante 1 min. Paralelamente, se prepararon controles sin INT. La absorbancia del extracto se leyó espectrofotométricamente a 490 nm frente a disoluciones patrón preparadas con distintas concentraciones de INTF. Los resultados se expresaron en  $\text{mg INTF kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

#### *Determinación de la actividad aryl-sulfatasa*

La actividad aryl-sulfatasa se determinó según la metodología propuesta por Tabatabai y Bremmer (1970). Para ello, se incubó 1 g de muestra (peso húmedo) durante 1 h a 37 °C en tampón acetato 0,5 M (pH 6,5) en presencia de p-nitrofenil sulfato (PNS), en un baño con agitación (Selecta Unitronic Or). Al final de la incubación, se añadió 1 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,5 M y 4 ml de NaOH 0,5 M, y la suspensión resultante se filtró. Al mismo tiempo, se prepararon controles a los que se añadió el PNS después de la incubación. En el extracto filtrado, se determinó espectrofotométricamente a 400 nm la concentración del producto formado p-nitrofenol (PNP). La recta patrón se realizó preparando disoluciones de PNP de concentración conocida. El resultado se expresó en  $\text{mg PNP kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

#### *Determinación de la actividad $\beta$ -glucosidasa*

La determinación de la actividad  $\beta$ -glucosidasa se realizó por el método de Tabatabai (1982), incubando 1 g de suelo (peso húmedo) durante 1 h en tampón MUB (modified universal buffer) (pH = 6) y en presencia de p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (PNG) (0,025 M), en un baño con agitación (Selecta Unitronic Or). Al término de la incubación, se añadieron 1 ml de  $\text{CaCl}_2$  (0,5 M) y 4 ml de tampón Tris (0,1 M pH = 12), y la suspensión se filtró. Los controles se prepararon añadiendo el PNG después de la incubación. En el extracto filtrado, se determinó espectrofotométricamente a 400 nm la concentración del producto formado p-nitrofenol (PNP). La recta patrón se realizó preparando disoluciones de concentración conocida de PNP. El resultado se expresó en  $\text{mg PNP kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

#### *Determinación de la actividad fosfatasa ácida*

La determinación de la actividad fosfatasa ácida se llevó a cabo por el método de Nannipieri et al. (1980). Se incubaron 0,5 g de muestra húmeda a 37°C durante 1,5 h en tampón maleato 0,1 M (pH = 6,5) en presencia de p-nitrofenilfosfato hexahidratado (PNPP) en una baño con agitación (Selecta Unitronic Or). Después de la incubación se

añadieron 0,5 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,5 M, 2 ml de NaOH 0,5 M y 25 ml de agua destilada. La suspensión resultante se filtró. Los blancos se prepararon añadiendo el PNPP después de la incubación. En el extracto filtrado, se determinó espectrofotométricamente a 400 nm la concentración del producto formado p-nitrofenol (PNP). La recta patrón se realizó preparando disoluciones de PNP de concentración conocida. El resultado se expresó en  $\text{mg PNP kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

#### *Determinación de la actividad ureasa*

La determinación de la actividad Ureasa se realizó por el método de Kandeler y Gerber (1988) modificado por Kandeler et al. (1999). Se pesaron 2 g de suelo húmedo en tubos de centrífuga, se añadió 1,5 ml de la disolución de urea de 79,9 mM, y se dejó incubar durante 2 h a 37 °C. Los controles se preparan sustituyendo la disolución de urea por 1,5 ml de agua destilada. El amonio liberado en la incubación se extrajo añadiendo al final de la misma 13,5 ml de una disolución de KCl 2M y agitando durante 30 min. A 1 ml del extracto filtrado se le añadió 9 ml de agua destilada, 5 ml de una disolución de salicilato sódico en hidróxido de sodio y 2 ml de la solución de dicloroisocianurato de sodio; la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min., y finalmente se midió la densidad óptica a 690 nm.

#### **III.3.5. Análisis de aguas<sup>1</sup>**

Tras cada episodio de precipitación, cuando esto fue posible se recogieron muestras de agua de poro (SPW, Soil pore water) con los rizon samplers.

##### *III.3.5.1. Determinación del pH*

El pH se determinó en el mismo bote de PVC en el que se recogieron las muestras, mediante un pH-metro CRISON micro pH 2002 con compensación automática de la temperatura.

##### *III.3.5.2. Determinación de la concentración de nutrientes y elementos traza*

Para la determinación de la concentración de sales y de elementos traza, las muestras de agua se filtraron a través de papel de filtro Whatman 1 (diámetro de poro  $<11 \mu\text{m}$ ) y añadiéndole a los filtrados, recogidos en frascos de vidrio, 0,5 ml de ácido nítrico (30 %) por cada 25 ml. Las concentraciones de los distintos elementos se determinaron por espectrofotometría de emisión de plasma, ICP-OES en un equipo Varian ICP 720-ES).

### III.3.6. Análisis de plantas

#### III.3.6.1. Preparación del material vegetal

El material vegetal se pesó y se llevó inmediatamente al laboratorio, donde se lavó primero con una disolución de ácido clorhídrico al 1 % durante 15 s, y después con agua desionizada durante 10 s, se dejó escurrir, se guardó en sobres de papel cerrados y se dejó secar en estufa a 70 °C durante 48 h. El material seco, se molió en un molino Ika Labortechnik, se tamizó a 500  $\mu\text{m}$  y se guardó en sobres de papel antihumedad.

#### III.3.6.2. Determinación del N-Kjeldahl

Para la determinación del N-Kjeldahl, las muestras molidas y secas de material vegetal se trataron con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado en presencia de catalizador (mezcla de Se y  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) a 380°C durante 2 h. El nitrógeno amoniacal se determinó por el método del indofenol en un autoanalizador Bran + Luebbe AIII. Los resultados se expresaron como  $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$  (%) de  $\text{N-NH}_4^+$  sobre muestra seca.

#### III.3.6.3. Extracción y determinación de nutrientes y elementos traza

El análisis del material vegetal se realizó mediante extracción total por vía húmeda, bajo presión en horno microondas. Se pesaron 0,5 g de muestra molida y seca en vasos de teflón, se añadieron 4 ml de  $\text{HNO}_3$  Suprapur, se agitó suavemente para mojar la muestra por completo, se dejó reposar durante toda la noche, tras lo cual se procedió a la digestión en horno microondas. El extracto obtenido se con agua desionizada hasta 50 ml y se filtró a través de papel de filtro Whatman 2 (diámetro de poro < 8  $\mu\text{m}$ ),

**Tabla III.6.** Valores certificados y obtenidos en el laboratorio del IRNAS ( $\text{mg kg}^{-1} \pm \text{DE}$ ) de la muestra de referencia INCT-TL-1 (hojas de té). Resultados expresados sobre muestra seca.

Elemento	Valor certificado	IRNAS	
		$\text{mg kg}^{-1}$	Recuperación %
As	0,106±0,021	0,131±0,011	124
Cd	0,030±0,004	0,021±0,004	70
Cu	20,4±1,5	20,0±0,45	98
Pb	1,78±0,24	0,87±0,015	48,9
Zn	34,7±2,7	34,7±0,03	100

recogiéndose la disolución en un bote de PVC. La determinación de los macronutrientes y elementos traza en la disolución se realizó mediante ICP-OES en un equipo Varian ICP 720-ES). Las concentraciones de elementos traza se expresaron en  $\text{mg kg}^{-1}$  en base

**Tabla. III.7.** Valores certificados y obtenidos en el laboratorio del IRNAS de la muestra de referencia NCS-DC73348 (elementos traza en ramas y hojas de arbustos), Resultados expresados sobre muestra seca.

Elemento	Valor certificado	IRNAS <sup>1</sup>	
	$\text{mg kg}^{-1}$	$\text{mg kg}^{-1}$	Recuperación %
As	0,95±0,12	0,88±0,11	92,6
Cd	0,14±0,06	0,19± 0,01	135
Cu	5,2±0,5	4,80±0,19	92,3
Mn	58±6	56,6±0,75	97,4
Fe	1020±67	870±43,5	85,3
Pb	7,1±1,1	7,07±0,25	99,6
Zn	20,6±2,2	22,0±1,32	106
Ca (%)	2,22±0,13	2,17 ±0,02	97,7
K (%)	0,85±0,05	0,78±0,02	91,8
Mg (%)	0,29±0,018	0,28±0,002	96,6
P (%)	0,083±0,004	0,083±0,002	100

<sup>1</sup> Valor medio de 5 repeticiones

a materia seca.

La exactitud y la precisión del método empleado se determinó analizando muestras de materiales de referencia INCT-TL-1(muestra de té, Polish Certified Reference Material For Multielement Trace Analysis) y NCS-DC73348 (Elementos traza en ramas y hojas de arbustos) (Tabla III.6). Las Tabla III.6. y III.7. muestran que los resultados obtenidos en los laboratorios del IRNAS son muy similares a los valores certificados.

### III.3.7. Tratamiento estadístico de los datos

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS 23.0 para Windows. Los datos se sometieron al test de normalidad de Shapiro-Wilk. Cuando algunos grupos de datos no pasaron el test de normalidad, se transformaron logarítmicamente y se les volvió a pasar el test de normalidad. La comparación de

medias entre tratamientos se llevó a cabo mediante análisis ANOVA de un factor, realizándose el test de Tukey cuando existió homogeneidad de las varianzas, o el test de Games-Howell en caso contrario. Cuando algún grupo de datos no cumplía los requisitos para la aplicación del ANOVA, se aplicó la estadística no-paramétrica usando los tests de Wilcoxon o de Mann-Whitney, según se compararan datos apareados o no apareados.

Las matrices de correlación entre los diferentes parámetros se basaron en los coeficientes de Pearson con un nivel de significación de  $p < 0,01$  o  $p < 0,05$ , según el caso.

El análisis multivariante de los resultados de los experimentos, se llevó a cabo mediante el análisis de componentes principales (PCA, Principle component analysis), usando el paquete estadístico SPSS 15.0 para Windows, así como mediante las representaciones de rayos de sol (SRP, Sun ray plots) usando Microsoft Excel. El PCA transforma en conjunto de variables originales del sistema en otro, las componentes principales, cada una de las cuales explican una proporción de la varianza del sistema. Generalmente, un número de componentes (2 o 3), menor que el de variables originales suelen explicar un alto porcentaje de la varianza, lo que facilita establecer las diferencias entre los tratamientos. Las SRP permiten comparar gráficamente los valores medios de las variables en los distintos tratamientos (Dilly and Blume, 1998; Moreno et al., 2009; 2011). La forma de la figura y el área integrada de la misma permiten la comparación visual y estadística de los distintos tratamientos. El área integrada de cada figura de cada tratamiento se determinó mediante las herramientas de medida de Adobe® Acrobat® 9 (Adobe Systems Incorporated, CA, USA).





## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## **IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo**



#### IV.1.2. El pH de los suelos

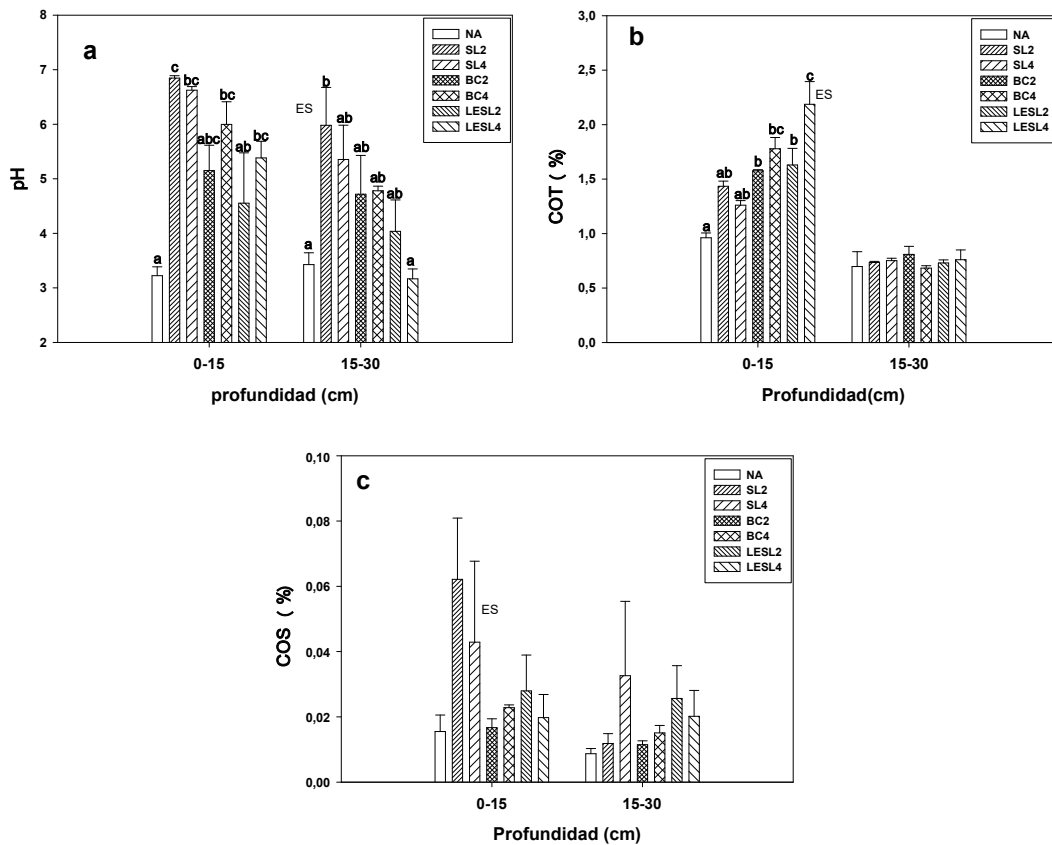
En el muestreo llevado a cabo en 2011, 8 años después de la primera aplicación de enmiendas, los valores medios de pH en la capa superficial (0-15 cm) de los suelos de todas las parcelas enmendadas fueron mayores que los de las parcelas no tratadas (NA), aunque las diferencias no fueron siempre significativas (Figura IV.1a). La tendencia de los valores medios de pH fue la siguiente: SL>BC>LESL>>NA. Con las dosis DO2 (Tabla III.3), los mayores aumentos de pH se observaron en el tratamiento con espuma de azucarera (SL), cuyo valor en tratamiento SL2 fue 3,6 unidades más alto que en el tratamiento NA. Los tratamientos BC2 y LESL2 también aumentaron el pH respecto al NA en 1,9 y 1,3 unidades respectivamente. El aumento de las dosis (DO4, Tabla III.3) produjo una pequeña disminución del pH medio en el SL4 (0,2 unidades), y aumentos de 0,8 unidades en BC4 y LESL4, que en ningún caso fueron significativos ( $p<0,05$ ).

En la capa de 15-30 cm con la dosis DO2 también se observaron aumentos de pH respecto al suelo sin enmendar (NA), aunque menos importantes que en la capa superior, pero siguiendo la misma tendencia. En este caso el aumento en el tratamiento SL2 fue de 2,5 unidades, de 1,3 en BC2 y de 0,6 en LESL2. La aplicación de las segundas dosis (DO4) produjo sólo un pequeño aumento del pH en BC4 (0,08 unidades) y disminuciones en SL4 y LESL4 de 0,69 y 0,9 unidades respectivamente, que no fueron significativas ( $p<0,05$ ).

Estos resultados muestran que la espuma de azucarera (SL) es la enmienda más eficaz para aumentar el pH del suelo debido a su alto contenido en  $\text{CaCO}_3$  (70-80%) que neutraliza la acidez del suelo. Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  presentes en los carbonatos sustituyen a los iones Al existentes en el complejo de cambio de los suelos ácidos y aumentan el pH (Brady y Weil, 2002; Bohn et al., 1979).

Analizando los resultados obtenidos desde el comienzo del experimento (Figura IV.2 a y b) lo primero que se observa es que los valores medios de pH en 2002 (antes del comienzo del experimento) son aparentemente más altos que los de los suelos que no recibieron enmiendas (NA) en 2003, sin embargo las diferencias no fueron significativas ( $p<0,05$ ). Asimismo, se observa que las dos primeras aplicaciones de SL (DO2) fueron suficientes para producir un aumento sustancial del pH del suelo superficial hasta valores próximos a la neutralidad (3,5 unidades entre 2002 y 2007), que se mantuvieron al menos durante 8 años sin ninguna otra aplicación (Figura IV.2a). La aplicación de otras dos dosis de SL, en 2005 y 2006 (DO4), no tuvo un efecto

#### IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo



**Figura IV.1.** Valores medios  $\pm$ ES (n=3) de pH, COT y COS de los suelo a 0-15 y 15-30 cm. En cada profundidad, los valores con distinta letra difieren significativamente (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

significativo sobre el pH. Según Madejón et al. (2009a, 2010) las diferencias entre SL2 y SL4, tanto en 2006, como en 2007 no fueron significativas ( $p < 0,05$ ). El descenso observado en el pH entre 2007 y 2011 no fue significativo en SL2 ( $F=4$ ;  $p=0,139$ ), aunque sí en SL4 ( $F=4,395$ ;  $p=0,006$ ). Los cambios producidos por las aplicaciones de SL en la capa de 15-30 cm fueron similares a los observados en la capa superficial aunque de menor magnitud (1,9 unidades entre 2002 y 2011) (Figura IV.2b). Los aumentos observados entre 2007 y 2011 no fueron significativos (SL2,  $F=0,349$   $p=0,669$ ; SL4,  $F=1,119$   $p=0,736$ ).

Las enmiendas orgánicas tuvieron un comportamiento similar a la de SL, si bien los aumentos de pH observados fueron de menor magnitud (Figura IV.2a). En la capa superficial de los suelos la aplicación de las dos primeras dosis de BC y de LESL (DO2), produjeron aumentos de 2 y 1,6 unidades respectivamente entre 2002 y 2007. La aplicación de otras dos dosis (DO4) de estas enmiendas produjeron un leve aumento del pH respecto a DO2 (Madejón et al., 2009a, 2010). Entre 2007 y 2011 se observaron

descensos de los valores de pH que en ningún caso fueron significativos: BC2,  $F=2,32$   $p=0,235$ ; LESL2,  $F=1,79$   $p=0,186$ ; BC4,  $F=0,700$   $p=0,698$ ; LESL4,  $F=0,066$   $p=0,099$ .

En la capa más profunda la aplicación tanto de BC como de LESL produjo también aumentos del pH aunque de menor magnitud que los observados en la capa superficial (Figura IV.2b). Los valores en 2011 fueron similares o ligeramente más altos que los de 2007, aunque las diferencias no fueron significativas en ninguna de las dosis: BC2,  $F=0,00$   $p=0,515$ ; LE2,  $F=1,780$   $p=0,780$ ; BC4,  $F=1,547$   $p=0,878$ ; LESL4,  $F=0,308$   $p=0,079$ ).

Se sabe que la aplicación de enmiendas orgánicas a suelos ácidos aumenta el pH de los mismos y reduce la concentración de Al cambiante y soluble (Cabrera y Madejón, 2014). Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar el efecto alcalinizante de la materia orgánica: 1) consumo de protones durante la descarboxilación de los ácidos orgánicos que tiene lugar en la descomposición de los residuos vegetales u otros añadidos a los suelos; 2) consumo de protones por grupos funcionales asociados al material orgánico; 3) adsorción específica de moléculas orgánicas sobre superficies minerales mediante intercambio de ligando, liberándose  $\text{OH}^-$  (Mokolobate y Haynes, 2002; Naramabuye y Haynes, 2006).

Cabrera y Madejón (2014) describen otros mecanismos que contribuyen al aumento del pH de los suelos ácidos. Así, la adsorción de materia orgánica sobre las superficies de los aluminosilicatos (minerales de la arcilla), cuyo complejo de intercambio a pH ácido está dominado por Al intercambiable, provoca el recubrimiento de las mismas, impidiendo el intercambio de las especies de Al intercambiable con la disolución del suelo. Al disminuir la concentración de especies de Al en la disolución del suelo, disminuye la hidrólisis de las mismas y por tanto la producción de protones. Por otra parte, la existencia de compuestos orgánicos solubles capaces de complejar especies aluminicas en la disolución del suelo, inhibe la hidrólisis de las misma, decreciendo la producción de protones. El aumento del pH provoca la precipitación de tanto el Al cambiante como el soluble (Hoyt y Turner, 1975; Wong y Swift, 1995; Mokolobate y Haynes, 2002; Naramabuye y Haynes, 2006).

En los suelos contaminados con elementos traza, el aumento del pH que acompaña a la aplicación de enmiendas orgánicas, hace disminuir la movilidad de los elementos traza catiónicos cuya solubilidad decrece al aumentar el pH. Sin embargo, en el caso de elementos traza que forman oxianiones (arseniatos, seleniatos y cromatos), el aumento del pH puede provocar su movilización (Adriano, 2001; Kabata-Pendias y

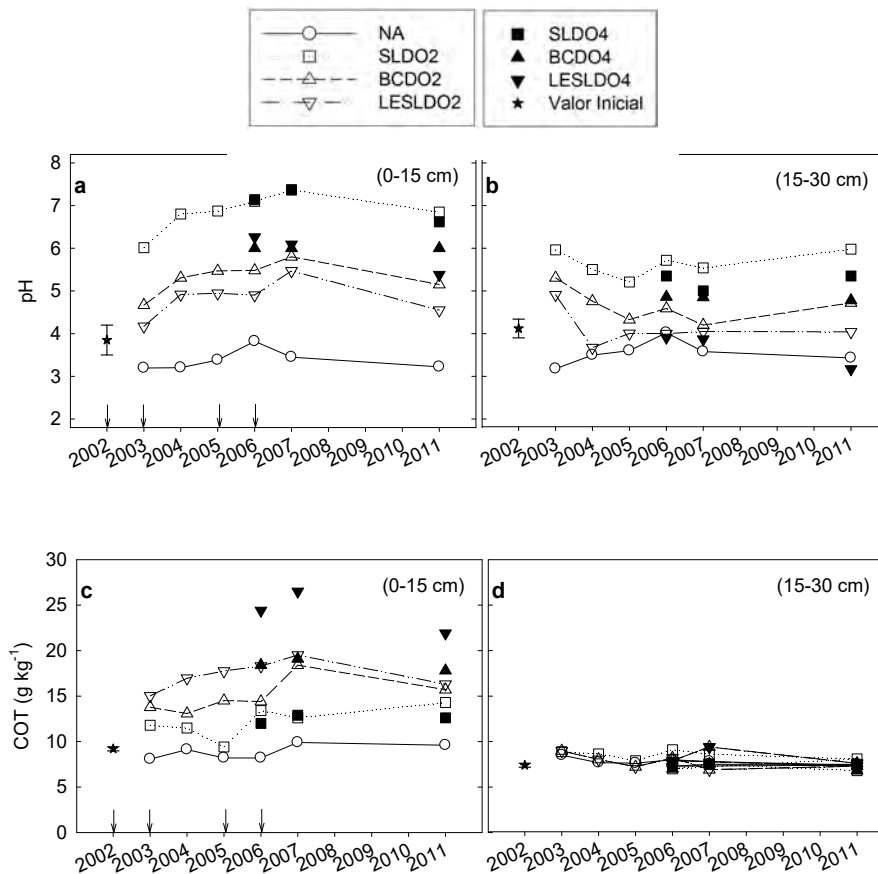
Pendias, 2001). Por otra parte, la aplicación de enmiendas orgánicas disminuye el pH de los suelos calcáreos, lo que se atribuye a la acidez generada en la mineralización de la materia orgánica, que aumenta los niveles de CO<sub>2</sub> en el suelo (Mohammad y Athamneh, 2004), o/y a los ácidos orgánicos que pueden liberar las enmiendas orgánicas como los composts de RSU los de biosólidos (Zinati et al., 2001). El aumento de la acidez del suelo provoca el aumento de la disponibilidad de micronutrientes de los suelos calcáreos no contaminados (Mohammad y Athamneh, 2004).

#### **IV.1.3. Carbono orgánico total (COT) y Carbono orgánico hidrosoluble (COS) de los suelos**

La aplicación de enmiendas aumentó los valores medios de COT en la capa de 0-15 cm de todos los suelos enmendados respecto al tratamiento sin enmiendas, pero no tuvo efecto en la capa más profunda de 15-30 cm (Figura IV.1b). Los aumentos fueron mayores con las enmiendas orgánicas BC y LESL, siendo la tendencia LESL>BC>SL. Con la dosis DO2 los aumentos respecto a NA en BC2 y LESL2 fueron significativos ( $p<0,05$ ) y supusieron valores de COT 1,6 y 1,7 veces mayores que en NA. Posteriores aplicaciones de enmiendas (DO4) supusieron nuevos aumentos, alcanzándose valores de COT 1,8 y 2,3 veces mayores que en NA en los tratamientos BC4 y LESL4 respectivamente. La disminución observada en el tratamiento con espuma de azucarera SL4 no fue significativa ( $p<0,05$ ).

Las Figuras IV.2c y d muestran la evolución de las concentraciones medias de COT desde el comienzo del experimento. En ambas capas de todos los suelos enmendados se observa que COT aumenta respecto al suelos original (2002). Las diferencias entre el COT del suelo original y el tratamiento sin enmienda (NA) en 2003 no fueron significativas. Entre 2003 y 2007 en la capa de 0-15 cm (Figura IV.2c), se observa un aumento de los valores medios de COT: 1,8 g kg<sup>-1</sup> en NA, 0,8 g kg<sup>-1</sup> en SL2, 4,6 g kg<sup>-1</sup> en BC2 y 4,5 g kg<sup>-1</sup> en LESL2, respecto a los valores de 2003 (Madejón et al., 2009a, 2010). Al final del experimento (2011) se observa una disminución de los valores medios de COT en BC2 y LESL2 respecto a 2007, que no son significativos estadísticamente (BC2,  $F=468$   $p=0,58$ ; LESL2,  $F=4,17$   $p=0,93$ ). Es interesante resaltar que los aumentos de COT observados en los tratamientos sin enmiendas orgánicas (NA y SL2) pueden deberse a un efecto indirecto del pH que hace aumentar el desarrollo del recubrimiento vegetal; la posterior descomposición del material vegetal contribuye al aumento de la concentración de COT del suelo.





**Figura IV.2.** Evolución de los valores medios de pH y de COT. La flechas indican la fechas de las aplicaciones de las enmiendas (2002 y 2003, DO2; 2005 y 2006 DO4) Los asteriscos corresponden a los valores medios (48 puntos de muestreos) en 2002 antes del comienzo del experimento.

La aplicación de dos nuevas dosis de enmienda en 2005 y 2006 (DO4) (Figura IV.2c), produjo aumentos de COT en los dos tratamientos con enmiendas orgánicas (BC4 y LESL4). También en estos dos casos de se observó un decaimiento no significativo de COT entre 2007 y 2011 (BC4,  $F=1,76$   $p=0,14$ ; LESL4,  $F=6,69$   $p=0,35$ ).

En la capa de 15-30 cm la aplicación de enmiendas no produjo efectos apreciables en COT (Figura IV.2d).

La aplicación de enmiendas parece que aumentó las concentraciones medias de COS en ambas capas de los suelos enmendados, si bien en ningún caso se observaron diferencias estadísticamente significativas (Figura IV.1c).

Debido a los bajos contenidos de materia orgánica de los suelos de los valles de los ríos Agrío y Guadiamar y a la pérdida de la capa superficial de los mismos, la más

rica en materia orgánica, durante las labores de limpieza y de recuperación se incluyó la aplicación de enmiendas orgánicas. Generalmente, la materia orgánica de las enmiendas presenta una alta estabilidad frente a la degradación microbiana, lo que constituye una clara ventaja para los suelos enmendados y que contribuye a largo plazo a la mejora de la fertilidad de los mismos (Bernal et al., 1998). La concentración de materia orgánica del suelo del presente estudio, al que sólo se le había removido la capa superficial, era en 2002 1,59% (COT 0,92%), cuando empezó el experimento. Por esta razón y por el consabido efecto de las enmiendas orgánicas en la reducción de la disponibilidad de los elementos traza de los suelos (Cabrera y Madejón, 2014), se optó por la aplicación de enmiendas orgánicas. Los resultados obtenidos, como se acaba de describir, mostraron 1) el aumento de la concentración de COT de los suelos enmendados con enmiendas orgánicas, que es función de la naturaleza de las mismas, así como de las dosis aportadas, y 2) la perdurabilidad del efecto de dichas enmiendas.

#### **IV.1.4. Nitrógeno Kjeldhal (N-Kj), Fósforo Olsen (P-Olsen) y Potasio disponible (K-disp) de los suelos**

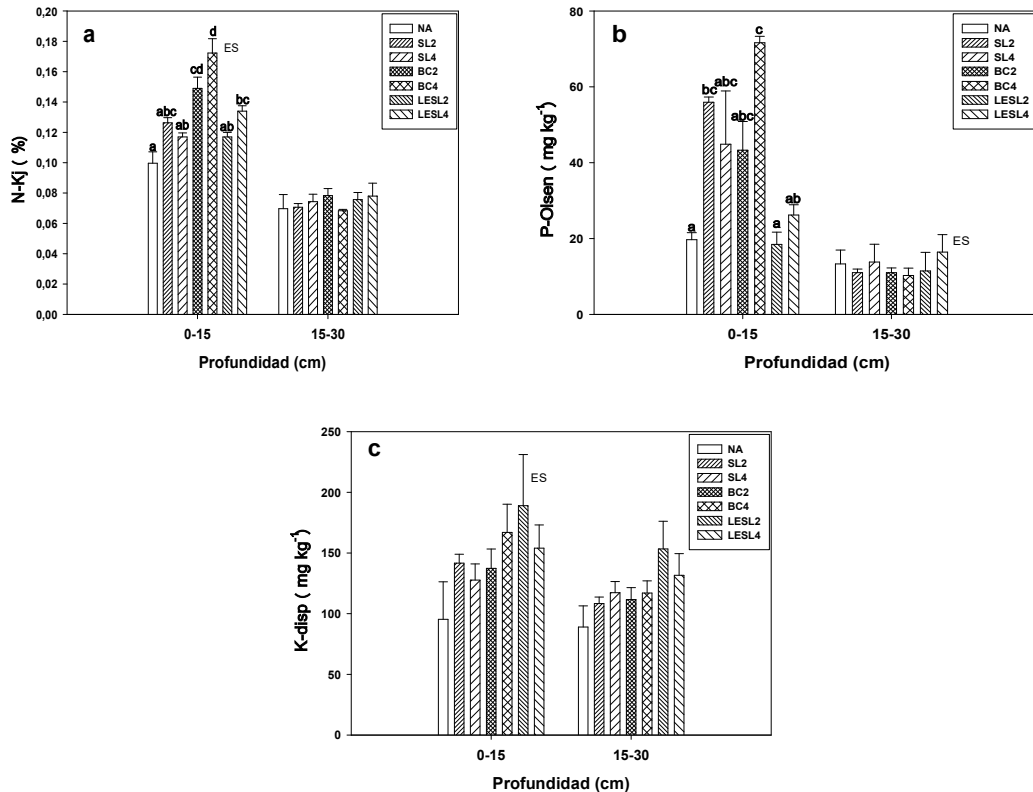
En general, la aplicación de enmiendas aumentó las concentraciones medias de N-Kj, P-Olsen y K-disp de los suelos (Figure IV.3).

En la capa superficial, con la dosis DO2, las concentraciones medias de N-Kj aumentaron en todos los suelos enmendados respecto a NA, 27, 49 y 18 % en SL2, BC2 y LESL2 respectivamente, aunque sólo en el caso de BC2 las diferencias fueron significativas ( $p < 0,05$ ). Posteriores enmiendas (DO4) sólo supusieron nuevos aumentos en BC4 y LESL4, en cuyas parcelas las concentraciones de N-Kj llegaron a aumentar un 72 y 34% respecto a NA, respectivamente (Figura IV.3a).

Las concentraciones de P-Olsen en la capa superficial aumentaron con la dosis DO2 en los tratamientos SL2 y BC2 (2,9 y 2,2 veces respectivamente). Posteriores enmiendas (DO4), sólo tuvieron efectos positivos significativos en el tratamiento BC4 en el que se alcanzó una concentración 3,7 superior a la de NA (Figura IV.3b).

En general la primera aplicación de enmiendas (DO2) hizo aumentar la concentración de K-disp en la capa superficial de los suelos, aunque las diferencias con el tratamiento NA no fueron significativas en ningún caso, a pesar de que en LESL2 dicha concentración se duplicó. Las subsiguientes aplicaciones de enmiendas (DO4) siguieron aumentando la disponibilidad del K en SL4 y BC4, pero como en los casos anteriores dichos aumentos no tuvieron significación estadística (Figura IV.3c). Los

#### IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo



**Figura IV.3.** Valores medios  $\pm$ ES (n=3) de K-Kj, P-Olsen y K-disp de los suelo a 0-15 y 15-30 cm. En cada profundidad, los valores con distinta letra difieren significativamente (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

aumentos de observados de N-Kj, P-Olsen y K-disp en la capa subsuperficial no fueron estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

Nitrógeno, P y K son nutrientes esenciales para el crecimiento de las plantas, cuyo déficit en muchos suelos de los ecosistemas mediterráneos constituye un factor limitante de su fertilidad (Mayor y Roda, 1994; Hanley y Fenne, 2001; Sardans et al., 2004). Las enmiendas actúan como una fuente de liberación lenta de nutrientes debido a sus bajas tasas de mineralización, que favorecen el aumento de la fertilidad de los suelos (Alburquerque et al., 2011).

Las aplicaciones de enmiendas a los suelos implican por tanto la adición a los mismos de cantidades de N, P y K dependientes sus concentraciones en las enmiendas y de las cantidades aportadas. El aumento de la concentración total de dichos nutrientes en el suelo depende de la extracción por parte de las plantas y de pérdidas por lixiviación, escorrentía, desnitrificación, etc. El aumento de la disponibilidad de los nutrientes aportados por las enmiendas depende de la forma en que se encuentren en ellas y de las

propiedades del suelo (p. ej.: pH, contenido en materia orgánica, mineralogía, etc.). Por todas estas razones no es fácil hacer un balance de materia en estos experimentos.

En el presente estudio es difícil relacionar los aumentos de N, P y K observados experimentalmente (Figura IV.3) con los teóricos calculados a partir de las cantidades de nutrientes aportadas (Tabla IV.1), entre otras razones porque los datos experimentales de P y K son concentraciones de disponibles, pero la comparación de darían una idea de la eficacia fertilizante de las enmiendas empleadas

En el caso del N se observa que con los tratamientos orgánicos (BC y LESL) se

**Tabla IV.1.** Cantidades de N, P y K aportadas por las enmiendas (Aport.)<sup>1</sup> y aumentos teóricos esperables ( $\Delta$ )<sup>2</sup> en el suelo.

Enmienda	Tratamiento	N		P		K	
		Aport. kg ha <sup>-1</sup>	$\Delta$ mg kg <sup>-1</sup>	Aport. kg ha <sup>-1</sup>	$\Delta$ mg kg <sup>-1</sup>	Aport. kg ha <sup>-1</sup>	$\Delta$ mg kg <sup>-1</sup>
SL	DO2	323	162	168	84	175	87,5
BC	DO2	569	285	540	270	404	202
LESL	DO2	586	293	91	45,5	1566	783
SL	DO4	643	324	336	168	350	175
BC	DO4	1138	570	1080	540	808	404
LESL	DO4	1172	586	182	91	3132	1566

<sup>1</sup>Las cantidades aportadas se calcularon con los datos de humedad y concentraciones de la Tabla III.2.

<sup>2</sup>Los aumentos teóricos esperables se estimaron considerando que la capa de suelo de 15cm de 1 hectárea de un suelos franco (densidad aparente  $\approx 1,4 \text{ g cm}^{-3}$ ) pesa aproximadamente  $2 \times 10^6 \text{ kg}$ .

aporta prácticamente la misma cantidad de este nutriente, que es casi dos veces más que con el inorgánico (SL). Sin embargo, los resultados experimentales reflejan sólo que con los tratamientos BC y LESL los suelos muestran mayor concentración de N que en NA, pero que no se comportan de la misma manera. Las diferencias observadas están relacionadas con la naturaleza del N aportado en cada caso, que tendría un distinto comportamiento en el suelo.

En el caso del P y K la comparación es aún más difícil porque como se ha dicho anteriormente, en la Tabla IV.1 se muestran valores totales aportados, mientras que las Figuras IV.3b y 3c muestran valores de P y K disponibles. Dicha tabla muestra que el tratamiento LESL es el que menos P aporta y con el que se obtienen los valores más bajos de P-Olsen. Sin embargo, a pesar de que el tratamiento SL aporta tres veces menos P que el BC, las dos primeras adiciones de SL (DO2) produjeron mayores valores de P-Olsen, lo que muy probablemente se deba al aumento del pH producido

por SL, un material con un alto poder “encalante” (liming potential) por su alta proporción de  $\text{CaCO}_3$  (Figura IV.1a). No es hasta después de las siguientes aplicaciones (DO4) cuando el P disponible tiene valores más altos en el tratamiento BC. A este último respecto, algunos autores han encontrado que los niveles de P disponible dependen más de las aplicaciones acumulativas que de la naturaleza del P aportado (Eghball & Power, 1999; Cooperband et al., 2002; Madejón et al., 2003a; Paredes et al., 2005; López-Piñeiro et al., 2008).

Al igual que para el P-Olsen, el K disponible aumenta con las enmiendas, aunque no está directamente relacionado con las cantidades totales aportadas. Por ejemplo, con la aplicación de las dos primeras dosis (DO2) los valores más altos se observaron en el tratamiento LESL que es el que más K aporta, en cambio con los tratamientos SL y BC se obtuvieron resultados similares a pesar de que con BC se aportó más de dos veces más K que con SL. Este hecho también podría explicarse, como en el caso del P, por el aumento de pH que produjo la aplicación de SL.

#### **IV.1.5. Concentraciones de elementos traza de los suelos**

##### *IV.1.5.1. Elementos traza pseudototales*

No se encontraron diferenciadas significativas entre tratamiento, ni entre dosis en las concentraciones pseudototales de As, Cd, Cu, Pb y Zn (Tabla IV.2). En cada profundidad, las concentraciones fueron similares en todos los tratamientos, independientemente del tipo de enmienda y de las dosis empleadas. Esto concuerda con lo esperado ya que los elementos trazas no se degradan y que las concentraciones de elementos traza que podrían ser movilizadas por las enmiendas son muy pequeñas respecto al total en el suelo. Por otra parte, en un estudio previo Madejón et al. (2010) demostraron que considerando las concentraciones de elementos traza en las enmiendas (Tabla III.2), las dosis de las mismas no fueron suficientemente altas para aumentar la concentración de elementos traza del suelo.

El grado de contaminación por elementos traza se evaluó usando el Índice de Carga Contaminante (Pollution Load Index, PLI) de Tomlinson et al. (1980). Este índice está basado en los valores de los factores de concentración (FC), que es cociente entre la concentración de un elemento traza en el suelo ( $C_{\text{elemento traza}}$ ) y el valor de fondo del mismo elemento ( $C_{\text{valor de fondo}}$ ). Como valores de fondo se han utilizado las concentraciones medias de los suelos de la zona no afectada por el vertido (Cabrera et

**Tabla IV.2.** Resultado del ANOVA de las concentraciones de elementos traza pseudototales en los suelos de los distintos tratamientos ( $n=3$ ). Valores medios y error standard ( $\text{mg kg}^{-1} \pm \text{ES}$ ).

Tratamiento	Capa superficial (0-15cm)					
	As	Cd	Cu	Pb	Zn	PLI
N	250±50	1,2±0,20	180±10	600±140	360±48	
SL2	180±49	2,1±0,36	165±7,7	350±91	550±73	
SL4	170±61	2,3±0,72	180±22	400±110	600±124	
BC2	200±42	1,7±0,33	180±22	430±52	460±72	
BC4	200±17	2,3±0,59	190±21	410±46	600±150	
LESL2	180±54	1,5±0,29	180±22	500±160	380±68	
LESL4	230±28	1,4±0,23	169±8,6	600±93	400±58	
Media total	201±72	1.78±0,75	177±27	451±178	478±167	7,06
$p$	0,810	0,427	0,968	0,587	0,282	
$gl=20$	<i>dns</i>	<i>dns</i>	<i>dns</i>	<i>dns</i>	<i>dns</i>	
Valor de fondo *	18,3	0,33	30,9	38,2	109	1

Tratamiento	Capa subsuperficial (15-30cm)					
	As	Cd	Cu	Pb	Zn	
N	110±39	1,1±0,23	120±28	260±85	330±36	
SL2	50±14	0,6±0,16	100±24	130±29	260±19	
SL4	50±14	0,5±0,17	100±17	120±23	220±24	
BC2	73±3,4	1,2±0,28	130±29	165±7,5	380±75	
BC4	42±6,8	1,1±0,09	100±13	120±11	330±34	
LESL2	49±9,3	1,0±0,07	140±28	130±14	310±26	
LESL4	120±52	0,6±0,13	120±28	290±99	250±27	
Media total	71±49	0.87±0,36	116±39	173±101	297±78	3,43
$p$	0,230	0,079	0,836	0,147	0,111	
$gl=20$	<i>dns</i>	<i>dns</i>	<i>dns</i>	<i>dns</i>	<i>dns</i>	

$p$ , probabilidad;  $gl$ , grados de libertad; *dns*, diferencias no significativas

\*El valor de fondo de cada elemento fue prácticamente constante a través del perfil del suelo (Cabrera et al. 1999).

al., 1999). Para cada muestra de suelo, el PLI se determina calculando la raíz enésima ( $n$ , depende del número de elementos considerados) del producto de los  $n$  FC de los elementos considerados:  $PLI = \sqrt[n]{(FC_1 \times FC_2 \times \dots \times FC_n)}$ .

Este índice proporciona un medio sencillo, para evaluar y comparar el nivel de contaminación por elementos traza de los suelos. Valores  $PLI = 1$ , indican que el suelos tiene concentraciones de elementos traza iguales a los valores de fondo. Cuando los valores de PLI se alejan de la unidad indican que hay contaminación, que es mayor cuanto más alto es el valor de PLI. Los valores de PLI obtenidos para este suelo indican una severa contaminación por As, Cd, Cu, Pb y Zn, mayor en la capa superficial que en la subsuperficial (Tabla IV.2).

*IV.1.5.2. Especiación de los elementos traza*

A pesar de que los resultados de los métodos de extracción secuencial o fraccionamiento, están afectados por una serie de problemas inherentes a los mismos (vr. g.: inespecificidad de los extractantes (falta de selectividad), reabsorción por otras fases y precipitación de los elementos liberados), estos métodos se usan frecuentemente para estimar la distribución de los elementos traza entre los distintos componentes del suelo, aunque de una manera imprecisa, como manifiesta Adriano (2001). Asimismo, el mismo autor considera que son una herramienta útil para comprender la dinámica de los elementos traza (sus cambios de una fase a otra) durante y después de la recuperación de los suelos contaminados.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, los resultados de la extracción secuencial mostraron que en el suelo en estudio cada elemento traza tiene una distribución específica (Figura IV.4). Examinado la distribución de los elementos estudiados en los suelos no tratados se observa que el Cd se encuentra fundamentalmente en las formas más solubles (F1 72%) y asociada a óxidos e hidróxidos de Fe (F2 27%). El Pb, en cambio, se encuentra en un 92,6% en la fracción residual. El Cu y Zn se encuentran distribuidos entre todas las fracciones, siendo la principal en ambos casos la residual (Cu 38,5%, 36,8%), aunque no la más importante desde el punto de vista medioambiental, que en el Cu es F2 (29,7%) y en el Zn es la F1 (24,6%), que son las fracciones en las que estos elementos se encuentran en formas más disponibles.

El efecto de la aplicación de las enmiendas en la distribución de estos elementos en las distintas fracciones consideradas es difícil de explicar por este método, debido a los problemas comentados anteriormente. Por otra parte, las pequeñas variaciones que entrañan el efecto de las enmiendas sobre la concentración pseudototal de los elementos en cada fracción, hacen que las determinaciones estén afectadas por altos errores analíticos. El ejemplo más problemático es Cd que en el suelo en estudio tiene una concentración pseudototal de  $1,24 \text{ mg kg}^{-1}$  en NA, valor cercano al límite de detección del método analítico empleado. De cualquier forma, los resultados obtenidos parecen indicar que en general la aplicación de enmiendas hace disminuir la concentración de los elementos estudiados en la fracción F1, constituida por las formas más lábiles, más

IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo

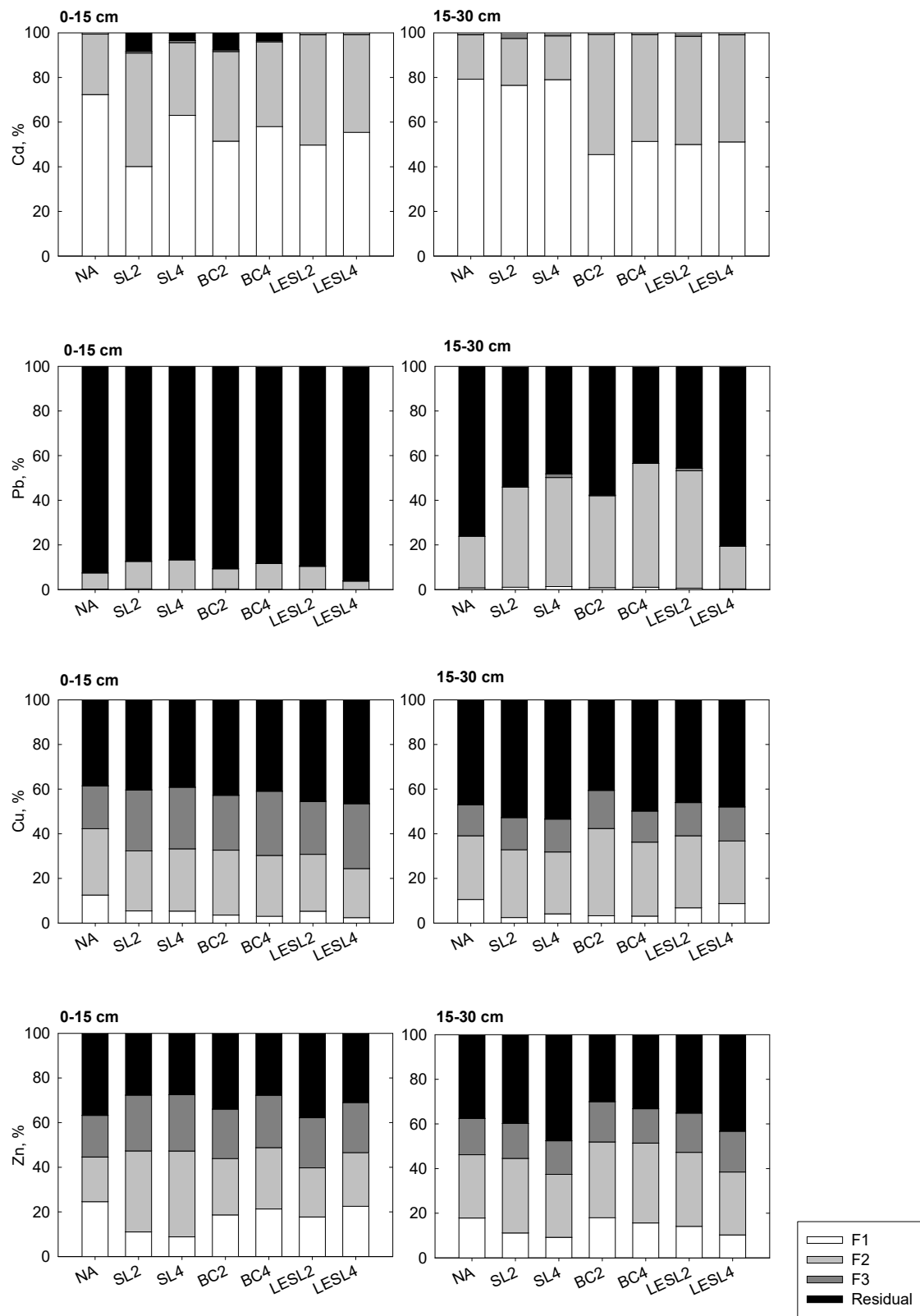


Figura IV.4. Resultado del fraccionamiento de Cd, Cu, Pb y Zn en los suelos de los distintos tratamientos.



móviles y disponibles, de dichos elementos. Sin embargo, el ANOVA indicó que las diferencias encontradas sólo eran significativas en el caso del Cu en la capa superficial.

En la fracción F2 las concentraciones de Cd y Zn en ambas capas de suelo aumentaron en general con la aplicación de enmiendas, si bien el ANOVA no mostró diferencias significativas. Los valores de Pb en esta fracción estuvieron por debajo del límite de detección del método, y los de Cu mostraron pequeñas disminuciones en superficie y leves aumentos en profundidad. Es interesante tener en cuenta que el aumento de las concentraciones en esta fracción trae consigo la disminución de la movilidad y de la disponibilidad de los elemento traza.

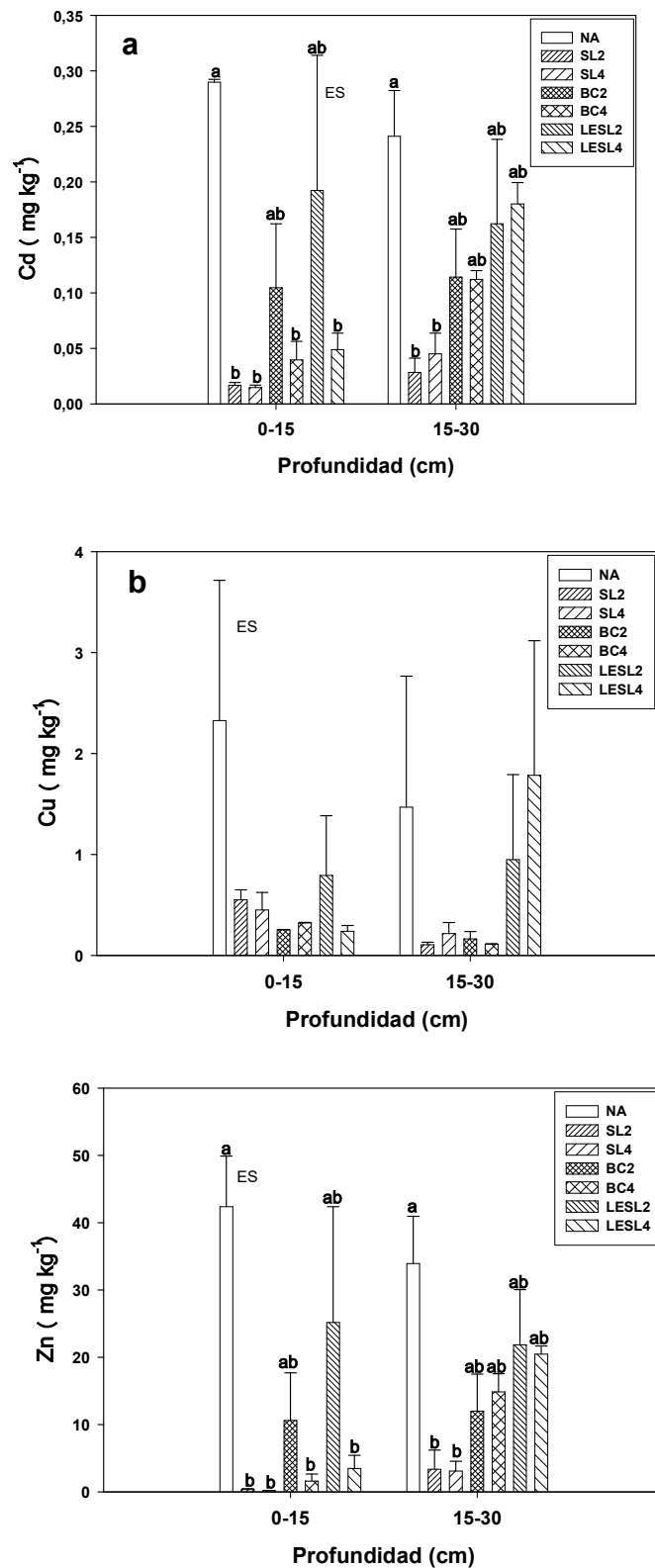
Las concentraciones de Cd y Pb en la F3 estuvieron en ambos casos por debajo de los límites de detección del método analítico. Sin embargo, las de Cu y Zn en la capa superficial experimentaron aumentos que para el Zn fueron significativos. En la capa subsuperficial no se observaron variaciones dignas de mención. También en este caso los aumentos de las concentraciones en esta fracción suponen una disminución de la movilidad y de la disponibilidad.

Respecto a las concentraciones en la fracción residual, lo esperable de la aplicación de enmienda sería la disminución de dicha fracción, que es lo que se ha encontrado en el Pb, en el que la disminución de esta fracción va en beneficio del aumento de la F2 encontrado fundamentalmente en la capa subsuperficial del suelo. Las concentraciones de Cd en fracción residual fueron muy pequeñas, en muchos casos por debajo del límite de detección del método. En el Cu la proporción en la fracción residual osciló entre el 60-70% en la capa superficial y el 40-50% en la subsuperficial de los suelos. En el Zn las proporciones fueron algo menores, 28-30% y 30-47% a 0-15 y 15-30 cm respectivamente. Solamente en la capa subsuperficial el ANOVA detectó que los valores medios de este elemento eran significativamente más bajos en los suelos enmendados que en el control sin tratar, pero su origen no se ha podido relacionar con aumentos de en las otras fracciones.

#### *IV.1.5.3. Elementos traza extraíbles en $\text{CaCl}_2$ 0,01 M.*

La extracción con  $\text{CaCl}_2$  0,01M es un método que se utiliza para estimar la concentración de elementos traza disponibles en los suelos (Kabata-Pendias, 2004). La disolución de  $\text{CaCl}_2$ , por una parte disuelve todo el material soluble existente en el suelo, y por otra los iones  $\text{Ca}^{+2}$  en el extracto reemplazan, por un proceso de intercambio iónico, a los cationes existentes en el complejo de cambio, los cuales pasan

IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo



**Figura IV.5.** Valores medios  $\pm$ ES ( $n=3$ ) de Cd, Cu y Zn solubles en  $\text{CaCl}_2$  0,01M de los suelo a 0-15 y 15-30 cm. En cada profundidad, los valores con distinta letra difieren significativamente (Test de Tukey,  $p<0,05$ ).

al extracto. La concentración de elementos traza en el extracto resultante tiende a reflejar el reservorio de estos elementos fácilmente solubles, por lo que puede considerarse una estimación su disponibilidad en el suelo (Adriano 2001; Kabata-Pendias, 2004; Meers et al., 2006).

La Figura IV.5 muestra que en ambas capas de los suelos, las concentraciones de Cd, Cu y Zn extraíbles en  $\text{CaCl}_2$  0,01M fueron siempre menores en los suelos enmendados que en los no enmendados (NA). En todos los tratamientos las concentraciones de As y Pb extractable  $\text{CaCl}_2$  0,01M fueron menores que los límites de detección del método empleado ( $0,01 \text{ mg l}^{-1}$ ;  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

La espuma de azucarera (SL) fue la enmienda más eficiente en la disminución del Cd y Zn extraíbles, con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre NA y SL en ambas profundidades. La eficiencia en la disminución de las concentraciones de Cd y Zn fue:  $\text{SL} > \text{BC} > \text{LESL}$ . En el caso del Cu, aunque no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, aparentemente la enmienda más eficaz en la disminución de Cu extractable fue el compost de biosólidos (BC) y la tendencia fue:  $\text{BC} > \text{SL} > \text{LESL}$ .

En los tratamientos BC y LESL la repetición de la aplicación de enmiendas (DO4) redujo la concentración de Cd y Zn soluble en la capa superficial aunque no significativamente. En el caso del Cu, la repetición de la adicción de enmiendas dio lugar a disminuciones no significativas en los tratamientos SL y LESL. Respecto a los tratamientos con SL, en ningún caso se encontraron diferencias entre las dosis DO2 y DO4, indicando que las segundas aplicaciones de estas enmiendas no continúan reduciendo las concentraciones de Cd, Cu y Zn solubles conseguidas con DO2.

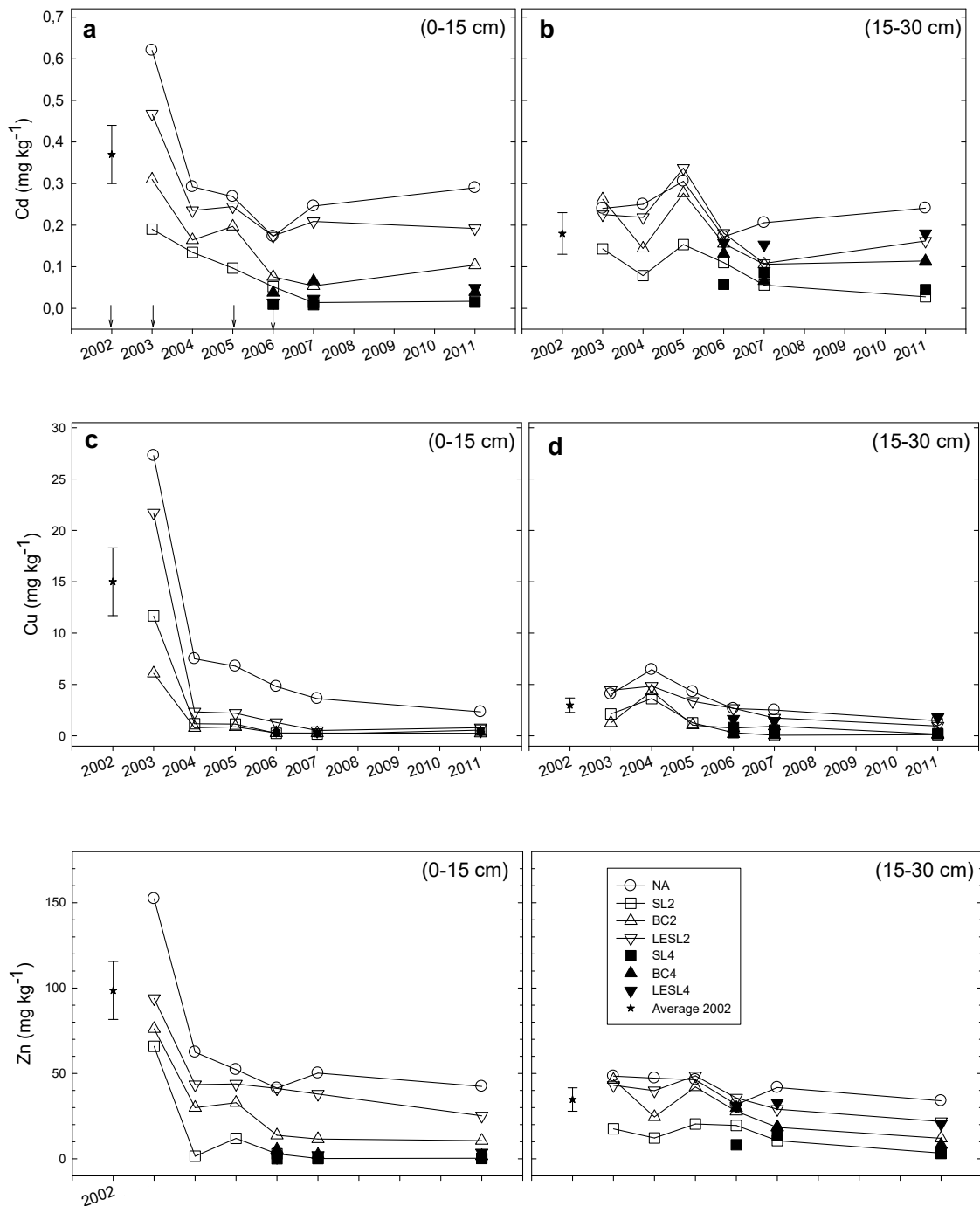
En la capa subsuperficial, en ningún caso la dosis DO4 dio lugar a diferencias significativas respecto a la DO2.

En general, la disminución de disponibilidad está relacionada con el aumento del pH como puede observarse en la Figura IV.1. La espuma de azucarera (SL) tiene un alto poder “enclante” y los materiales orgánicos también poseen cierto poder “enclante” como se ha puesto de manifiesto previamente (IV.1.2 y IV.1.4). Sin embargo, la propia materia orgánica añadida con las enmiendas, también juegan un papel directo muy importante en la reducción de la disponibilidad de los elementos traza mediante 1) la adsorción/absorción, quelatación y secuestro por la fase soluble de la misma; 2) la estabilización por la fase sólida y las sustancia coloidales por adsorción/absorción y quelatación; 3) formación de complejos ternarios “mineral-materia orgánica-elemento traza” (Cabrera y Madejón, 2014).

Un problema de la utilización de enmiendas para reducción de la disponibilidad de los elementos traza en los suelos es la durabilidad. Según exponen Cabrera y Madejón (2014), los componentes inorgánicos y orgánicos de las enmiendas participan en la estabilización de los elementos traza mediante una serie de reacciones químicas y bioquímicas que son reversibles, dependientes de las condiciones del medio (temperatura, humedad, pH, materia orgánica, etc.) (Adriano et al., 2004; Madejón., 2004; Impellitteri y Allen, 2006). Así por ejemplo, la materia orgánica que participa en las reacciones de estabilización, está muy expuesta a la mineralización (sobre todo sus componentes menos estables), lo que trae consigo la liberación de los elementos traza que previamente había estabilizado, con el consiguiente riesgo para la contaminación de suelos, aguas y biota (Brown, 1997). Este es el denominado efecto “bomba de relojería” (Adriano et al., 2004). Esta razón es más que suficiente para que sea necesaria la evaluación a medio y largo plazo, de la eficiencia de la recuperación con enmiendas orgánicas (Kumpiene, 2010).

En el presente estudio, aprovechando que existen datos desde 2002, se ha podido analizar la evolución de la disponibilidad del Cd, Cu y Zn durante ocho años (Figura IV.6). En general, se observa que los cambios temporales de las concentraciones de Cd, Cu y Zn extraíbles con  $\text{CaCl}_2$  en la capa 0-15 cm del suelo para la dosis DO2, siguen una tendencia muy similar: 1) la primera aplicación de enmienda (en 2002), dio lugar a una importante disminución de las concentraciones respecto a NA (valores medidos en 2003); 2) la segunda aplicación (en 2003), produjo de nuevo una importante disminución de las concentraciones (valores medidos en 2004) (Madejón et al., 2009a). Después, en todos los tratamientos las concentraciones continuaron decreciendo pero más lentamente hasta 2011. La eficacia en la disminución es distinta para cada tratamiento y para cada elemento: para Cd y Zn es  $\text{NA} < \text{LESL} < \text{BC} < \text{SL}$ , mientras que para el Cu es  $\text{NA} < \text{LESL} < \text{SL} < \text{BC}$ ; la mayor eficacia de BC en el Cu puede deberse a la mayor capacidad de este elemento de formar complejos y quelatos con las sustancias húmicas (Impellittere y Allen, 2006). Un hecho muy interesante a destacar es que en el tratamiento sin enmienda (NA) también se observa una disminución de la disponibilidad a lo largo de todo el experimento, lo que es un signo de recuperación natural, debido a la reacción de los elementos traza con los componentes del suelo, que aumenta con el tiempo. Otra causa que favorece la disminución de la disponibilidad es el aumento del

contenido materia orgánica, debido a la descomposición de las partes aéreas y raíces de las plantas. Este es un efecto similar al encontrado por Pérez de Mora et al. (2006b)



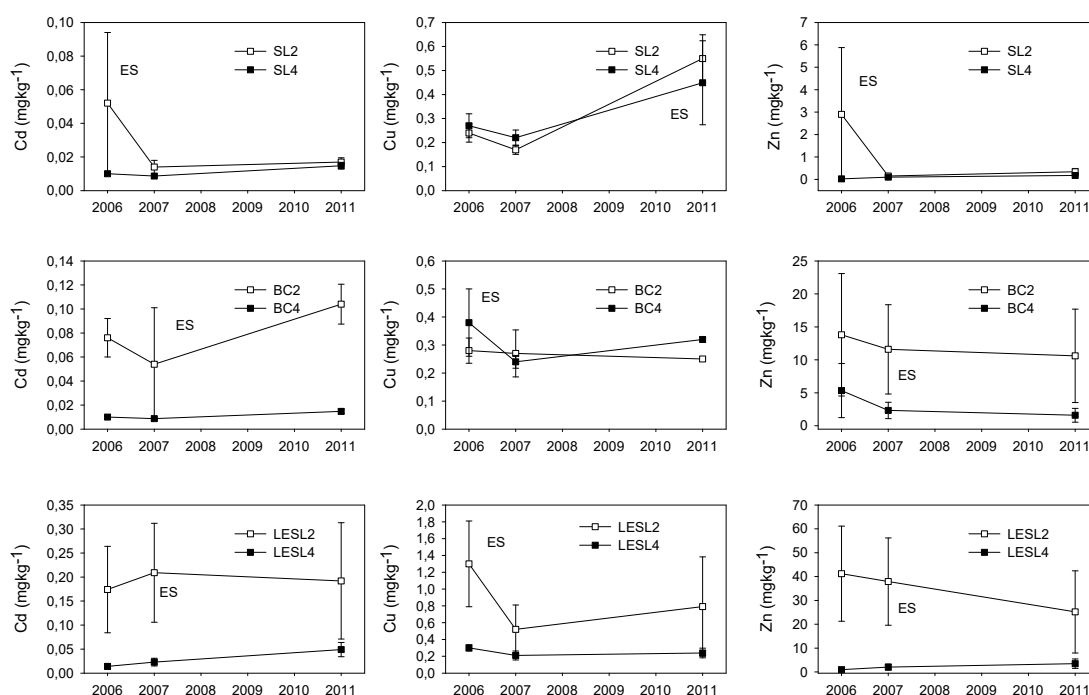
**Figura IV.6.** Evolución de los valores medios de Cd, Cu y Zn extraíbles con  $\text{CaCl}_2$  0,01M. La flechas indican las aplicaciones de enmiendas (2002 y 2003, DO2; 2005 y 2006, DO4). Los asteriscos corresponden a los valores medios (48 puntos de muestreos) en 2002, antes del comienzo del experimento. Las barras representan el error standard de la media.

#### IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo

en un suelo contaminado con elementos traza, en el que al enmendarlo con hojarasca de bosque producía en el suelo aumento de la materia orgánica y del pH y disminución de los elementos traza disponibles.

En la capa de 15-30 cm los cambios temporales fueron menos importantes que en la capa superior (Figura IV.6). Destaca el hecho de que la espuma de azucarera (SL) fue la única enmienda que redujo significativamente las concentraciones de Cd y Zn en los extractos de  $\text{CaCl}_2$ . La disminución de las concentraciones de los tres elementos en 2004, después de la segunda aplicación de enmiendas (la llevada a cabo en 2003), fue mucho menor que en la capa superior, observándose los mayores decrecimientos para todos los elementos en los tratamientos con SL (Madejón et al., 2009a, 2010). Posteriormente en todos los tratamientos se observó un suave descenso hasta 2011.

En la capa superficial de los suelos las aplicaciones de la segunda y tercera dosis (DO4, 2005 y 2006) supusieron importantes disminuciones de las concentraciones de Cd y Zn respecto a las dos anteriores aplicaciones (DO2) en el tratamiento SL en 2006, y durante todo el período en el tratamiento BC (Figura IV.7).



**Figura IV.7.** Evolución de los valores medios de Cd, Cu y Zn extractables en  $\text{CaCl}_2$  0,01M durante 2006 y 2011. Las barras representan el error standard de la media (ES).

En el tratamiento LESL las diferencias entre 2 y 4 aplicaciones (DO2 y DO4) fueron mucho más apreciables. Cabe sin embargo destacar que las diferencias observadas entre los resultados de DO2 y DO4 fueron generalmente no significativas. El resultado final, ya mostrado en la Figura IV.5, es que en 2011 no se encontraron diferencias significativas entre las dosis, lo que no hubiera sido necesaria la tercera y cuarta aplicación de enmiendas. En la capa subsuperficial las diferencias fueron aun menores.

##### **IV.1.6. Actividades enzimáticas de los suelos**

Los microorganismos son vitales para la “calidad del suelo”, ya que tienen un papel destacado en la fertilidad y producción primaria del mismo, por sus funciones relacionadas con la descomposición de la materia orgánica y el ciclo de nutrientes (Alexander, 1977). Asimismo, los microorganismos pueden verse afectados por cambios en las propiedades físico-químicas (pH, potencial redox, materia orgánica, textura, estructura etc.), biológicas (poblaciones, interacciones entre organismos) y/o por la presencia de contaminantes (metales pesados, metaloides, xenobióticos). El establecimiento de una cubierta vegetal y su sistema radical también contribuye al aumento de la biomasa microbiana. Las raíces constituyen no sólo un refugio para los microorganismos, sino también una fuente de C lábil, mediante la liberación de compuestos orgánicos en los exudados radiculares (Martin y Merckx, 1992).

Debido a su importancia en la funcionalidad del suelo, las actividades enzimáticas se han considerado como indicadores útiles para evaluar tanto la mejora, como la degradación del mismo (Pankhurst et al., 1995; Dick et al., 1996). Las enzimas del suelo son críticas en el mantenimiento de la concentración de nutrientes y se utilizan con frecuencia en los estudios sobre la influencia de enmiendas sobre la fertilidad del suelo (Chen et al., 2003). Las actividades enzimáticas pueden ofrecer gran información sobre el estado de los microorganismos del suelo y sus propiedades físico-químicas (pH, contenido de nutrientes, cantidad y composición de la materia orgánica, etc.) (Baum et al., 2003). Además, según Giller et al. (1998), las actividades enzimáticas pueden servir como estimadores de las alteraciones tanto naturales, como antropogénicas que tienen lugar en los suelos. Por ello se han utilizado como “bioindicadores” de la calidad de los mismos en programas de monitorización medioambiental (Nielsen y Winding 2002), para evaluar prácticas de forestación (García et al., 2000) y/o la recuperación de escombreras (Bonmatí et al., 2000).

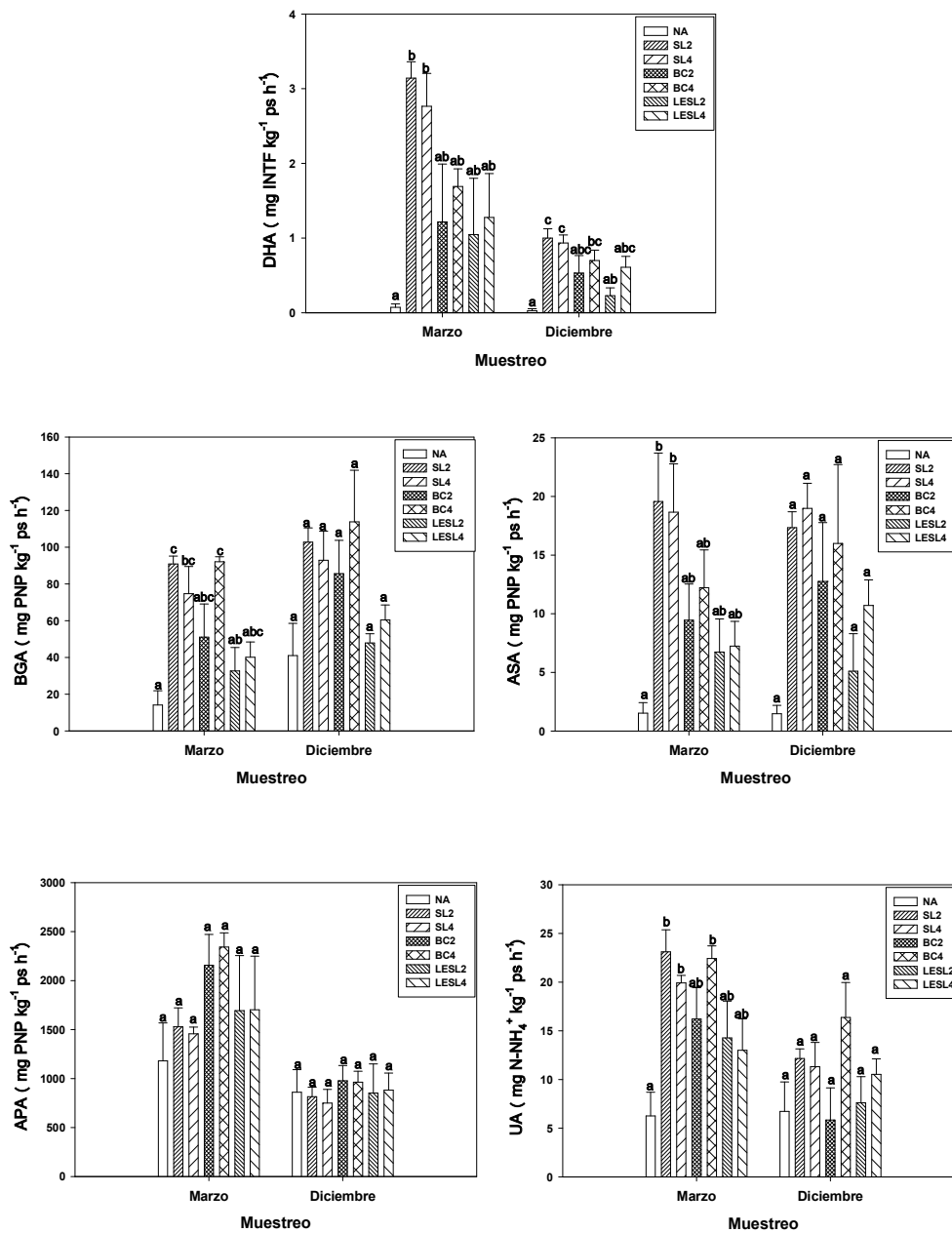
En los últimos años, las actividades enzimáticas han demostrado ser mejores indicadores de la calidad del suelo de las propiedades físico-químicas (Dick, 1997). Sin embargo, su variabilidad ante distintos factores que no sean exactamente aquellos que se pretende comparar hace necesario un esquema de muestreo claro. En cualquier caso es difícil proporcionar normas universales o umbrales para la interpretación de los resultados obtenidos en ensayos de determinación de actividades enzimáticas en el suelo. Por ello, se ha sugerido que las actividades enzimáticas pueden ser más útiles para el seguimiento de las tendencias en el tiempo que para la caracterización de un suelo en un momento dado (Speir y Ross, 2002; Hinojosa et al., 2004). En cualquier caso en el presente estudio se han incluido dos muestreos: uno en primavera, en el mes de marzo de 2012, y el otro en invierno, en el mes de diciembre de 2012 con temperaturas más bajas. En el muestreo de marzo, las determinaciones se realizaron a las dos profundidades (0-15cm y 15-30cm), mientras que en el muestreo de diciembre, dada la poca respuesta observada en el muestre anterior en la capa más profunda, las determinaciones se hicieron solamente en la capa superficial.

En general, en los dos muestreos llevados a cabo en el presente estudio, los valores medios de todas las actividades enzimáticas en la capa más superficial de los suelos tratados con las enmiendas fueron superiores que las de los suelos sin tratar (Figura IV.8). Asimismo, en el muestreo de marzo, en los suelos de las parcelas enmendadas, los valores medios en la capa superior (Figura IV.8) fueron mucho mayores que en la capa inferior (Tabla IV.3). El aumento de los valores medios de las actividades enzimáticas del suelo tratado con las distintas enmiendas siguió la tendencia: SL > BC > LESL.

La Figura IV.8 muestra además que las actividades DHA y UA fueron en general más altas en el muestreo de marzo que en el de diciembre, lo que puede atribuirse a las menores temperaturas en este mes. La misma figura muestra que todos valores medios de BGA y algunos de ASA fueron más altos en diciembre que en marzo, sin embargo la comparación de los valores de cada tratamiento en ambos meses por el test t de Student, mostró que las diferencias no eran significativas. La respuesta de la actividad enzimática a la temperatura depende de la enzima estudiada, aunque en general los numerosos trabajos realizados en este tema (Trasar-Cepeda et al., 2007; Allison y Treseder, 2008; Wallenstein et al., 2012; Steinweg et al., 2012, 2013) coinciden en que las actividades potenciales se ven favorecidas con temperaturas suaves del suelo,



IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo



**Figura IV.8.** Valores medios  $\pm$  ES ( $n=3$ ) de las distintas actividades enzimáticas (DHA, deshidrogenasa, BGA,  $\beta$ -glucosidasa; ASA, arilsulfatasa; APA, fosfatasa ácida, y UA, ureasa) en los suelos a 0-15 cm, en los muestreos realizados en marzo y diciembre 2012. En cada muestreo, los valores con distinta letra difieren significativamente (Test de Tukey,  $p<0,05$ )

#### IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo

como ocurre en los suelos del área mediterránea en los meses de primavera (muestreo de marzo). En cualquier caso hay que tener en cuenta que las temperaturas registradas en diciembre en la zona donde se llevó a cabo el estudio, no son tan bajas como las que se registran en zonas mucho más frías, en las que en los meses de invierno la actividad microbiológica del suelo es extremadamente baja (Allison y Treseder, 2008). Por consiguiente, para evaluar el efecto de las distintas enmiendas en la regeneración del suelo, los resultados obtenidos en primavera son mucho más decisivos.

**Tabla IV.3.** Valores medios ( $n=3$ ) de las distintas actividades enzimáticas (DHA; deshidrogenasa, BGA,  $\beta$ -glucosidasa, ASA, arilsulfatasa; APA, fosfatasa ácida, UA, ureasa) en los suelos a 15-30 cm en el muestreo realizado en marzo de 2011. En cada muestreo, los valores con distinta letra difieren significativamente (Test de Tukey,  $p<0,05$ ).

Tratamiento	DHA	BGA	ASA	APA	UA
	mg INTF kg <sup>-1</sup> ps h <sup>-1</sup>	mg PNP kg <sup>-1</sup> ps h <sup>-1</sup>	mg PNP kg <sup>-1</sup> ps h <sup>-1</sup>	mg PNP kg <sup>-1</sup> ps h <sup>-1</sup>	mg N-NH <sub>4</sub> kg <sup>-1</sup> ps h <sup>-1</sup>
NA	0,01	1,84	0,69	708	3,58 ab
SL2	0,36	7,04	3,33	875	7,84 b
SL4	0,30	4,67	4,30	1149	7,52 b
BC2	0,17	6,40	2,30	1154	6,75 b
BC4	0,08	5,87	1,75	1074	5,47 ab
LESL2	0,09	2,74	1,33	1045	3,63 ab
LESL4	0,01	3,87	0,69	995	2,33 a
<i>p</i>	0,247	0,226	0,120	0,211	0,004
<i>gl=20</i>	<i>dns</i>	<i>dns</i>	<i>dns</i>	<i>dns</i>	

*p*, probabilidad; *gl*, grados de libertad; *dns*, diferencias no significativas

Particularizando, en los resultados obtenidos para las distintas actividades analizadas, la deshidrogenasa (DHA) es una actividad intracelular implicada en la actividad oxidativa microbiana del suelo (Trevors, 1984) y está considerada como un indicador general de la actividad microbiológica. Esta enzima ha sido empleada como indicador de estrés por metales pesados (Rossel et al., 1997) y otras alteraciones del suelo debidas a laboreo intensivo (Melero et al., 2008, 2011) o a la contaminación por sustancias orgánicas (Wolinska and Stepniewska, 2012). Algunos autores han cuestionado la validez de esta enzima en suelos contaminados con Cu debido a alteraciones en el desarrollo del color del producto final (INTF) por este elemento (Chander y Brookes, 1991). Sin embargo, esto no pareció ser un problema en los suelos de este estudio, ya que la concentración máxima de Cu en disolución estuvo por debajo de 1 mg l<sup>-1</sup>, cantidad que tan sólo inhibe en un 5% el desarrollo del color en el ensayo

(Obbard, 2001). En general, como se ha indicado anteriormente para todas las actividades estudiadas, en 2011, 8 años después de la primera aplicación de las enmiendas, los valores medios en el muestreo de marzo fueron superiores que en el de diciembre (Figura IV.8). En la capa superior del suelo (0-15 cm) de todas las parcelas enmendadas, los valores medios de DHA fueron mucho más altos que en las no enmendadas (NA), aunque las diferencias no siempre fueron significativas. Los valores medios de DHA siguieron en general la tendencia: SL > BC > LESL >> NA. Es muy importante resaltar la gran influencia que tiene el pH sobre esta actividad. Como se ha indicado anteriormente (apartado IV.1.2) la espuma de azucarera (SL) fue la enmienda más eficaz para aumentar el pH del suelo hasta valores próximos a la neutralidad o incluso ligeramente alcalinos (Figura IV.2a), lo que se tradujo en mayores valores de esta actividad. Las otras enmiendas (LESL y BC) también dieron lugar a aumentos de la DHA con respecto al suelo sin enmienda, lo que está relacionado con su efecto alcalinizante (Figura IV.2a), así como a los aportes de materia orgánica (Figura IV.2c). En ningún caso se encontraron diferencias significativas entre los valores medios de DHA entre las dosis DO2 y DO4 (Figura IV.8).

Se han analizado también enzimas extracelulares, como la  $\beta$ -glucosidasa (BGA), arylsulfatasa, ureasa y fosfatasa, que son hidrolasas que asimismo han demostrado ser indicadores sensibles a los cambios inducidos por las enmiendas, debido a su fuerte relación con el contenido de materia orgánica del suelo (Tejada et al., 2006).

La BGA limita la velocidad de la degradación microbiana de celulosa a glucosa y desempeña un papel crucial en el ciclo C en los suelos. En el presente estudio, los valores medios de la actividad (BGA) fueron superiores en los tratamientos con enmiendas, especialmente SL y BC (Figura IV.8), y siguieron la tendencia: SL > BC > LESL > NA. La aplicación de dos dosis (DO2) o cuatro (DO4), sólo dio lugar a cambios importantes con las enmiendas orgánicas: los valores medios obtenidos con las dosis altas (BC4 y LESL4) fueron superiores a dosis bajas (BC2 y LESL2), pero en ningún caso significativo estadísticamente.

En la capa subsuperficial no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Tabla IV.3).

La arilsulfatasa (ASA) es una enzima extracelular que cataliza la hidrólisis de los ésteres de sulfatos orgánicos y la liberación de sulfatos disponibles para la planta. En los dos muestreos realizados, los valores medios de esta actividad fueron más altos en los suelos enmendados que en los suelos sin enmendar (NA) (Figura IV.8). La tendencia es

prácticamente la misma que la encontrada para las otras actividades: SL> BC> LESL> NA. La aplicación de cuatro dosis de enmienda (DO4), en casi todos los casos dio lugar a valores más altos que con dos dosis (DO2), pero en ningún caso las diferencias fueron significativas.

La actividad fosfatasa ácida (APA) ha sido también frecuentemente utilizada como indicador de cambios en la calidad del suelo debidos al manejo o a la presencia de contaminantes (Gil-Sostrés et al, 2005). Esta actividad, conocida también como fosfomonoesterasa ácida, es una enzima inespecífica que cataliza la hidrólisis de los glicerofosfatos. En el presente estudio los valores medios de APA, tanto en el muestreo de marzo como en el de diciembre, fueron ligeramente mayores en todas las parcelas enmendadas, aunque en ningún caso las diferencias fueron significativas (Figura IV.8). Tampoco se encontraron diferencias significativas debidas a la aplicación de dos o cuatro dosis (DO2 o DO4).

En este caso, el uso de esta actividad como indicador de la recuperación del suelo puede ser poco apropiado cuando se aplican enmiendas ricas en fosforo. Madejón et al. (2003b) atribuyeron un efecto de retroinhibición negativa al aumentar la concentración del producto de la reacción. En consecuencia, el aporte de P y de compuestos orgánicos lábiles pudo tener más peso en la inhibición de la actividad que otros factores que pudieran incrementarla como el aumento del pH o la disminución de las concentraciones de los elementos traza disponibles.

La enzima ureasa (UA) cataliza la hidrólisis de la urea a amonio y dióxido de carbono, y es una de las enzimas más valoradas en estudios de calidad del suelo, así como en la evaluación del impacto de los contaminantes. En este ensayo, en el muestreo de marzo, los valores medios de UA fueron en general más altos en todas las parcelas enmendadas, aunque las diferencias no siempre fueron significativas (Figura IV.8). De nuevo, los valores en el muestreo de marzo fueron superiores a los de diciembre y siguen la misma tendencia que el resto de las actividades analizadas: SL> BC> LESL> NA. La aplicación dos o cuatro dosis (DO2 o DO4) no tuvo efectos significativos en ninguno de los tratamientos. En el muestreo de diciembre no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

#### IV.1.7. Estimación del recubrimiento vegetal de las parcelas y determinación de la concentración de elementos traza en *Cynodon dactylon*.

En el muestreo llevado a cabo en junio de 2011 se observó que todas las parcelas estaban colonizadas por especies espontáneas, pero que el recubrimiento vegetal era mayor en las parcelas enmendadas (78-98%) que en las que no recibieron enmiendas (NA, 58%). Sin embargo, el ANOVA no mostró diferencias significativas entre los

**Tabla IV.4.** Resultados del ANOVA llevado a cabo con los datos de recubrimiento vegetal y concentraciones de elemento traza en plantas de *Cynodon dactylon* in 2011. Valores medios y error standard (ES).

Tratamiento	Recub. vegetal %±ES	As	Cd	Cu	Pb	Zn
		mg kg <sup>-1</sup> ±ES				
NA(n=7) <sup>a</sup>	58±20	0,8±0,2	0,10±0,02ab	5,4±0,2	0,8±0,3	80±14ab
SL2(n=6)	97±3	0,6±0,1	0,05±0,03a	4,9±0,1	0,5±0,2	49±4a
SL4(n=6)	88±6	0,7±0,1	0,07±0,02ab	5,8±0,1	0,8±0,2	58±7ab
BC2(n=4)	92±6	0,7±0,1	0,14±0,03ab	5,4±0,1	0,3±0,1	102±6b
BC4(n=4)	98±2	0,5±0,2	0,10±0,03ab	6,3±0,2	0,3±0,1	90±17ab
LESL2(n=7)	78±17	1,1±0,3	0,16±0,02b	5,8±0,3	1,7±0,6	78±5ab
LESL4(n=3)	85± 8	0,7±0,4	0,10±0,02ab	4,6±0,4	1,0±0,6	64±6ab
<i>gl</i>	20	36	36	36	36	36
<i>p</i>	0,159	0,477	0,011	0,313	0,162	0,012
	<i>dns</i>	<i>dns</i>		<i>dns</i>	<i>dns</i>	
Intervalos normales <sup>b</sup>		0,01-1,5	0,05-0,9	4-20	0.2-20	1,4-160

*p*, probabilidad; *gl*, grados de libertad; *dns*, diferencias no significativas

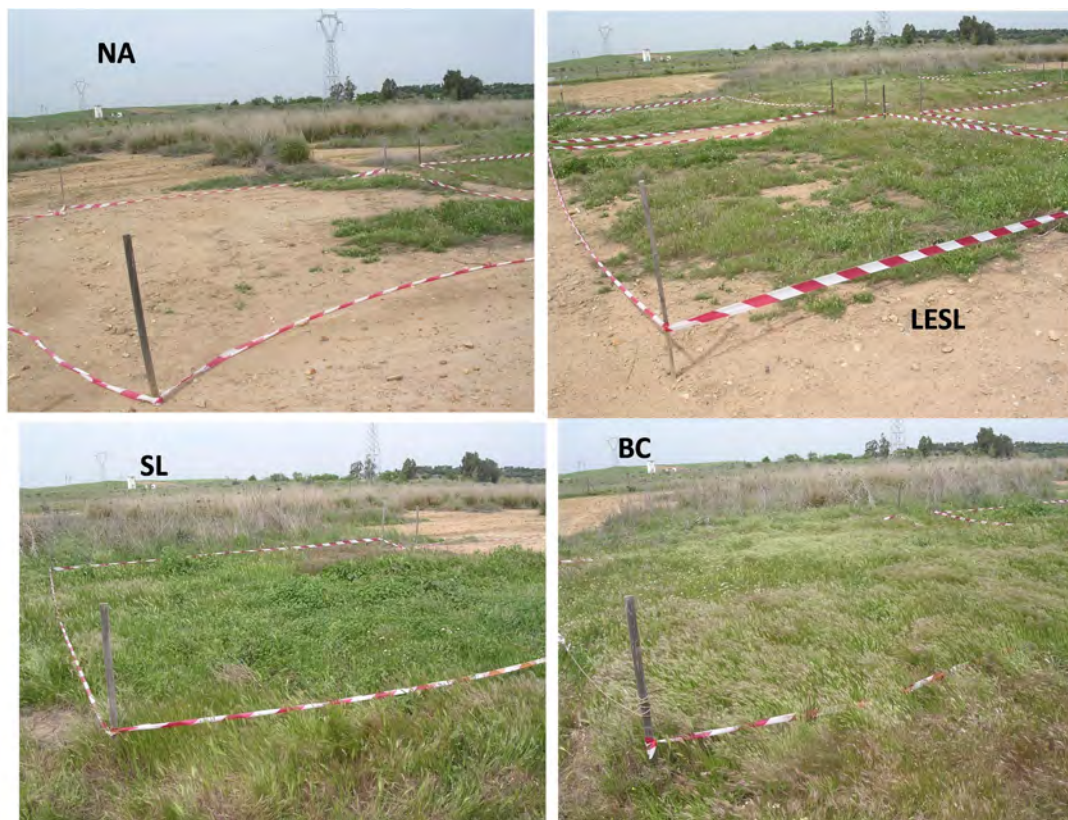
<sup>a</sup>número de plantas analizadas; <sup>b</sup>Intervalos normales en herbáceas (Bowen 1979).

En cada columna los valores con distintas letras difieren significativamente ( $p < 0,05$ ) según el test de Tukey.

tratamientos, ni por la aplicación de dos o cuatro dosis (DO2 y DO4) de enmienda (Tabla IV.4).

El aumento de la vegetación tiene gran importancia ya que reduce la diseminación de las partículas de suelo contaminadas por el viento y las aguas hacia otras áreas no contaminadas, con lo que se reduce posibilidad de la absorción de los contaminantes por la biota (Bargagli, 1998). La Tabla IV.4 muestra que las parcelas del tratamiento NA son las que en 2011 tienen el recubrimiento más bajo (58%), sin embargo este valor representa un aumento respecto al encontrado previamente por Pérez de Mora et al (2011): <5% en 2006 y 40% en 2008. En 2011 las parcelas que habían recibido enmiendas tenían un recubrimiento del 78-98%, lo que en todos los casos representa un aumento respecto a los valores encontrado entre 2006 y 2011 por esos

#### IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo



**Fotografía IV.1.** Aspecto de cuatro subparcelas perteneciente a los distintos tratamientos.

mismos autores en 2006: 45% en SL2 y SL4, 37% y 32% en BC2 y BC4, y 21 y 23% en LESL2 y LESL4. En el caso de las parcelas enmendadas estos aumentos indican una mejora de la calidad del suelo producido por las enmiendas. En el caso de las parcelas no enmendadas (NA) el aumento refleja la recuperación natural de este suelo (Fotografía IV.1).

Las concentraciones de As, Cd, Cu, Pb y Zn en *Cynodon dactylon* estuvieron dentro de los intervalos normales para herbáceas (Bowen, 1979), incluso en las parcelas que no recibieron enmiendas (NA) (Tabla IV.4). No se detectaron diferencias significativas entre los valores medios de As, Cu y Pb de los distintos tratamientos o por la aplicación de dos o cuatro dosis (DO2 y DO4). En los casos del Cd y Zn se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), que mostraron que los valores más bajos aparecían en el tratamiento SL2.

Estudios previos en estas mismas parcelas mostraron que después de recibir dos dosis de enmiendas (DO2) se reducía la acumulación de elementos traza en la parte aérea de la vegetación (Burgos et al., 2008; Madejón et al., 2006b), poniendo de

manifiesto la necesidad de la recuperación natural asistida de este suelo. Las subsiguientes aplicaciones (DO4) siguieron generalmente la misma tendencia (Pérez de Mora et al., 2011). Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto la durabilidad y sostenibilidad del método de recuperación empleado a medio plazo, así como de atenuación natural del suelo.

La importación de elementos traza por las plantas de un mismo suelo en años sucesivos es cada vez menos eficiente, ya que la concentración disponible de dichos elementos decrece a medida que son importados y la lenta reposición de la fracción disponible a partir de otras fracciones menos disponibles (McGrath et al., 2002). Este hecho explica que las concentraciones de elementos traza disponibles decrece con el tiempo si el suelo no recibe ningún tipo de tratamiento o aporte de esos elementos. En el presente estudio, al cabo de 8 años, las concentraciones de elementos traza en la parte aérea de *Cynodon dactylon* son mucho más bajas que las encontradas en la misma parcela experimental por Pérez de Mora et al. (2011), o en otras áreas de suelos similares sometidos a recuperación (Madejón et al., 2002, 2006b). También se podría explicar de esta forma por qué al cabo de 8 años en las parcelas NA las concentraciones en la parte aérea de las plantas son similares a las de la parcelas enmendadas, cuando a los 6 años la vegetación en las parcelas NA aun presentaban concentraciones potencialmente tóxicas (Madejón et al., 2006a; Pérez de Mora et al., 2011).

#### **IV.1.8. Discusión general del experimento de campo**

##### *IV.1.8.1. Correlaciones de Pearson entre las variable estudiadas*

Los resultados de la Tabla IV.5 muestran que las concentraciones medias de Cd, Cu y Zn extraídos con  $\text{CaCl}_2$  0,01M de los suelos a 0-15 cm, están correlacionadas negativamente con los valores medios de pH. Estos resultados están de acuerdo con lo expuesto en el apartado IV.1.2 (la aplicación de enmiendas aumentaba el pH de los suelos). Consecuentemente es de esperar que se produjera una disminución de la movilidad y disponibilidad de los elementos traza, que en efecto se observó según se describió en el apartado IV.1.5.3.

IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo

**Tabla IV.5.** Coeficientes de correlación de Pearson entre las distintas variable estudiadas en las capas de 0-15 cm de los suelos. \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  ( $n=21$ )

a) 0-15 cm	pH	COT	COS	Cd- CaCl <sub>2</sub>	Cu- CaCl <sub>2</sub>	Zn- CaCl <sub>2</sub>	N-Kjeld	P-Olsen	K-disp	DHA	BGA	ASA	APA	UA	Recub. vegetal
pH	1	-	-	-0,917**	-0,556**	-0,897**	-	0,555**	-	0,909**	0,853**	0,844**	-	0,858**	0,677**
COT		1		-	-0,439*	-	0,556**		0,480*	-	-		-	-	-
COS			1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,423*	-	-	-
Cd-CaCl <sub>2</sub>				1	0,592**	0,970**	-	-	-0,492*	-0,781**	-0,766**	-0,732**	-	-0,784**	-0,700**
Cu-CaCl <sub>2</sub>					1	0,747**	-	-	-0,634**	-	-0,479*	-	-0,577**	-0,599**	-0,875**
Zn-CaCl <sub>2</sub>						1	-	-0,443*	-0,545*	-0,736**	-0,758**	-0,697**	-	-0,797**	-0,813**
N-Kjeld							1	0,640**	-		0,469*	-	0,554**	0,468*	0,452*
P-Olsen								1	-	-	0,600**	-	-	0,571**	-
K-disp									1		-	-	-	0,531*	0,620**
DHA										1	0,828**	0,860**	-	0,788**	0,567**
BGA											1	0,847**	-	0,884**	0,673**
ASA												1	-	0,744**	0,580**
APA													1	0,446*	0,623**
UA														1	0,764**
Recub. Vegetal															1



#### IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo

La aplicación de enmiendas aumenta la concentración de COT de los suelos (apartado IV.1.3). La materia orgánica juega un papel crítico en el comportamiento de los elementos traza en el suelo, pudiendo disminuir o aumentar su movilidad y disponibilidad, dependiendo de la naturaleza de la misma y de la del elemento traza (Cabrera y Madejón, 2014). En el presente estudio, sólo el Cu extraíble en  $\text{CaCl}_2$  se correlaciona negativamente con el COT (Tabla IV.5)

Respecto a los nutrientes, se observa que tanto el N-Kjeldhal, como el K disponible, se correlacionan positivamente con el COT, o sea, con los aportes orgánicos (Tabla IV.5). No así el P-Olsen que se correlaciona positivamente con el pH (Tabla IV.5), ya que el P disponible aumenta al hacerlo el pH. Lo que concuerda con lo puesto de manifiesto en el apartado IV.1.4: la enmienda que más aumentaba el P-Olsen era la SL, que era la que producía mayor aumento del pH del suelo.

La actividad DHA se correlaciona positivamente con el pH del suelo, con las otras actividades estudiadas (excepto con la APA) y con el recubrimiento vegetal, y negativamente con las concentraciones de elementos traza extraíbles con  $\text{CaCl}_2$  0,01 M (Tabla IV.5). Otros autores corroboraron el aumento de DHA provocado por el aumento del pH y el descenso en la solubilidad de elementos traza (Jiang et al., 2003; Pérez de Mora et al., 2006a).

La actividad BGA también se correlaciona positivamente con el pH del suelo, con las demás actividades estudiadas a excepción de la APA y con el recubrimiento vegetal, y negativamente con las concentraciones de elementos traza disponibles (Tabla IV.5). La bibliografía muestra diferentes resultados al respecto, mientras Kuperman y Carreiro (1997) encontraron que esta actividad se redujo notablemente a altas concentraciones de metales pesados, Aoyama et al. (1993) observaron que esta actividad se veía poco afectada por altas concentraciones de Cu y Zn. En el presente estudio, parece que el aumento del pH en el suelo, debido a la aplicación de las enmiendas, con la consecuente reducción de la disponibilidad de metales, es la causa principal del aumento de los niveles de la BGA en el suelo.

La ASA se correlaciona positivamente con el pH, con el COS, con las demás actividades enzimáticas (excepto con la APA) y con el recubrimiento vegetal, y negativamente con las concentraciones de Cd y Zn solubles (Tabla IV.5). Según Dick (1997), esta actividad es la más sensible a la contaminación con elementos traza. También Pérez de Mora et al. (2005) encontraron correlaciones similares entre esta actividad y la disponibilidad de metales.

#### IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo

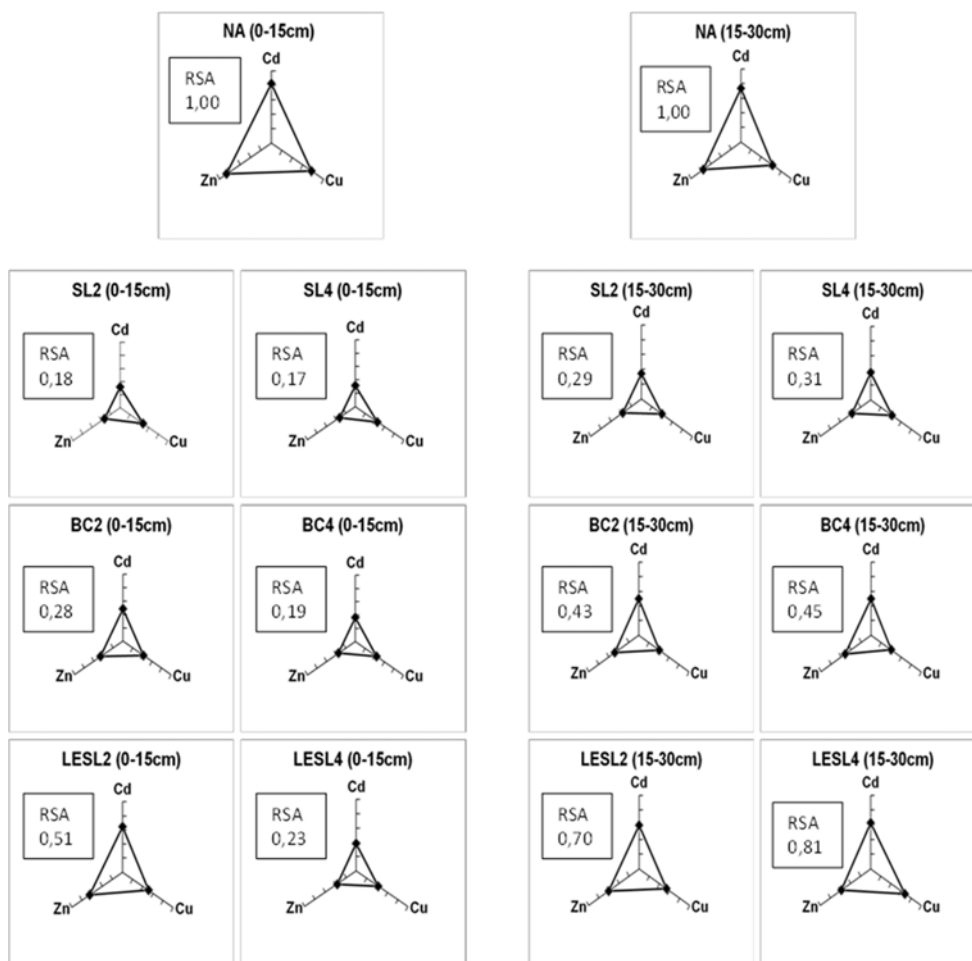
La APA sólo se correlaciona negativamente con la concentración de Cu disponible y positivamente con el N-Kjeldhal y el recubrimiento vegetal, y no se correlaciona con ninguna de las otras actividades enzimáticas estudiadas (Tabla IV.5).

En general la actividad UA está positivamente correlacionada con el resto de los parámetros químicos y bioquímicos del suelo, excepto COT y COS, y con el recubrimiento vegetal (Tabla IV.5), lo que parece indicar que es la actividad enzimática más apropiada para evaluar la recuperación de los suelos ocasionada por las enmiendas.

##### *IV.1.8.2. Índices de contaminación, de fertilidad química y de fertilidad bioquímica*

El principal objetivo del presente estudio es la aplicación de enmiendas para reducir la disponibilidad de los elementos traza en un suelo contaminado con elementos traza, así como la determinación de la durabilidad de dicha reducción. Las propiedades físicas, químicas y bioquímicas que influyen en los procesos del suelo y sus variaciones espaciales y temporales, contribuyen al concepto de la calidad del suelo (Doran y Parkin, 1994). En consecuencia, considerar las propiedades del suelo de forma individual es en general insuficiente para hacer una estimación adecuada de la calidad del suelo (García-Ruiz et al., 2008). De los resultados acabados de describir se deduce que a los ocho años del comienzo del experimento el suelo ha experimentado diversos cambios positivos en sus propiedades químicas y bioquímicas. Uno de los cambios ha consistido en un aumento del pH, con la esperada disminución de las concentraciones de elementos traza catiónicos disponibles (Kabata-Pentias y Adriano, 1995; Petruzzelli, 1997; Adriano, 2001), lo que ha dado lugar al aumento del recubrimiento vegetal de las parcelas enmendadas. También se ha observado la recuperación natural de las parcelas no enmendadas debido a la reacción entre los elementos traza y los componentes del suelo, que conducen a la inmovilización de elementos traza catiónicos (Adriano 2001). Una de las formas de representar el conjunto de varias propiedades del suelo para visualizar y calcular la eficacia de las medidas de manejo o de recuperación es la Sun Ray Plot (SRP) o diagrama de rayos de sol (DRS) (Dilly y Blume, 1998; Moreno et al., 2009; Moreno et al, 2011). Los diagramas de Rayos de Sol permiten, por ejemplo, una visión integrada de los efectos de los distintos tratamientos en la disminución de la disponibilidad del Cd, Cu y Zn, y en definitiva del éxito de la recuperación de este suelo. La forma y el área superficial de los triángulos formados por los valores medios

#### IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo

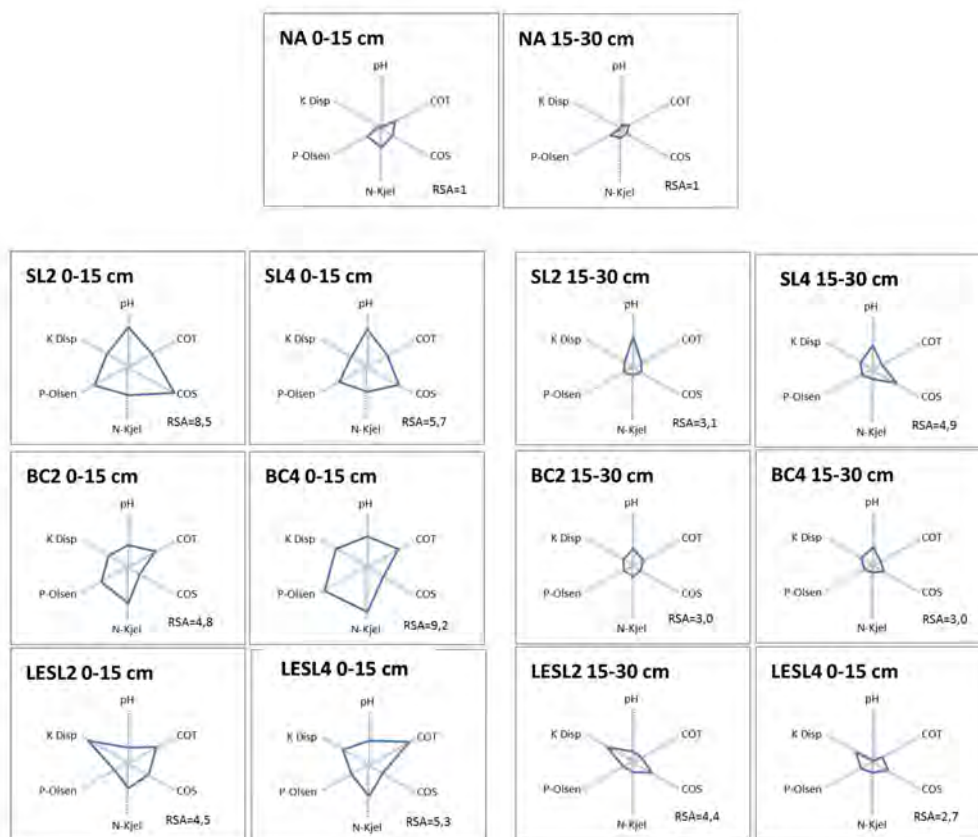


**Figura IV.9.** Diagramas de Rayos de Sol de las concentraciones de Cd, Cu y Zn extraídos con  $\text{CaCl}_2$  0,01 M. RSA, son los valores de las áreas superficiales relativas.

estandarizados de las concentraciones de esos elementos extraídos con  $\text{CaCl}_2$  0,01M, son características de cada tratamiento (Figura IV.9).

El área integrada de cada triángulo y el área relativa de cada triángulo respecto al tratamiento NA (Área Superficial Relativa,  $\text{RSA} = \text{IA}_{\text{tratamiento}}/\text{IA}_{\text{NA}}$ ) puede calcularse y considerarse como un índice de la contaminación o de la recuperación. Los resultados de RSA muestran que en la capa superficial y dosis DO2 la efectividad de las enmiendas es  $\text{SL2} > \text{BC2} > \text{LESL2}$ . Las subsiguientes aplicaciones DO4, produjeron disminuciones de la contaminación en los tratamientos con BC (BC4) y especialmente con LESL (LESL4), que se redujo un 45% el valor de RSA respecto a LESL2. En la capa subsuperficial, la efectividad de los tratamientos es menor, aunque sigue la misma secuencia, y la dosis DO4 no representó prácticamente cambios respecto al DO2.

#### IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo



**Figura IV.10.** Diagramas de Rayos de Sol contruidos con los valores medios estandarizados de las variables relacionadas con la fertilidad química: pH, COT, COS, N-Kjel., P-Olsen y K-Dispo. RSDA, son los valores de las áreas superficiales relativas

La aplicación de enmiendas produjo el aumento de variables relacionadas con la fertilidad química del suelo: pH, COT, COS, N-Kjedahl, P-Olsen y K-disponible. Con la ayuda los diagramas de Rayos de Sol es posible el análisis global del efecto de las enmiendas sobre estas variables y en definitiva sobre la fertilidad del suelo. De forma similar al caso de la disponibilidad de los elementos traza, el área superficial relativa de cada figura poligonal de cada tratamiento respecto al tratamiento sin enmienda (NA), puede considerarse un índice del estado la fertilidad relativa del suelo. Los resultados del RSA de la Figura IV.10 muestran que la fertilidad aumenta con todos los tratamientos. En la capa superficial con la dosis SL2 se obtuvieron valores de RSA la enmienda más efectiva, que aumenta el índice de fertilidad 8,5 veces respecto a NA y la secuencian del aumento es: SL2>BC2>LESL2. Para DO4 se observaron aumentos de RSA entre 5,3 y 9,2, siendo la tendencia: BC4>SL4>LESL4. En la capa más profunda

los aumentos fueron mucho menores, estando comprendidos los valores de RSA entre 2,7 y 4,9.

En cuanto a las propiedades bioquímicas, existen numerosos índices que permiten hacer su valoración global, permitiendo obtener una información general del estado del suelo y de su recuperación. En este sentido, la media geométrica de los valores de las distintas actividades (MGAE), es un índice general que se usa para evaluar la calidad bioquímica del suelo en función de las actividades enzimáticas (Hinojosa et al, 2004; Carreira et al., 2008).

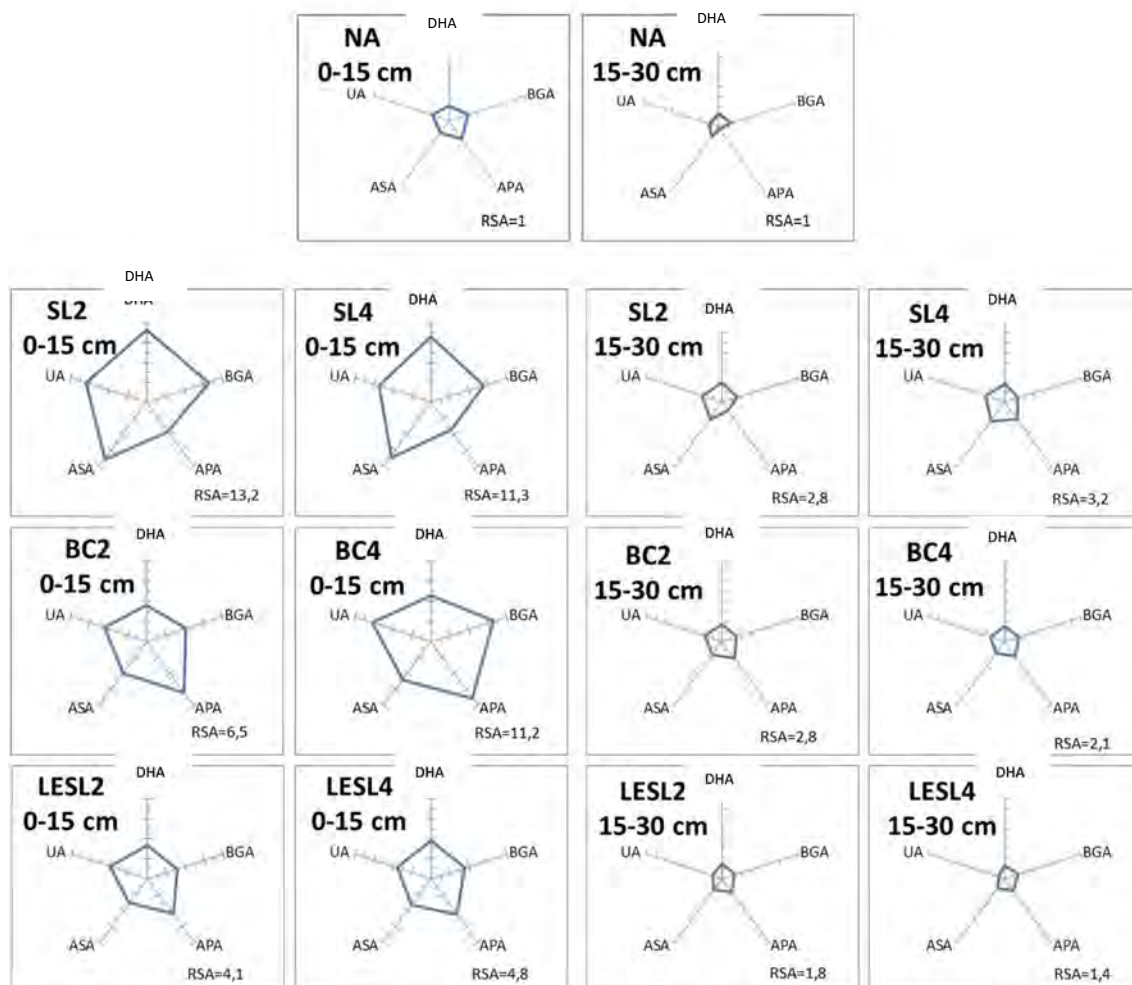
Los valores de MGAE de cada tratamiento en el muestreo de marzo fueron más altos que en el diciembre (Tabla IV.6).

**Tabla IV.6.** Valores medios ( $n=3$ )  $\pm$  error estandard de la media geométrica de las distintas actividades enzimáticas (MGAE) en los suelos a 0-15 cm en los muestreos de marzo y diciembre y a 15-30 cm en el muestreo de marzo. En cada muestreo, los valores con distinta letra difieren significativamente (Test de Tukey,  $p<0,05$ ).

Tratamiento	MGAE		
	Marzo (0-15cm)	Diciembre (0-15cm)	Marzo (15-30cm)
NA	6,28 $\pm$ 2,74a	5,76 $\pm$ 2,35a	1,40 $\pm$ 0,58
SL2	44,9 $\pm$ 0,50b	28,0 $\pm$ 1,49b	8,12 $\pm$ 2,59
SL4	40,3 $\pm$ 4,91b	26,6 $\pm$ 3,77b	8,00 $\pm$ 3,00
BC2	27,1 $\pm$ 7,70ab	14,0 $\pm$ 4,85ab	6,03 $\pm$ 1,73
BC4	39,3 $\pm$ 3,85b	28,5 $\pm$ 6,78b	5,31 $\pm$ 0,24
LESL2	20,4 $\pm$ 7,81ab	12,1 $\pm$ 3,80ab	3,94 $\pm$ 1,19
LESL4	23,3 $\pm$ 5,69ab	20,4 $\pm$ 3,35ab	1,83 $\pm$ 0,50

En ninguno de los dos muestreos se observaron diferencias significativas debidas al número de dosis aplicadas (DO2 y DO4). En el muestreo de marzo se observó que en todos los tratamientos los valores de MGAE fueron más altos en la capa superficial de los suelos. En la capa superficial de ambos muestreos la tendencia de los valores de MGAE fue: SL > BC > LESL > NA, lo que indica que la enmienda que mejor contribuye a aumentar la fertilidad bioquímica del suelo estudiado en la espuma de azucarera. En esta capa los valores de MGAE en los tratamientos con SL, fueron significativamente mayores que en el tratamiento sin enmienda (NA). En los tratamientos con BC y LESL los valores también fueron más altos que en NA, pero las diferencias sólo fueron significativas en el caso de BC4. En la capa inferior de los

#### IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo



**Figura IV. 11.** Diagramas de Rayos de Sol construidos con los valores medios estandarizados de las actividades enzimáticas DHA, BGA, APA, ASA y UA en marzo 2012. RSA, son los valores de las áreas superficiales relativas.

suelos los valores de MGAE también fueron más altos en los que fueron enmendados, pero en ningún caso las diferencias con NA fueron significativas.

Los resultados de las actividades enzimáticas también se han analizado mediante los diagramas de Rayos de Sol (Figura IV.11).

Las figuras poligonales y sus áreas superficiales, obtenidas con los valores medios estandarizados de las actividades enzimáticas analizadas, son características de cada tratamiento. El área superficial de cada polígono es una medida de la fertilidad bioquímica y el aumento relativo debido a la aplicación de las enmiendas se puede valorar mediante el área superficial relativa (RSA) respecto al tratamiento sin enmienda (NA).

En la capa superficial de los suelos en emendados, la aplicación de enmiendas produjo valores de RSA entre 4,1 y 13,2 veces mayores que en el tratamiento sin enmienda. El tratamiento SL fue el más efectivo, con valores de RSA de 13,2 y 11,3 en SL2 y SL4 respectivamente, seguido de los tratamientos BC2 (6,5) y BC4 (11,2) y LESL2 (4,1) y LESL4 (4,8). En la capa subsuperficial los valores de RSA fueron mucho menores, oscilando entre 1,4 y 2,2.

*IV.1.8.3. Análisis de componentes principales de las variables estudiadas en los suelos.* El análisis de componentes principales de las variables medidas en la capa superficial (0-15 cm) de los suelos de los distintos tratamientos, muestra que tres componentes

**Tabla IV.7.** Resultado del análisis de componentes principales de las variables estudiadas en los suelos.

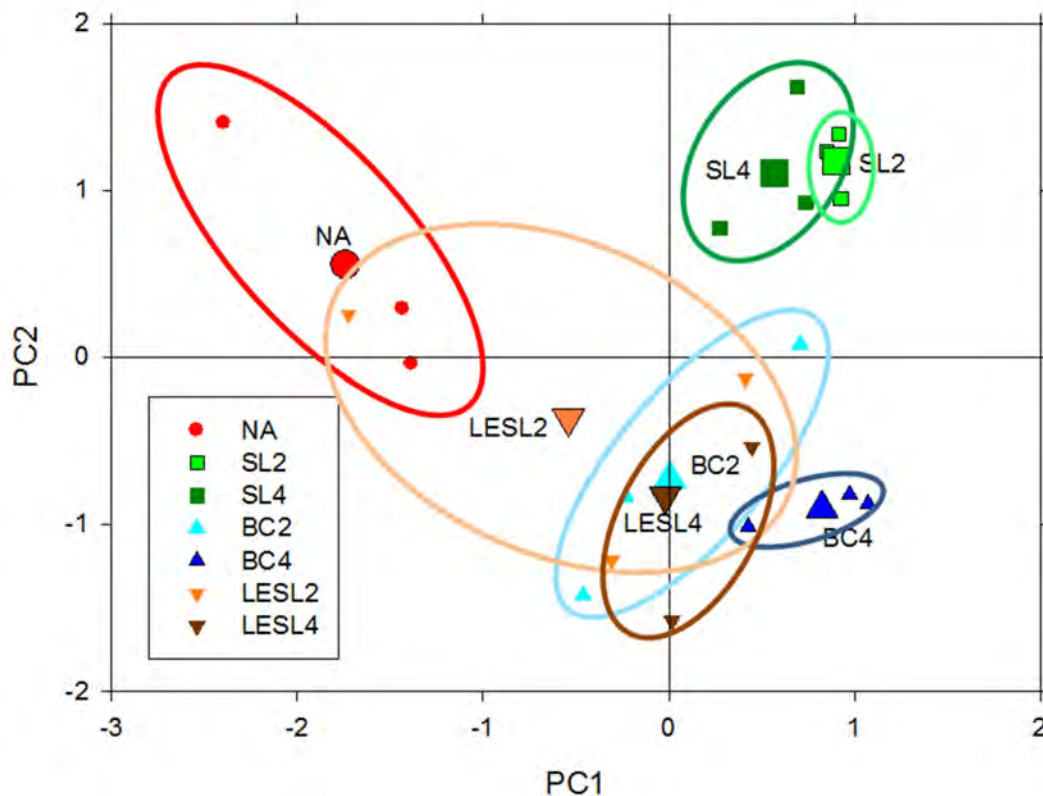
0-15 cm	CP1	CP2	CP3
pH	<b>0,950</b>	0,228	-0,007
UA	<b>0,935</b>	0,034	0,067
Zn-CaCl <sub>2</sub>	<b>-0,929</b>	0,069	0,133
Cd-CaCl <sub>2</sub>	<b>-0,912</b>	-0,035	0,097
BGA	<b>0,909</b>	0,189	0,16
DHA	<b>0,837</b>	0,433	-0,096
ASA	<b>0,812</b>	0,414	-0,051
Cu-CaCl <sub>2</sub>	<b>-0,691</b>	0,433	0,285
APA	0,360	<b>-0,727</b>	0,135
COS	0,346	<b>0,566</b>	-0,054
COT	0,397	<b>-0,565</b>	-0,186
N-Kj.	0,512	<b>-0,555</b>	0,541
P-Olsen	0,566	-0,002	<b>0,758</b>
K-disp.	0,556	-0,380	<b>-0,600</b>
Varianza explicada (%)	53,1	16,1	10,2

explican el 79,4% de la varianza del sistema (Tabla IV.7).

El primer componente que explica el 53,1% de la varianza está correlacionado positivamente con el pH y los valores de las actividades enzimáticas UA, BGA, DHA y ASA, y negativamente con las concentraciones de Cd, Cu y Zn extraíbles con CaCl<sub>2</sub> de los suelos, variables relacionadas con la contaminación por elementos traza y con la fertilidad bioquímica de los mismos, y en definitiva con la recuperación de los suelos. En efecto, el valor más bajo de CP1 corresponde al suelos contaminado sin tratar (NA),

#### IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo

que tiene pH ácido y altas concentraciones de elementos traza disponibles y consecuentemente baja fertilidad bioquímica. En contraste, los suelos enmendados con SL que al final del experimento tenían los pH más altos, las concentraciones más bajas de elementos disponibles y los más altos valores de las actividades enzimáticas, son los que tienen valores más altos de PC1. El resto de los tratamientos ocupan posiciones intermedias. Por consiguiente, los valores de PC1 indican el grado de recuperación de



**Figura IV. 12.** Distribución de los suelos (0-15 cm) de los distintos tratamientos respecto a los componentes principales CP1 y CP2. Los símbolos más grandes son los centroides de cada tratamiento (Valores medios de las coordenadas CP1 y CP2 de cada tratamiento).

los suelos debido a la aplicación de las distintas enmiendas, que es el siguiente:

NA < LESL2 < LESL4 < BC2 < BC4 < SL4 < SL2 (Figura IV.12).

El segundo componente CP2, que explica el 16,1% de la varianza, está correlacionado negativamente con la concentración de la actividad enzimática APA y con las concentraciones de COT y N-Kj, y positivamente con las de COS. La distribución de los suelos respecto a este componente pone de manifiesto que los tratamientos en los que los suelos recibieron enmiendas orgánicas (BC2, BC4, LESL2 y



LESL4) tienen los valores más altos, mientras que los que recibieron enmienda mineral (SL) o no recibieron enmienda (NA), tiene los valores más bajos (Figura IV.12).

En la Figura IV.12 puede observarse que los suelos de los distintos tratamientos se encuentran agrupados en diferentes zonas. Generalmente, los suelos que recibieron dos o cuatro dosis (DO2 y DO4) de cada enmienda se encuentran en zonas solapadas. El solapamiento en cierto modo indica de una manera global que la aplicación de dos o cuatro dosis de enmienda conduce a resultados similares en cuanto a las propiedades del suelo. Los tratamientos dan lugar a una separación muy notable entre los suelos no enmendados y enmendados, debido fundamentalmente a los valores de CP1. Las dos zonas extremas corresponden a los suelos sin enmendar (NA) y a los enmendados con espuma de azucarera (SL2 y SL4), en los que, que como se ha puesto de manifiesto anteriormente, las principales diferencias entre ellos radican en los valores de pH y de las concentraciones de elementos trazas disponibles (Figuras IV.1 y IV.3). También se observa en esa figura que los tratamientos con enmiendas orgánicas (BC2, BC4, LESL2 y LESL4) ocupan zonas en que los valores de CP2 son generalmente positivos.

#### **IV.1.9. Conclusiones del experimento de campo**

Al cabo de ocho o seis años, la aplicación de dos dosis o cuatro dosis de enmiendas (espuma de azucarera, compost de biosólido y leonardita) para la recuperación de un suelo ácido contaminado con elementos traza dio lugar a aumentos del pH y disminución de la concentración de elementos traza móviles/disponibles, principal objetivo de dicha aplicación. A su vez, la enmienda de los suelos mejoró la fertilidad del suelo, observándose aumentos de la calidad química y bioquímica del mismo. El efecto de las enmiendas fue mucho mayor en la capa superficial (0-15 cm) que en la subsuperficial (15-30 cm) del suelo. Todo ello potenció la colonización de los suelos enmendados por especies espontáneas. Globalmente, la enmienda más efectiva fue la espuma de azucarera con la que se consiguió mayores aumento de pH, que es la variable mejor correlacionada prácticamente con todas las demás estudiadas (disminución de la movilidad/disponibilidad de los elementos traza y aumentos del P-Olsen y de la actividades deshidrogenasa,  $\beta$ -glucosidasa, arilsulfatasa y ureasa). En general la aplicación de dos o cuatro dosis se enmiendas produjo al cabo de los 8 o 6 años resultados muy similares, aunque ligeramente superiores en el segundo caso, para todas las variables estudiadas, lo que hace pensar que no hubiera sido necesaria la tercera y

#### IV.1. Resultados y discusión del experimento de campo

cuarta aplicación de enmiendas. Estos resultados demuestran la posibilidad de la recuperación natural asistida (RNA) de este suelo.

Aprovechando los resultados obtenidos anteriormente a los del presente trabajo, se ha estudiado la evolución de todas las variables durante un período de ocho años. En ese estudio se ha podido constatar que en general los valores de todas las variables se mantienen o disminuyen ligeramente después de la última aplicación de enmienda, lo que da una idea de la perdurabilidad de la recuperación mediante la aplicación de enmiendas, y en definitiva de la recuperación natural asistida el suelo. La evolución de los resultados obtenidos también ha mostrado que en ese período en el suelo sin tratar aumentó el pH y disminuyó la concentración de elementos traza móviles/disponibles, lo que es un signo de la recuperación natural (RN) de ese suelo.

## **VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores al aire libre (condiciones de semicampo)**



#### **IV.2.1. Evolución del pH de los suelos**

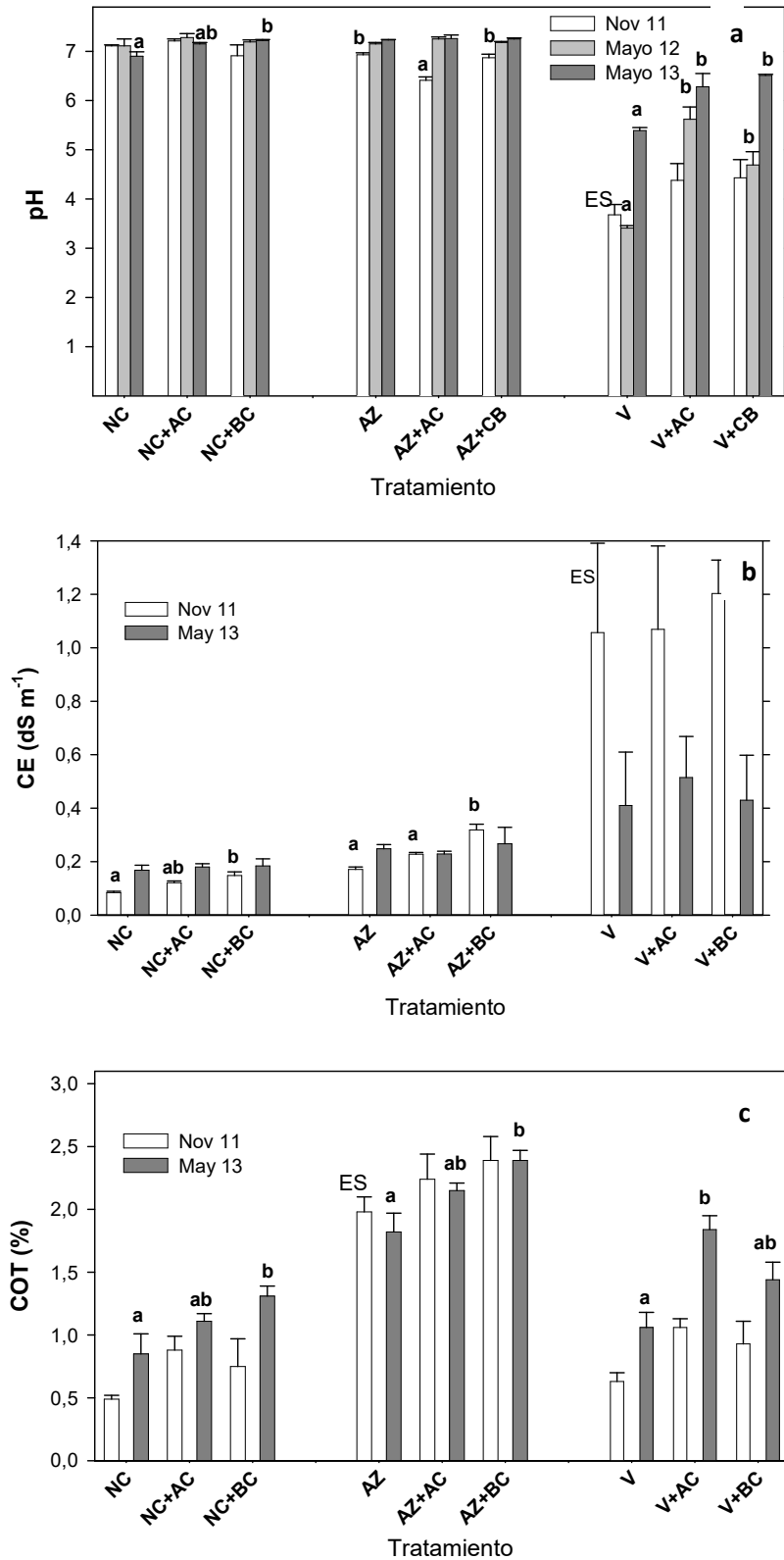
Los valores medios de pH de los suelos neutros (NC y AZ) no mostraron apenas cambios ocasionados por la aplicación de enmiendas; sólo en el suelo NC en el tercer muestreo (mayo 2013) se observó un incremento significativo de pH debido al BC. En el suelo AZ se observaron aumentos de los valores de pH con el tiempo en todos los tratamientos, aunque no siempre significativos (Figura IV.13a). Estos resultados pueden explicarse por la naturaleza de ambos suelos y enmiendas (pH cercano a la neutralidad, Tabla III.1 y Tabla II.2). Sin embargo, los efectos debidos a las enmiendas fueron evidentes en el suelo ácido V, aunque sólo mostraron diferencias significativas en los dos últimos muestreos (mayo 2012 y 2013), debido a la adición extra de enmienda en marzo de 2012 (ver II.3.2). La evolución en el tiempo de este suelo ácido también mostró incrementos importantes en los tres tratamientos (V, V+AC, V+BC). Como ya se ha indicado, el pH es una de las propiedades del suelo que más influye para mantener su fertilidad (Brady y Weil, 2002). De hecho la adición de enmiendas orgánicas con pH neutros o alcalinos normalmente aumenta la alcalinidad del suelo, especialmente en suelos ácidos como se ha comprobado también en el experimento de campo con el mismo suelo en IV.2.2 (Madejón et al., 2010; Xiong et al, 2015) y en otros estudios (Pérez de Mora et al., 2006b).

En los suelos sin enmienda las raíces de *Paulownia* fueron capaces de mantener el pH entorno a la neutralidad en los suelos NC y AZ y en caso del suelo ácido V incluso aumentaron dicho valor (Figura IV.13a). Este hecho puede estar relacionado con la acción de los exudados y metabolitos liberados por las raíces y por los metabolitos liberados por los microorganismos del suelo de la rizosfera (Marschner y Romheld, 1983; Leyval y Berthelin, 1993). Las raíces son capaces de alterar el pH del suelo por asimilación/producción de aniones/cationes, liberación de ácidos orgánicos y CO<sub>2</sub>, consumo de O<sub>2</sub> y a través de reacciones redox (Nye, 1981; Jones et al., 2004). Pérez de Mora et al. (2006) observaron aumentos de pH similares en el mismo suelo ácido V usando *Agrostis* como cubierta vegetal tras 36 meses de experimentación.

#### **IV.2.2. Evolución de la conductividad eléctrica (CE) de los suelos**

Los valores de la conductividad eléctrica solo se presentan en el muestreo inicial y final (2011 y 2013) (Figura IV.13b). En los suelos neutros, NC y AZ, en primer año de estudio (2011), la aplicación de enmiendas causó un aumento de la salinidad del suelo, que en caso del compost de biosólidos (BC) fue significativo estadísticamente. En el

VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores



**Figura IV.13.** Evolución del a) pH, b) conductividad eléctrica (CE) y c) carbono orgánico total (COT) de los suelos (Valores medios  $\pm$  ES, n=3). En cada suelo y muestreo, las diferencias significativas debidas a las enmiendas están marcadas con distintas letras (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).

suelo ácido V no se observaron diferencias debidas a las enmiendas, pero sí un descenso importante de la CE en el tiempo, relacionado con el aumento de pH que experimentaron estos suelos. Según algunos autores cuando se añaden enmiendas orgánicas de forma sucesiva a los suelos, se corre el riesgo de aumentar la salinidad de los suelos (Climent et al., 1994). Sin embargo, otros autores (Bevacqua y Mellano, 1994; Madejón et al., 2001) no encontraron aumentos en la salinidad del suelo cuando la dosis de aplicación de residuos orgánicos o compost no superaban las dosis de 50-100 Mg ha<sup>-1</sup> debido al efecto de dilución y a los procesos de lavado de sales.

### **IV.2.3. Evolución del carbono orgánico total (COT) de los suelos**

Al igual que para la CE, las concentraciones de COT sólo se muestran al principio y final del experimento (Figura IV.13c). La adición de ambas enmiendas supuso un aumento de COT en todos los suelos estudiados. El aumento de COT (excepto en el suelo neutro contaminado AZ) se potenció con el tiempo. Estos aumentos en el contenido de C son debidos tanto a la adición de la enmienda, como al aporte realizado por la planta. En el caso del suelo V hay que tener en cuenta que el fuerte aumento de COT se debe en parte a la adición extra de enmienda realizada en marzo de 2012. Las diferencias de C entre el primer y último muestreo en los suelos sin enmienda permiten calcular el aporte realizado por la planta. Así, en estos suelos sin enmienda los contenidos de COT aumentaron entre noviembre 2011 y mayo 2013, en NC de 0,49 a 0,85 % ( $\Delta$  0,45%) y en V de 0,63 a 1,06 % ( $\Delta$  0,43%). Estos resultados muestran que el crecimiento de Paulownia contribuyó al incremento de materia orgánica en los suelos NC y V sin enmendar. En el suelo AZ, que es el que mayor COT inicial presentaba, no se observó aumento atribuible a la planta.

Como ya se ha indicado, la materia orgánica es fundamental para mantener la calidad de un suelo y para regular sus diversas funciones. Además, la aplicación de enmiendas puede mejorar y acelerar la recuperación de un suelo contaminado (Terry, 1998; Brown, 1997; Kumpiene, 2010). Por tanto, aumentar el contenido de materia orgánica del suelo es uno de los principales objetivos cuando se aplican enmiendas orgánicas a suelos contaminados o degradados, como los del presente estudio, cuyos valores medios de COT en los suelos antes de las enmiendas fueron muy bajos para NC y bajos para V (Figura IV.13c) (Hazelton and Murphy, 2007). Por tanto los incrementos de COT fueron fundamentales en el suelo NC y V, pobres en materia orgánica.

#### **IV.2.4. Evolución del Nitrógeno Kjeldhal (N-Kj), Fósforo Olsen (P-Olsen) y Potasio disponible K-disp) de los suelos**

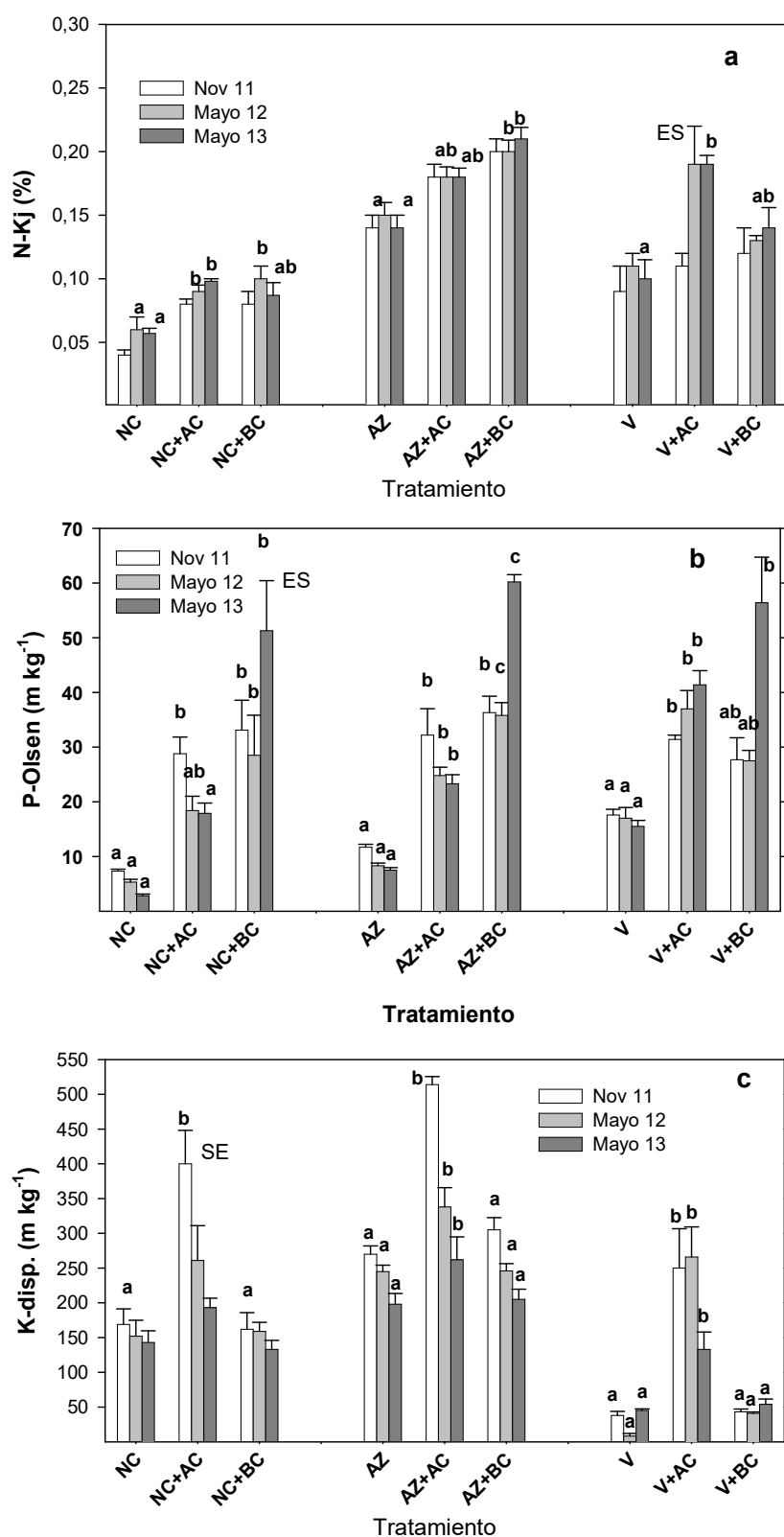
Las concentraciones de N-Kj en los suelos sin enmendar fueron muy bajas en el suelo NC, bajas en V y normales en AZ (Figura IV.14a) (Hazelton and Murphy, 2007). Como las plantaciones de Paulownia tienen altos requerimientos nutricionales (Zhu, 1991), la adición de enmiendas es fundamental para un adecuado desarrollo de este cultivo, y más teniendo en cuenta la baja fertilidad de estos suelos.

La aplicación de ambas enmiendas supuso un aumento en las concentraciones de N-Kj en los tres suelos aunque estos incrementos no siempre fueron significativos (Figura IV.14a). En los suelos NC y V con o sin enmienda las concentraciones de N-Kj tendieron a aumentar durante el periodo experimental, mientras que en el suelo AZ las concentraciones permanecieron prácticamente constantes durante el periodo estudiado.

En los suelos sin enmendar se observó que las concentraciones de N-Kj tendían a aumentar durante el período experimental, lo que pone de manifiesto el efecto del crecimiento de la Paulownia que causa un aumento del N del suelo a pesar de los altos requerimientos de este elemento que tiene esta planta (Zhu, 1991). Las concentraciones de N-Kj aumentaron durante el período experimental en los suelos NC y V enmendados tanto con AC, como con BC; en el caso del suelo V los aumentos están relacionados con los aportes extra de enmiendas realizados en marzo de 2012.

El efecto de ambas enmiendas sobre la disponibilidad de P fue evidente, especialmente con el BC, debido al alto contenido de P-disponible en esta enmienda (Tabla III.2), mostrando diferencias significativas con el suelo no enmendado en la mayoría de los casos (Figura IV.14b). En los suelos sin enmendar y en los suelos NC y AZ enmendados con AC, las concentraciones de P-disponible disminuyeron a lo largo del experimento, probablemente debido a los requerimientos nutricionales de la planta. Sin embargo la aplicación de BC mantuvo constante los contenidos de P-disponible hasta el segundo muestreo, e incluso dio lugar a un incremento importante en el último muestreo, en las que las concentraciones de P-disponible superaron los  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  (Figura IV.14b). De nuevo, hay que poner de manifiesto que el comportamiento del suelo V es distinto al de los otros dos, especialmente con la enmienda AC, debido al aporte extra comentado anteriormente. En general, los resultados parecen indicar que los valores más altos de disponibilidad del P al final del experimento están relacionados con la menor demanda de P de la planta en ese momento.





**Figura IV.14.** Evolución de los valores de a) N-Kjeldahl (N-Kj), b) P-Olsen y c) K-disponible (K-disp.) de los suelos (Valores medios  $\pm$  ES, n=3). En cada suelo y muestreo, las diferencias significativas debidas a las enmiendas están marcadas con distintas letras (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).

## VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores

La adición de AC supuso un aumento de la concentración de K-disponible en los tres suelos al comienzo del experimento (noviembre 2011) (Figura IV.14c) como consecuencia del mayor contenido de K-disponible en esta enmienda (Tabla III.2). En ese primer muestreo con ese compost se alcanzaron concentraciones de 400 y 514 mg kg<sup>-1</sup> en los suelos NC y AZ respectivamente, y 250 mg kg<sup>-1</sup> en el suelo V en noviembre de 2011. Sin embargo, a lo largo del tiempo estas concentraciones tendieron a disminuir. Por otra parte el tratamiento con BC no produjo ningún efecto en los contenidos de K disponible en ninguno de los tres suelos estudiados.

Por tanto estos resultados muestran que el crecimiento de esta especie no produce un importante empobrecimiento de estos nutrientes del suelo, excepto cierta pérdida de K, reforzando el hecho de que las especies de *Paulownia* pueden ser un cultivo viable no solo en suelos no degradados (NC), sino también en suelos contaminados (AZ y V).

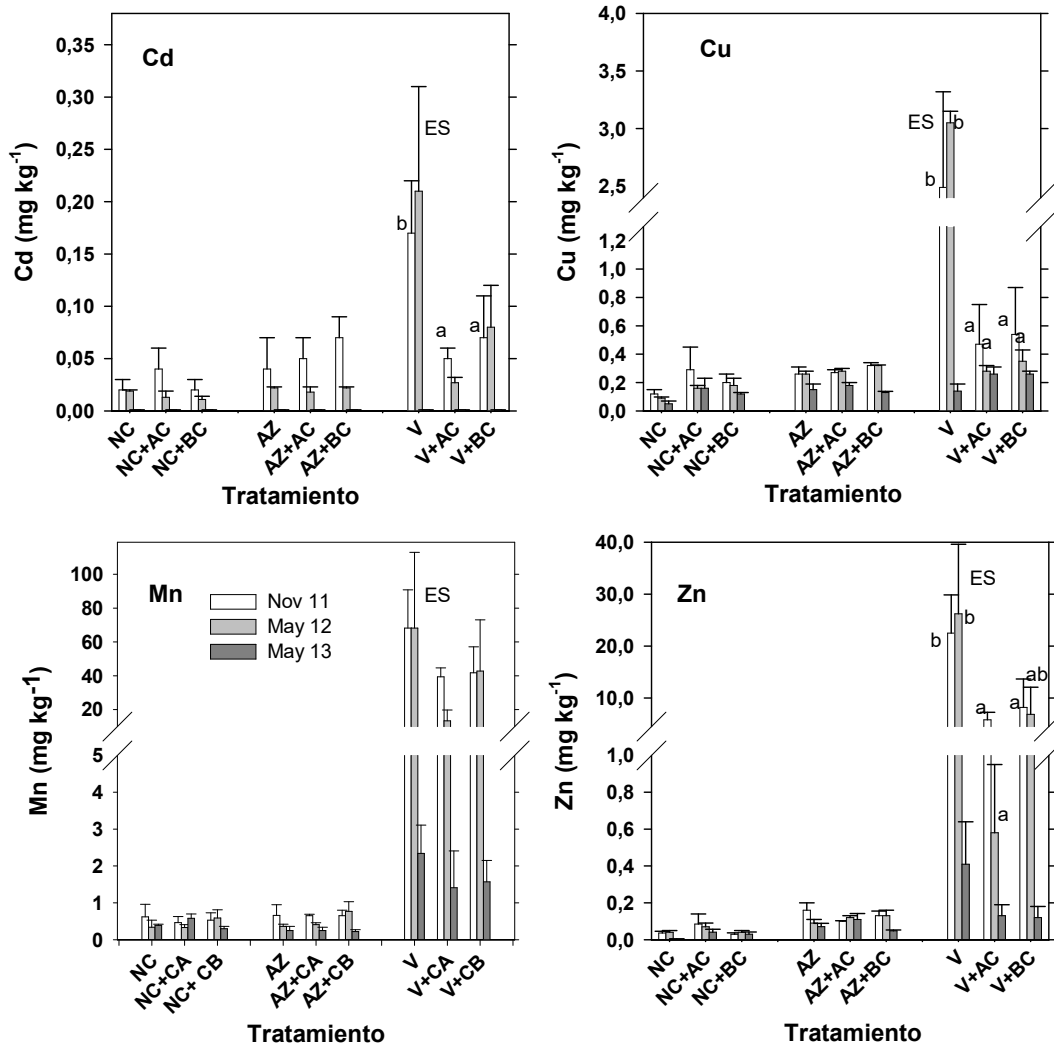
### IV.2.5. Evolución de la disponibilidad de elementos traza de los suelos

En este estudio en contenedores, se ha evaluado la disponibilidad de elementos traza en los suelos mediante dos métodos: 1) la determinación de la concentración de elementos solubles en CaCl<sub>2</sub> 0,01M y 2) la determinación de la concentración de estos metales en el agua de poro del suelo de los contenedores cuando la extracción fue posible.

Los valores de elementos traza disponibles obtenidos con ambos métodos se muestran en las Figuras IV.15 y IV.16. En todos los tratamientos las concentraciones de As y Pb solubles en CaCl<sub>2</sub> 0,01M o en el agua de poro fueron menores que los límites de detección del método empleado (0,01 mg l<sup>-1</sup>; 0,1 mg kg<sup>-1</sup>).

Las concentraciones de Cd, Cu, Mn y Zn disponible (solubles en CaCl<sub>2</sub> 0,01M) fueron en general mucho más altas en el suelo V (ácido, contaminado con elementos traza) que en los otros dos suelos. A pesar de las diferencias entre las concentraciones de elementos traza totales del suelo AZ (suelo contaminado y pH 6,93) y el NC (suelo agrícola no contaminado y pH 7,5) (Tabla III.1) se encontraron pocas diferencias en la disponibilidad de dichos elementos (Figuras IV.15 y IV.16).

En los tres suelos, y en especial en el V, las concentraciones más altas de elementos traza disponibles fueron observadas en el primer muestreo (noviembre de 2011), decreciendo posteriormente con el tiempo en todos los tratamientos. Las diferencias causadas por la aplicación de enmiendas sólo fueron significativas estadísticamente en el suelo V, no observándose efectos significativos de la aplicación



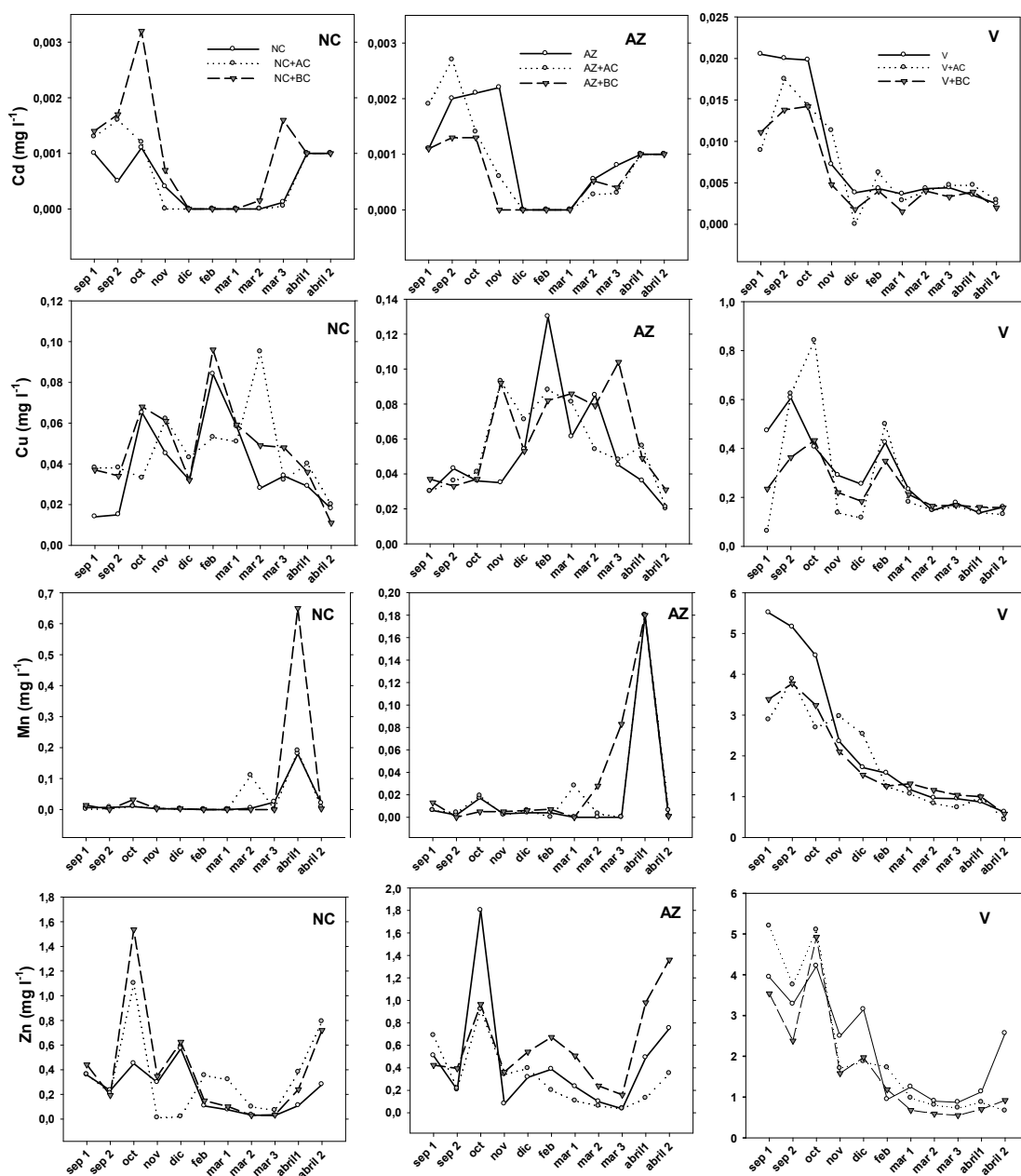
**Figura IV.15.** Evolución de los valores medios ( $\pm$  ES,  $n=3$ ) de Cd, Cu, Mn y Zn solubles en  $\text{CaCl}_2$  0,01M de los suelos. En cada suelo y muestreo, las diferencias significativas debidas a las enmiendas están marcadas con letras distintas (Test de Tukey  $p < 0,05$ ). Los valores medios de Cd en mayo 2013 fueron  $< 0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ .

de enmiendas en los otros dos suelos. Por consiguiente, el efecto más claro de las enmiendas se observó en el suelo ácido V, en el cual tanto la aplicación BC, como de AC redujo notablemente los valores de elementos disponibles en todo el periodo de estudio. Es interesante resaltar que en los tratamientos en los que no se aplicó enmiendas la disponibilidad de los elementos traza también decreció con el tiempo, lo que es atribuible por una parte a la presencia de la planta, que como se ha comentado anteriormente produce aumentos efectos positivos sobre algunas propiedades de los suelos (ver apartados IV.1, IV.2, IV.3 y IV.4) y por otra a la recuperación natural que

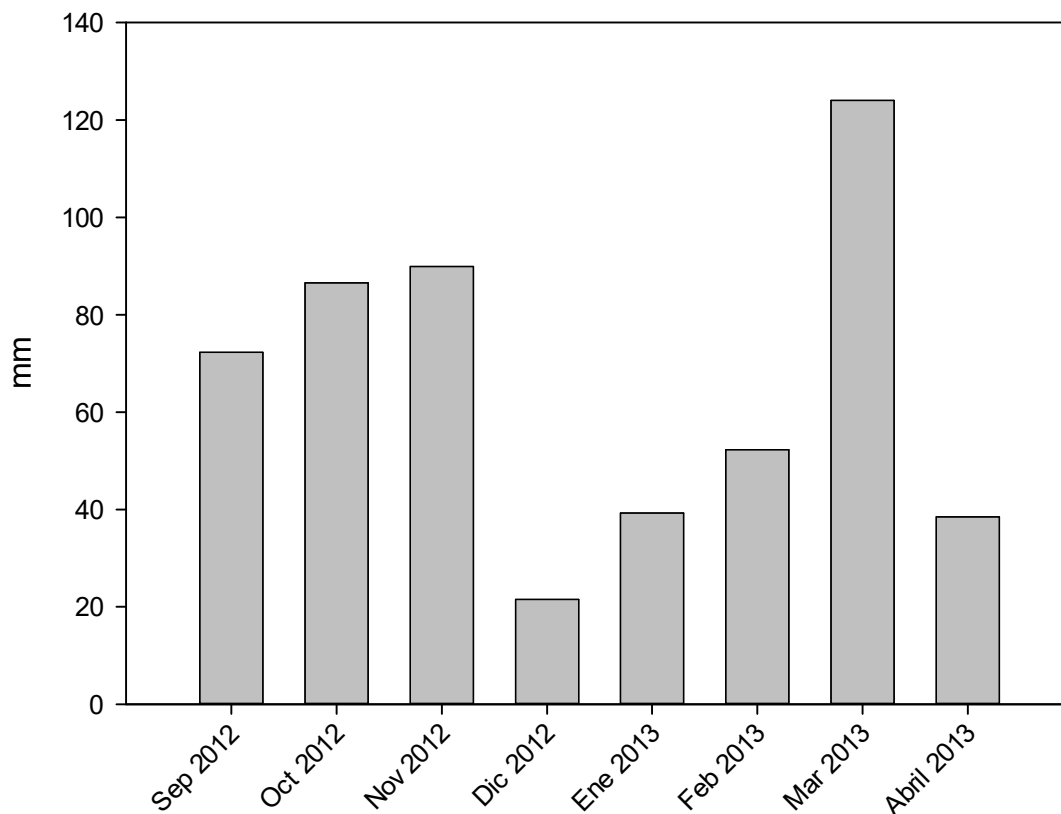
## VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores

experimentan estos suelos, ya observada en el experimento de campo (ver apartados IV.1.5.3, IV.1.7, IV.1.8,2 y IV.1.9).

Los muestreos del agua de poro se realizaron justo después de episodios fuertes de lluvia (Figura IV.17). Los resultados mostraron que las concentraciones de Cd en los suelos neutros (NC y AZ) fueron en general muy bajas ( $<0,003 \text{ mg L}^{-1}$ ). Entre



**Figura IV.16.** Evolución de las concentraciones del Cd, Cu, Mn y Zn en el agua de poro de los suelos de los distintos tratamientos durante el período septiembre 2012 a abril 2013.



**Figura IV. 17.** Precipitaciones durante el período de recolección de agua de poro.

septiembre y octubre de 2012 la aplicación de los composts causó en el suelo NC un aumento de la concentración de Cd respecto al suelo sin enmendar, lo que puede estar relacionado con el contenido de este elemento en los composts. Posteriormente, entre diciembre 2012 y marzo-abril de 2013, la concentración de Cd decreció hasta valores por debajo del límite de detección del método analítico empleado ( $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Finalmente, la concentración de Cd aumentó hasta alcanzar en abril 2012 valores similares a los iniciales. En el suelo AZ la situación fue muy similar, salvo que en el suelo sin enmendar la concentración de Cd se mantuvo más alta que en los enmendados hasta noviembre 2012.

En el suelo ácido V las concentraciones de Cd fueron más altas que en los suelos neutros y los valores en los suelos enmendados más bajos que en el suelo sin enmendar, lo que pone de manifiesto la reducción de la disponibilidad debida a los composts. A partir de octubre 2012 las concentraciones de este elemento disminuyeron hasta

## VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores

alcanzar los valores de alrededor de  $0,004 \text{ mg l}^{-1}$ , que se mantuvieron hasta el final de experimento. La disminución de la concentración de Cd en el suelo sin enmendar es atribuible a la presencia de la planta, así como a la recuperación natural ya comentada anteriormente.

Las enmiendas causaron pequeños aumentos de las concentraciones de Cu en el suelo NC pero no así en el suelo AZ. Entre los meses de octubre 2012 y marzo de 2013 se observaron algunos picos de concentración de Cu atribuibles a periodos post sequía (Figura IV.16). Finalmente las concentraciones de Cu disminuyeron hasta valores muy bajos hacia el final del periodo de recolección de agua de poro. En el suelo ácido V la evolución de este elemento fue diferente y similar a lo observado para el Cd en ese mismo suelo: 1) valores más altos en el periodo inicial hasta octubre 2012 en el que se observó disminución de la concentración en los suelos enmendados; 2) decrecimiento de la concentración de Cu hasta valores muy bajos ( $\sim 0,057 \text{ mg l}^{-1}$ ) al final del experimento.

Los valores de concentración de Mn en las aguas de poro de los suelos neutros desde el principio hasta marzo 2013 fueron muy bajos ( $\sim 0,009 \text{ mg l}^{-1}$ ) para todos los tratamientos. A partir de ese momento se observaron picos de naturaleza espuria (Figura IV.16). En el caso del suelo ácido V, la evolución del Mn disponible fue muy parecida a la observada para el Cd y el Cu: las enmiendas causaron una disminución de la concentración desde el primero de los muestreos, aunque posteriormente la concentración de este elemento disminuyó con el tiempo, tanto en los suelos enmendados como en los sin enmendar.

La evolución del Zn en las aguas de poro en los suelos neutros NC y AZ fue similar, y en el caso del suelo NC, parecida a la descrita para el Cd. En ambos casos destaca el aumento de la concentración a partir de marzo 2013 (Figura IV.16). En el suelo ácido V, la concentración de Zn tendió a disminuir en todos los tratamientos hasta marzo 2013, momento a partir del cual se observó un aumento hasta el final del experimento. En este caso no se observó disminución de la concentración por efecto de las enmiendas.

La estimación de la disponibilidad de Cd, Cu, Mn y Zn mediante las extracciones con  $\text{CaCl}_2$  pone de manifiesto que el uso de enmiendas orgánicas es una medida eficaz para disminuir la disponibilidad de elementos traza especialmente en

suelos ácidos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el experimento de campo (apartado IV.1.5.3). En el presente caso, ambas enmiendas y el desarrollo de plantas, sin olvidar la propia recuperación natural de los suelos, dan lugar al aumento del pH de los suelos y consecuentemente a la disminución de la disponibilidad para las plantas de los elementos estudiados.

La utilización de las concentraciones de Cd, Cu, Mn y Zn en el agua de poro para la estimación de los efectos de las enmiendas en la disponibilidad no proporcionó una información tan clara como la extracción con  $\text{CaCl}_2$ . Este hecho puede explicarse teniendo en cuenta que: 1) las extracciones de agua de poro se hicieron durante la estación lluviosa y 2) mientras que las muestras de suelo para la extracción con  $\text{CaCl}_2$  se tomaron en los 20 primeros cm de suelo, en los que se realizó la aplicación de las enmiendas, las muestras de agua de poro se tomaron en el entorno de la rizosfera, zona más afectada por las propias raíces que por la acción de las enmiendas. Por consiguiente, se puede decir que los resultados obtenidos con la extracción de agua de poro están principalmente relacionados con los cambios causados en el suelo por las raíces, mientras que los de la extracción con  $\text{CaCl}_2$  reflejan el efecto global de las enmiendas y las plantas.

### **IV.2.6. Evolución de las actividades enzimáticas en los suelos**

Los valores medios de las actividades enzimáticas de los suelos en los tres muestreos realizados en los contenedores se muestran en la Tabla IV.8.

En el suelo no contaminado (NC) en ninguno de los muestreos se encontraron diferencias significativas en los valores medios de las actividades enzimáticas entre los tratamientos. En general, en cada tratamiento, los valores de todas las actividades al final son algo mayores que al principio pero la alta variabilidad hace que sólo se encuentren diferencias significativas para la DHA en el tratamiento sin enmienda (NC) y en la ASA en el NC+AC.

En general, en el suelo contaminado neutro (AZ) los valores de las actividades enzimáticas fueron más altos en los suelos enmendados, aunque sólo se encontraron diferencias significativas en el muestreo de mayo de 2012, en el que los valores medios de DHA y APA fueron más altos en los tratamientos AZ+AC y AZ+BC que en el AZ. Como en el caso del suelo NC, en cada tratamiento los valores finales tienden en general a ser más altos que en el primer muestreo, aunque sólo se encontraron diferencias significativas en los valores del tratamiento AZ+BC.

VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores

Tabla IV.8. Valores medios ( $\pm ES$ ,  $n=3$ ) de las actividades de las enzimáticas de los suelos.

Tratamiento	Muestreo	Deshidrogenasa, DHA ( $\mu\text{g INTF g}^{-1}\text{dwh}^{-1}$ )	B-glucosidasa, BGA ( $\mu\text{g PNF g}^{-1}\text{dw h}^{-1}$ )	Aryl-sulfatasa, ASA ( $\mu\text{g PNF g}^{-1}\text{dw h}^{-1}$ )	Fosfatasa Ácida, APA ( $\mu\text{g PNF g}^{-1}\text{dw h}^{-1}$ )	Ureasa, UA ( $\mu\text{g N-NH}_4^+ \text{g}^{-1}\text{dw h}^{-1}$ )
NC	Nov 2011	0,39 $\pm$ 0,09*	71,4 $\pm$ 23,6	13,2 $\pm$ 1,11	311 $\pm$ 40,9	8,90 $\pm$ 2,28
NC+AC		0,68 $\pm$ 0,19	105 $\pm$ 13,3	11,1 $\pm$ 2,36*	403 $\pm$ 28,9	6,48 $\pm$ 1,71
NC+BC		0,98 $\pm$ 0,32	99,8 $\pm$ 18,4	13,01 $\pm$ 2,79	499 $\pm$ 76,7	27,9 $\pm$ 18,7
NC	Mayo 2012	2,14 $\pm$ 0,06	72,5 $\pm$ 25,7	10,2 $\pm$ 4,18	149 $\pm$ 20,2	21,6 $\pm$ 1,08
NC+AC		3,37 $\pm$ 0,81	80,0 $\pm$ 12,8	12,7 $\pm$ 3,18	213 $\pm$ 107	21,07 $\pm$ 1,06
NC+BC		2,89 $\pm$ 0,43	79,6 $\pm$ 3,65	9,09 $\pm$ 1,59	347 $\pm$ 162	22,1 $\pm$ 2,70
NC	Mayo 2013	1,68 $\pm$ 0,35*	102 $\pm$ 12,4	19,8 $\pm$ 7,37	627 $\pm$ 48,5	13,96 $\pm$ 2,66
NC+AC		1,14 $\pm$ 0,26	132 $\pm$ 10,7	22,4 $\pm$ 1,87*	608 $\pm$ 112	26,6 $\pm$ 9,43
NC+BC		1,63 $\pm$ 0,14	126 $\pm$ 23,3	21,2 $\pm$ 5,53	657 $\pm$ 61,7	20,4 $\pm$ 1,71
AZ	Nov 2011	1,19 $\pm$ 0,13	337 $\pm$ 10,5	52,9 $\pm$ 3,03	1979 $\pm$ 130	21,0 $\pm$ 4,77
AZ+AC		1,20 $\pm$ 0,14	339 $\pm$ 27,8	39,3 $\pm$ 5,50	1652 $\pm$ 122	21,0 $\pm$ 1,28
AZ+BC		1,39 $\pm$ 0,12*	300 $\pm$ 33,4	55,5 $\pm$ 6,71	1933 $\pm$ 98,7*	28,5 $\pm$ 10,7
AZ	Mayo 2012	3,83 $\pm$ 0,33 a	283 $\pm$ 34,5	31,1 $\pm$ 2,55	691 $\pm$ 18,9 a	31,1 $\pm$ 1,90
AZ+AC		4,73 $\pm$ 0,30 ab	185 $\pm$ 5,28	34,5 $\pm$ 4,83	900 $\pm$ 48,7 b	24,61 $\pm$ 2,54
AZ+BC		5,31 $\pm$ 0,30 b	273 $\pm$ 38,0	41,9 $\pm$ 1,50	859 $\pm$ 22,2 b	33,5 $\pm$ 1,85
AZ	Mayo 2013	2,29 $\pm$ 0,48	297 $\pm$ 39,6	55,0 $\pm$ 19,1	1194 $\pm$ 102	44,2 $\pm$ 21,0
AZ+AC		2,36 $\pm$ 0,58	255 $\pm$ 44,7	44,0 $\pm$ 4,64	1044 $\pm$ 103	33 $\pm$ 2,91
AZ+BC		2,49 $\pm$ 0,25*	389 $\pm$ 19,2	78,9 $\pm$ 9,06	1313 $\pm$ 20,9*	41,4 $\pm$ 3,55
V	Nov 2011	0,37 $\pm$ 0,17	34,5 $\pm$ 10,1	8,77 $\pm$ 0,85	502 $\pm$ 156	2,91 $\pm$ 2,91
V+AC		0,14 $\pm$ 0,09	15,6 $\pm$ 15,6	8,86 $\pm$ 2,02	465 $\pm$ 132	0
V+BC		0,10 $\pm$ 0,04*	8,60 $\pm$ 4,38	14,2 $\pm$ 2,61	723 $\pm$ 140	8,71 $\pm$ 5,07
V	Mayo 2012	0,15 $\pm$ 0,11 a	14,9 $\pm$ 8,35	0,92 $\pm$ 0,80 a	1037 $\pm$ 260	6,52 $\pm$ 6,52
V+AC		2,62 $\pm$ 0,33 b	14,4 $\pm$ 3,44	6,02 $\pm$ 0,65 b	1098 $\pm$ 83,3	9,26 $\pm$ 0,74
V+BC		2,42 $\pm$ 0,85 b	12,6 $\pm$ 3,32	3,30 $\pm$ 0,42 ab	1169 $\pm$ 83,3	8,82 $\pm$ 2,70
V	Mayo 2013	1,57 $\pm$ 0,63	43,9 $\pm$ 19,1	5,33 $\pm$ 2,28	641 $\pm$ 69,4	6,45 $\pm$ 0,96
V+AC		2,49 $\pm$ 0,61	66,1 $\pm$ 11,9	12,1 $\pm$ 2,33	946 $\pm$ 184	24,9 $\pm$ 4,44
V+BC		1,90 $\pm$ 0,39*	49,5 $\pm$ 21,6	22,3 $\pm$ 3,67	722 $\pm$ 34,1	13,5 $\pm$ 1,91

En cada suelo y muestreo, las diferencias significativas debidas a las enmiendas están marcadas con distintas letras (test de Tukey  $p < 0,05$ ).

En cada suelo \* indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre resultados en cada tratamiento del primer y último muestreo.



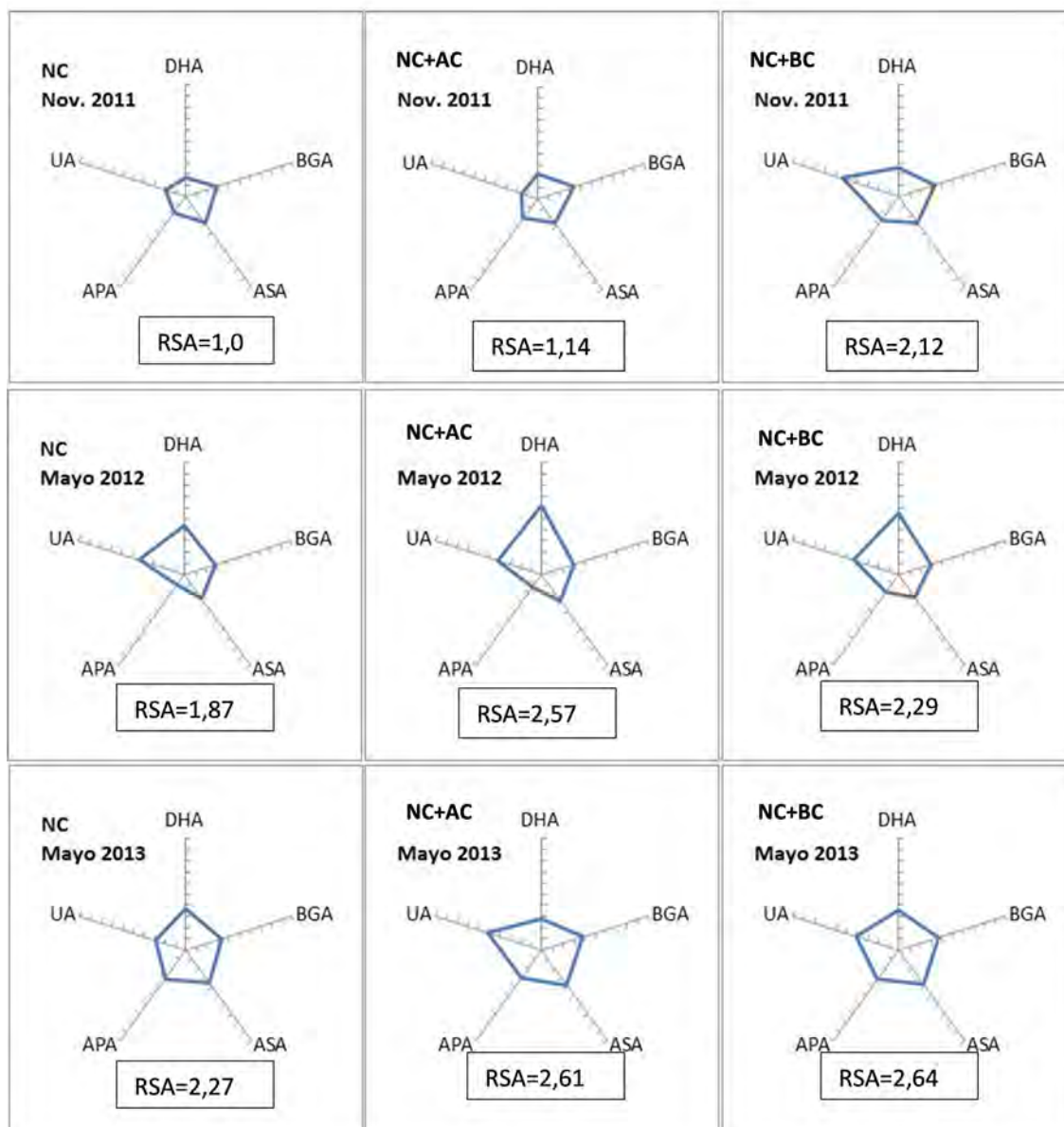
En el suelo contaminado ácido (V), la aplicación de enmienda no tiene una influencia clara sobre los valores medios de las actividades enzimáticas estudiadas: unas veces aumentan y otras disminuyen, aunque en ningún caso las diferencias fueron significativas. En el primer muestreo se obtuvieron resultados un tanto anómalos y la presencia de las enmiendas no causó ningún efecto positivo destacable en el estatus bioquímico del suelo. En cada tratamiento los valores finales fueron generalmente más altos que en el primer muestreo, pero sólo significativamente en el tratamiento V+BC.

Si se comparan los valores de las actividades enzimáticas de los tres suelos, se observa que en general los valores más altos siguen la tendencia: AZ>NC>V, relacionada con la fertilidad original de estos suelos.

Como en el caso del experimento de campo (apartado IV.1.8.2) se han construido las figuras poligonales resultantes de los diagramas de Rayos de Sol y calculado sus áreas superficiales, obtenidas con los valores medios estandarizados de las actividades enzimáticas analizadas, que son características de cada suelo y de cada tratamiento. El área superficial de cada polígono es una medida relacionada con la fertilidad bioquímica del suelo. En cada suelo la variación de los valores de dichas actividades debidas al tiempo y a la aplicación de enmiendas puede evaluarse mediante el área superficial relativa (RSA) respecto a los tratamientos sin enmiendas.

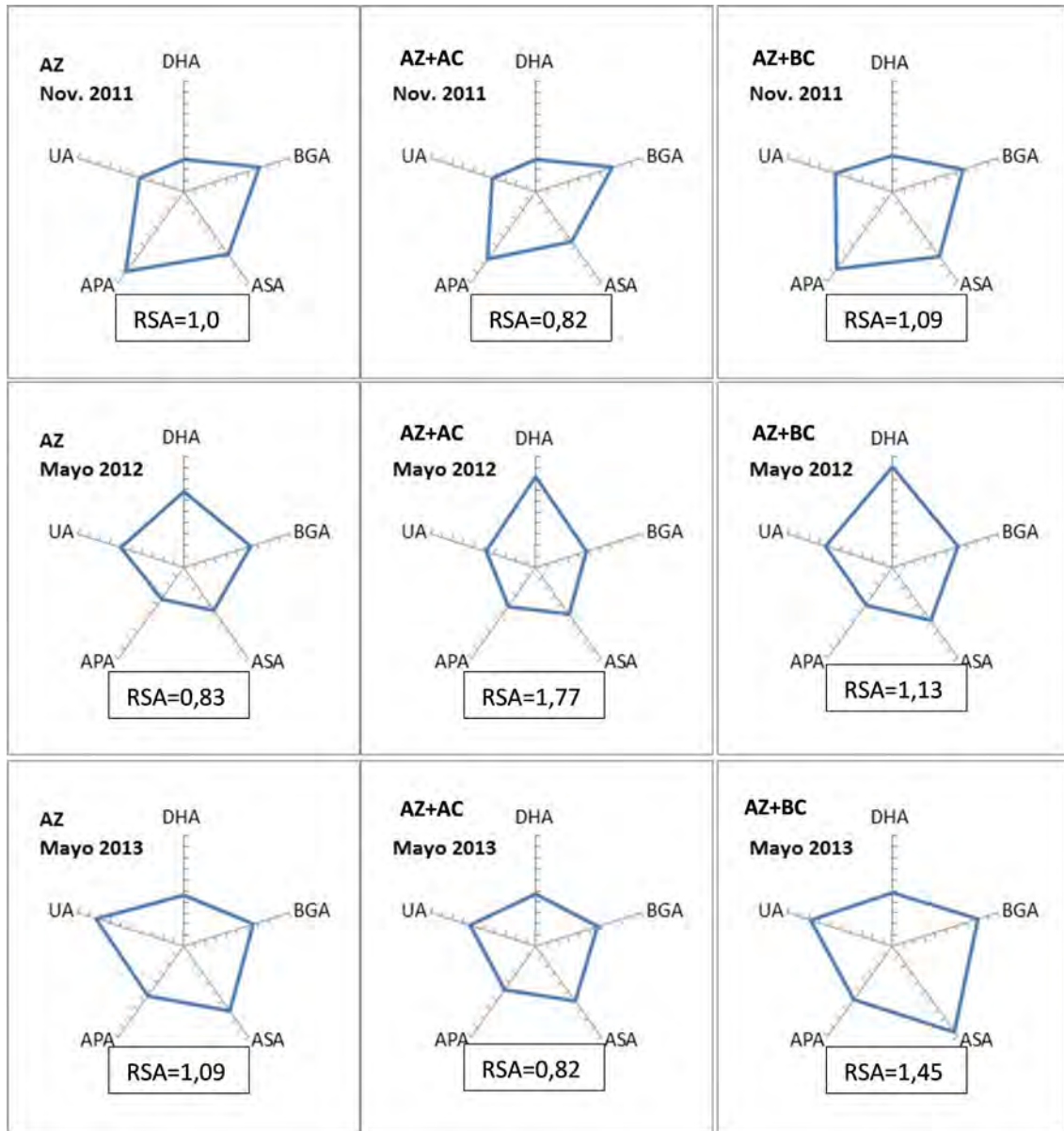
En la Figura IV.18, IV.19 y IV.20 se observa que los valores de RSA en los tres suelos aumentan generalmente con la aplicación de enmiendas. Asimismo, en cada suelo se observan aumentos con el tiempo de los valores de RSA de cada tratamiento, obteniéndose los valores más altos en el último muestreo (mayo 2013). Es interesante observar que en los tres suelos los valores de RSA en todos los tratamientos aumentan desde el primer muestreo al último. En el caso de los tratamientos sin aplicación de enmienda (NC, AZ y V) este aumento está relacionado con la influencia positiva de la planta sobre la fertilidad bioquímica de los suelos, debido a la excreción por las raíces de una serie de sustancias (v.gr.: ácidos acético, oxálico, fumárico, cítrico, tartárico, polisacáridos, etc.) que aumentan la actividad microbiológica en la rizosfera. Las raíces constituyen no sólo un refugio para los microorganismos, sino también una fuente de C lábil, mediante la liberación de compuestos orgánicos en los exudados radiculares (Martin y Merckx, 1992).

VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores



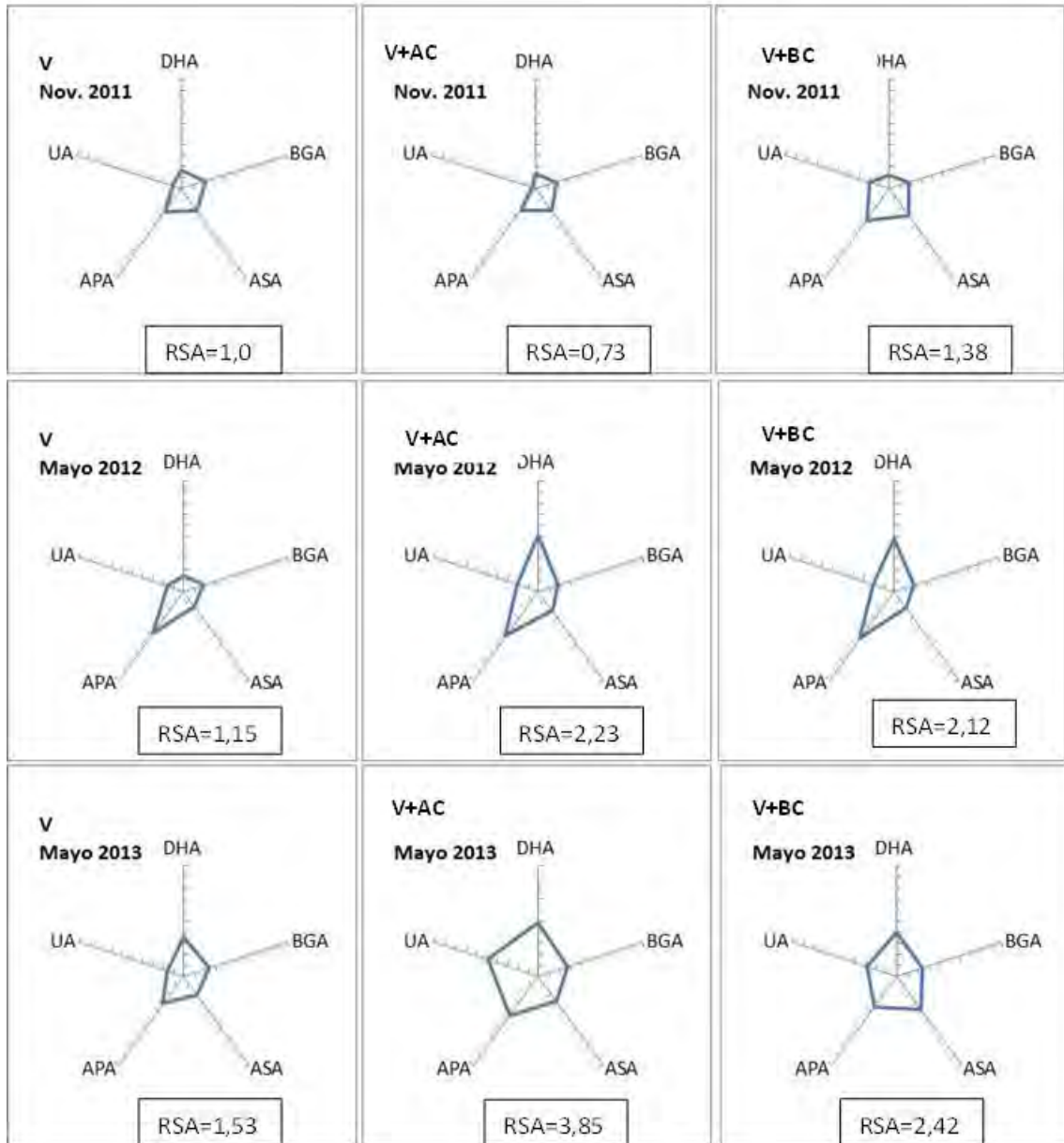
**Figura IV. 18.** Diagramas de Rayos de Sol contruidos con los valores medios estandarizados de las actividades enzimáticas: DHA, BGA, APA, ASA y UA del suelo NC. RSA, son los valores de las áreas superficiales relativas.

VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores



**Figura IV. 19.** Diagramas de Rayos de Sol contruidos con los valores medios estandarizados de las actividades enzimáticas: DHA, BGA, APA, ASA y UA del suelo AZ. RSA, son los valores de las áreas superficiales relativas.

VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores



**Figura IV. 20.** Diagramas de Rayos de Sol contruidos con los valores medios estandarizados de las actividades enzimáticas: DHA, BGA, APA, ASA y UA del suelo V. RSA, son los valores de las áreas superficiales relativas.

En esas mismas figuras puede observarse que la fertilidad en los suelos de partida sin enmiendas es mayor en el suelo contaminado neutro AZ: 7 veces mayor que el neutro no contaminado NC y 8 veces superior que el suelo ácido contaminado V. Al final del experimento la situación es ligeramente distinta con valores de AZ 3 y 6 veces superiores que los correspondientes a NC y V respectivamente. Los valores más altos de fertilidad bioquímica del suelo AZ se deben probablemente a sus mejores características físico-químicas (pH neutro, baja salinidad, relativamente altos niveles de fertilidad y baja disponibilidad de contaminantes). Ciadamidaro et al. (2014b) encontraron resultados similares en suelos bajo cultivo de álamo, poniéndose de manifiesto el mejor estado bioquímico en suelos contaminados y neutros que presentaban baja biodisponibilidad de elementos traza. Probablemente en este suelo las poblaciones microbianas se ven poco afectadas por las cantidades de metales pseudo-totales.

### **IV.2.7. Efectos de las enmiendas sobre la planta de Paulownia**

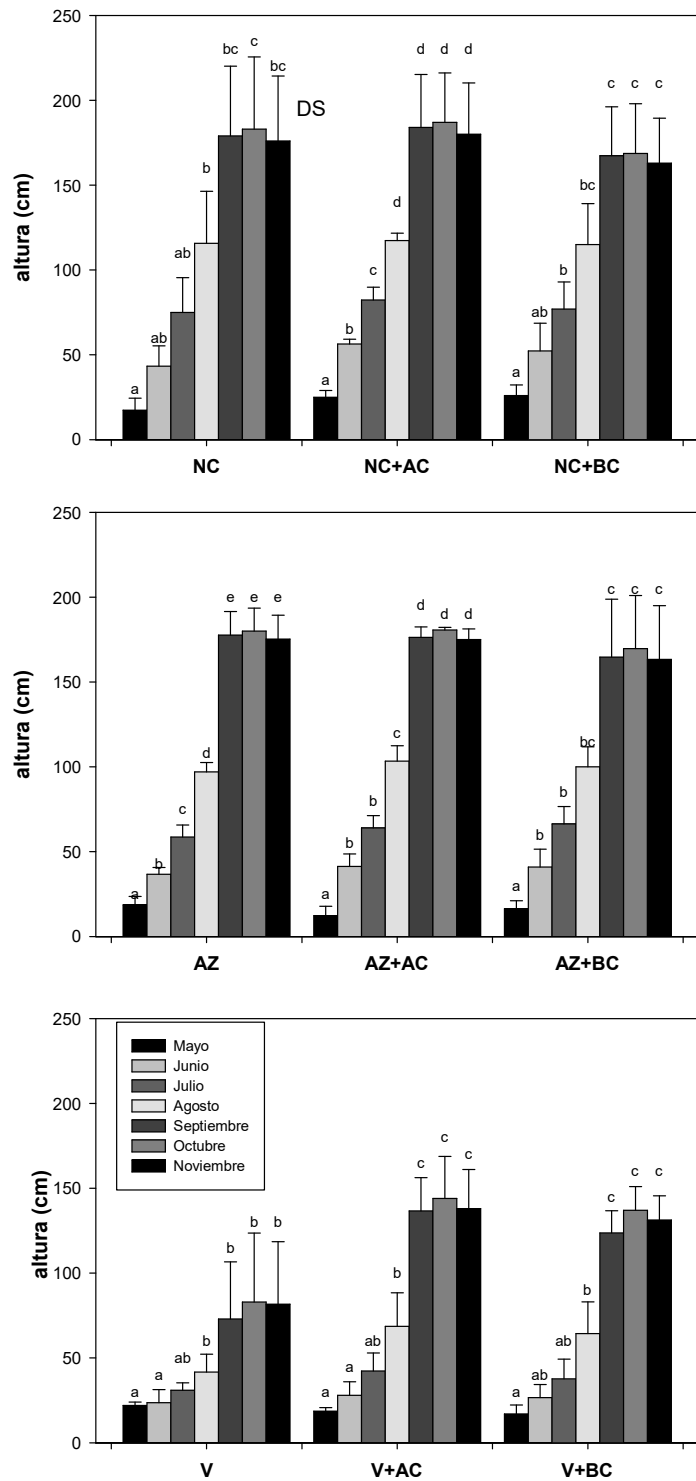
#### *IV.2.7.1. Efectos sobre el crecimiento vegetal*

El crecimiento de Paulownia se ha medido mensualmente teniendo en cuenta altura y diámetro en cada uno de los dos ciclos de crecimiento estudiados (el segundo después del corte de marzo 2013).

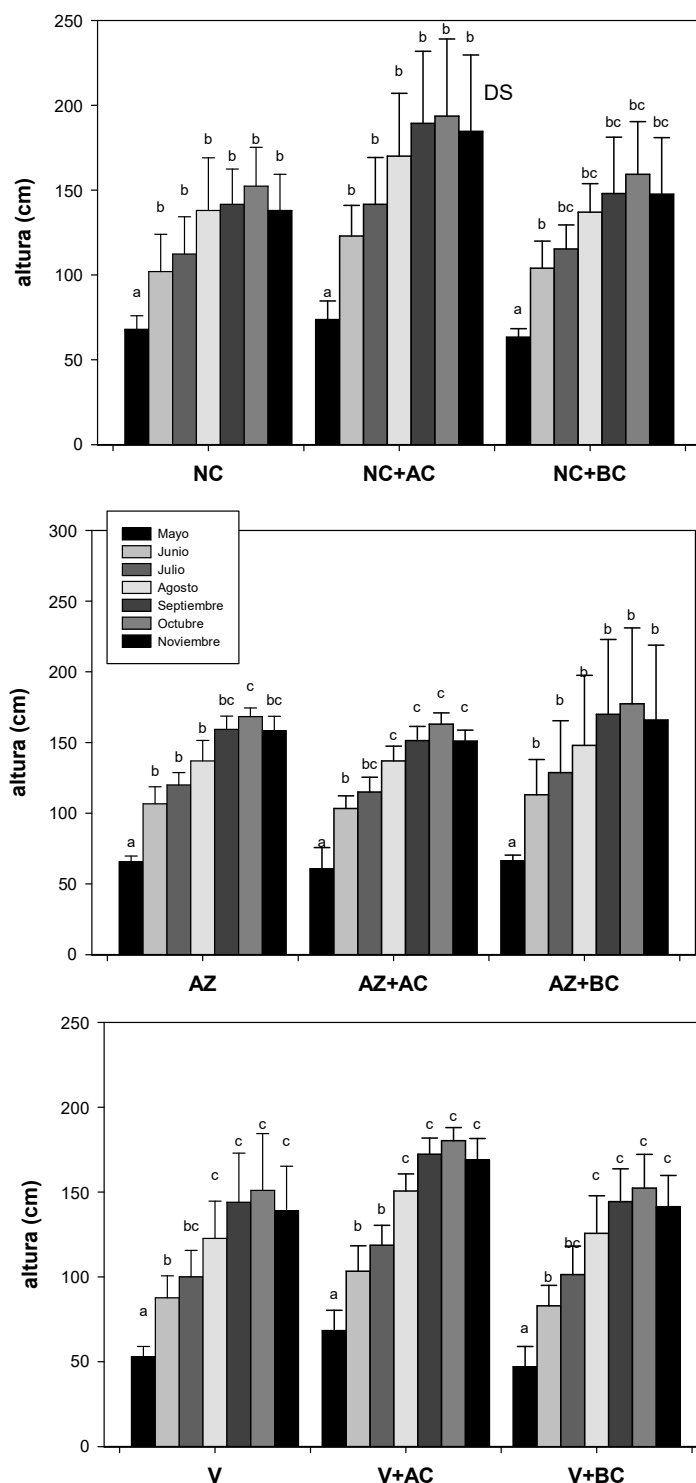
Las Figuras IV.21 y IV.22 muestran la evolución de las alturas de las plantas de Paulownia en cada suelo y tratamiento durante los dos ciclos. En todos los casos se observa que las alturas de las plantas aumentan paulatinamente de mayo a agosto y durante los tres siguientes meses el crecimiento se estanca.

Cuando se estudia la evolución de las alturas en conjunto durante el primer ciclo (2012, Figura IV.23) se observan valores medios más altos en el suelo no contaminado enmendado con AC. Durante el mes de mayo (2 meses después de ser plantada) no se apreciaron diferencias significativas de altura en ninguno de los tratamientos, no superando la altura los 26 cm. En junio se observaron diferencias significativas de altura en función del suelo y del tratamiento; el valor máximo fue de unos 50 cm en suelo NC+AC. En general los valores del suelo AZ fueron algo más bajos que en el NC aunque las diferencias no fueron significativas. Los valores en el suelo V (suelo contaminado y ácido) fueron mucho más bajos que en los otros dos a pesar de los aumentos observados con las enmiendas (Fotografía IV.2). Esta misma pauta es la que se observa durante los meses siguientes. En septiembre todas las plantas de todos los suelos experimentaron un notable aumento de altura que se mantuvo hasta noviembre (Figura IV.21)

VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores



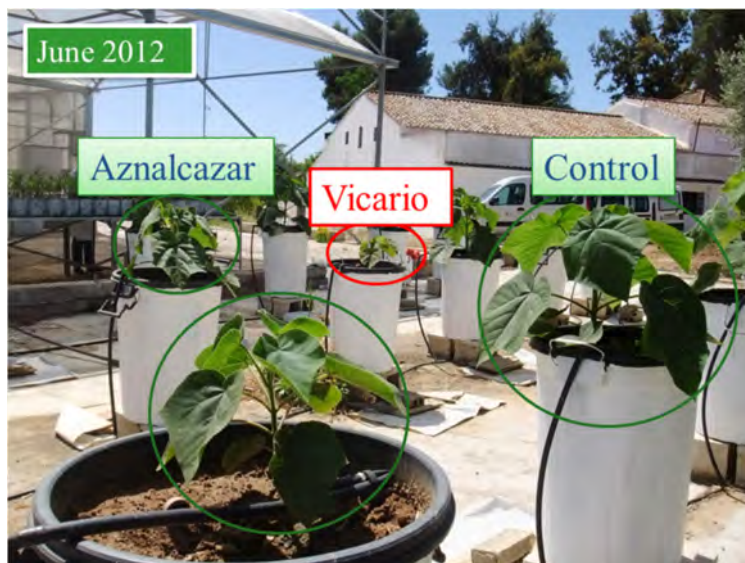
**Figura IV.21.** Evolución de los valores medios ( $\pm$ DS) de las alturas de las plantas de *Paulownia* en cada suelo en 2012. En cada suelo y tratamiento, las diferencias significativas debidas a la evolución con el tiempo están marcadas con distintas letras (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).



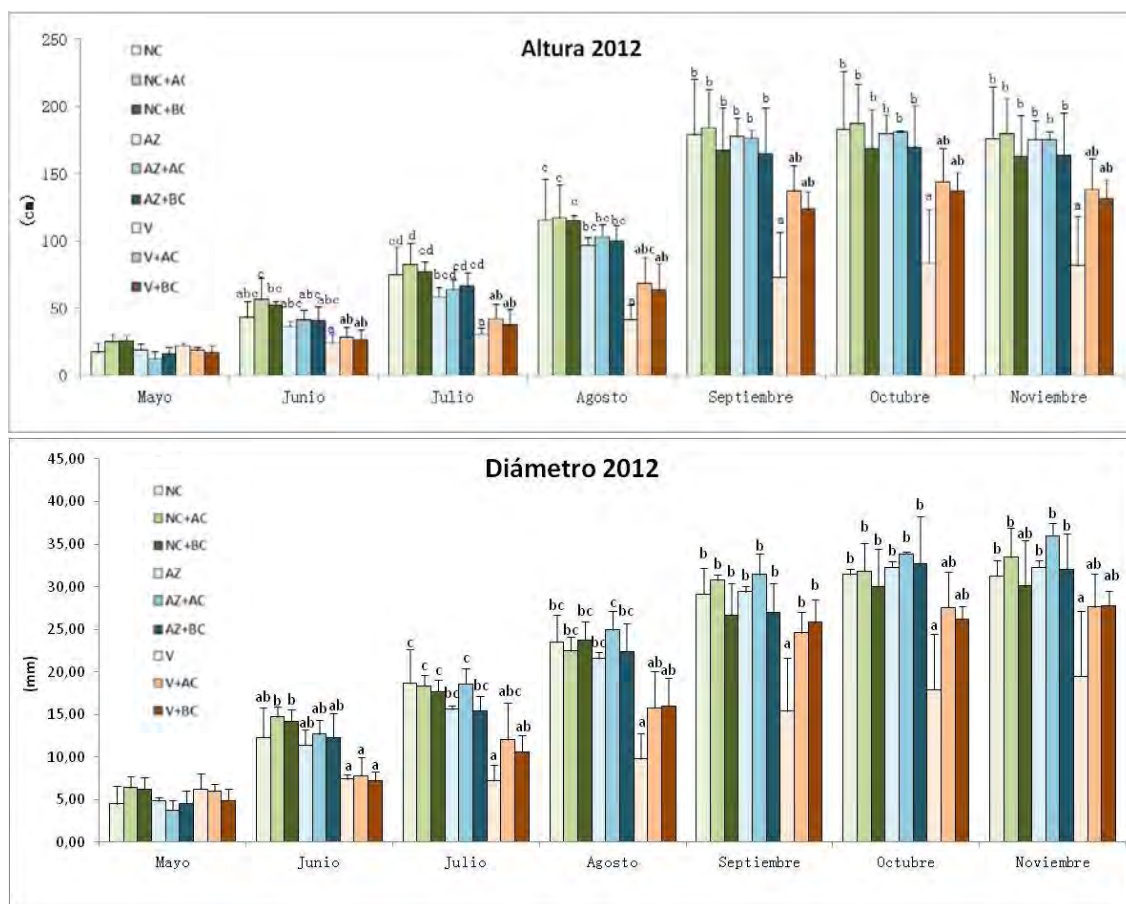
**Figura IV.22.** Evolución de los valores medios ( $\pm$ DS) de las alturas de las plantas de *Paulownia* en cada suelo en 2013. En cada suelo y tratamiento, las diferencias significativas debidas a la evolución con el tiempo están marcadas con distintas letras (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).



## VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores

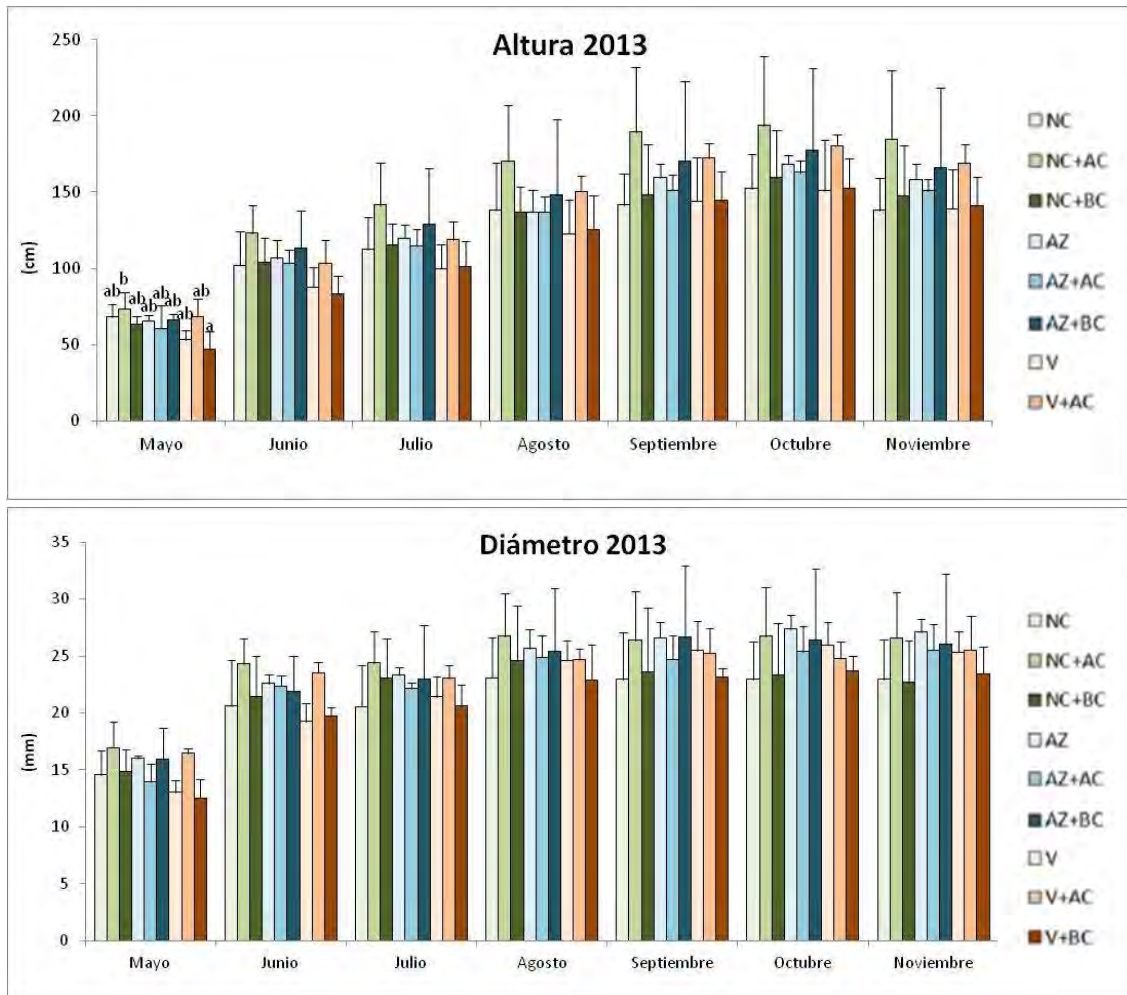


**Fotografía IV.2.** Plantas de *Paulownia* seis meses después de la plantación.



**Figura IV.23.** Evolución de los valores medios ( $\pm$ DS) y comparación de las alturas y diámetro de tronco de las plantas de *Paulownia* en los tres suelos en los tres tratamientos en 2012. En los valores de cada mes, las diferencias significativas debidas a los suelos y tratamientos están marcadas con distintas letras (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).





**Figura IV.24.** Evolución de los valores medios ( $\pm DS$ ) y comparación de las alturas y diámetro de tronco de las plantas de Paulownia en los tres suelos en los tres tratamientos en 2013. En los valores de cada mes, las diferencias significativas debidas a los suelos y tratamientos están marcadas con distintas letras (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).

## VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores

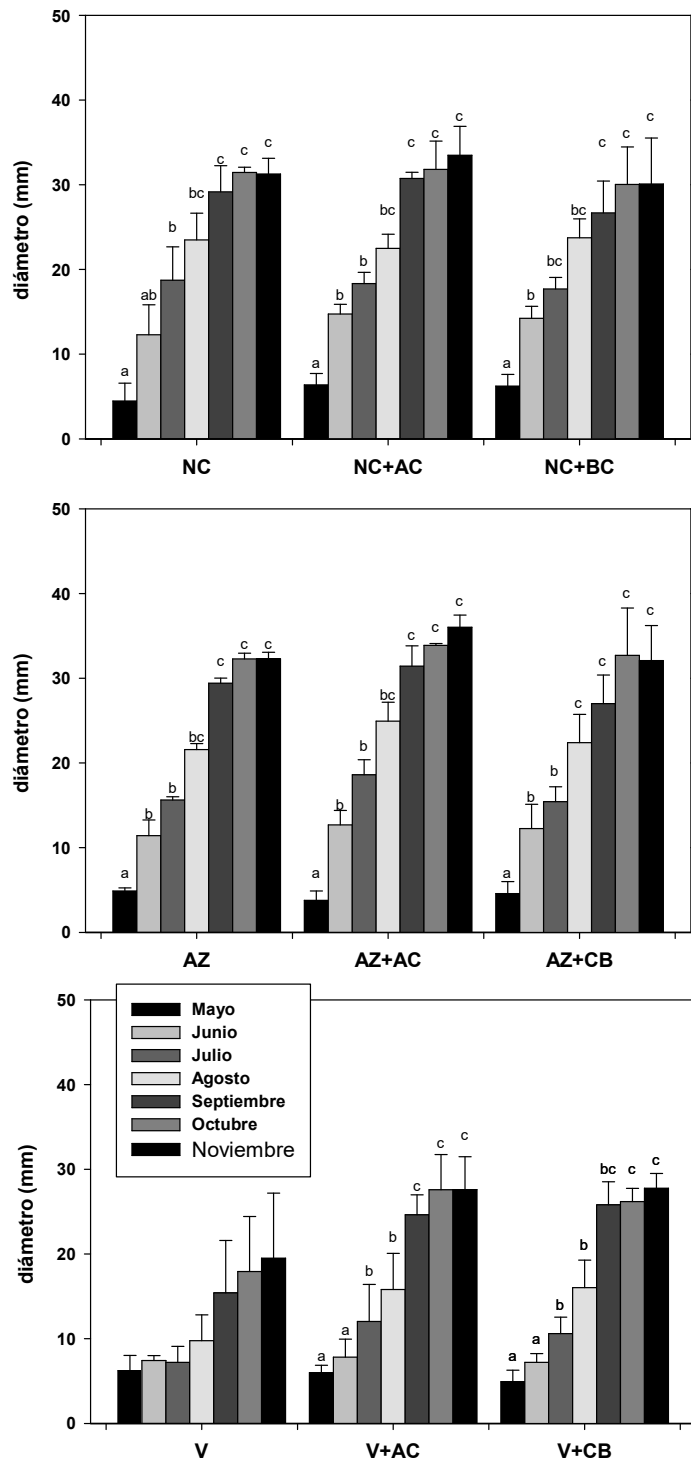
Al final del ciclo los valores de los suelos NC y AZ fueron muy similares, aunque siempre los de NC fueron mayores que los de AZ, y en cada suelo los valores del tratamiento BC resultaron los más bajos. El valor más alto (180 cm) correspondió al tratamiento NC+AC. Los valores del suelo V fueron mucho más bajos que en los otros dos, destacando el bajo valor en el suelo V sin tratar (81,7 cm), un 50% de los correspondientes en los suelos NC y AZ; en los tratamientos (V+AC y V+BC las alturas fueron 1,7 veces más altas que en el V.

En general en el rebrote (segundo ciclo 2013) no se aprecian diferencias significativas en las alturas de las plantas, excepto en mayo (Figura IV.24). En mayo, las medidas de altura partieron de un valor superior a los de 2012 (valor medio 63 cm), observándose el valor significativamente más alto en el tratamiento NA+AC (74 cm) y el más bajo en el V+BC (47 cm). En general todos los valores aumentan paulatinamente hasta alcanza valores máximos a partir de septiembre (Figura IV.24). Una observación interesante es que en los suelos NC y V los valores mensuales más altos son los correspondientes a los tratamientos con AC, siendo los valores del tratamiento NC+AC los más altos durante todo el período estudiado (185 cm en noviembre); en ambos suelos los valores de los otros dos tratamientos, sin enmienda y con BC, fueron más bajos y muy similares. En el suelo AZ, en cambio, los valores más altos fueron los del tratamiento BC, mientras que los del tratamiento sin enmienda y con AC fueron más bajos y muy similares. De cualquier forma, hay que tener en cuenta que a partir de mayo no se encontró significación estadística en los muestreos mensuales debido a la gran variabilidad de los resultados.

Las Figuras IV.25 y 26 muestran la evolución de los diámetros de la plantas de Paulownia en cada suelo y tratamiento durante los dos ciclos. En el primer ciclo (2012, Figura IV.25) en todos los casos se los diámetros del tronco de las plantas aumentan paulatinamente durante todo el período, observándose en cada suelo y tratamiento diferencias significativas entre muestreos. En el segundo ciclo (2013, Figura IV.26), los aumentos durante el período estudiado son en general menos pronunciados que en el caso anterior.

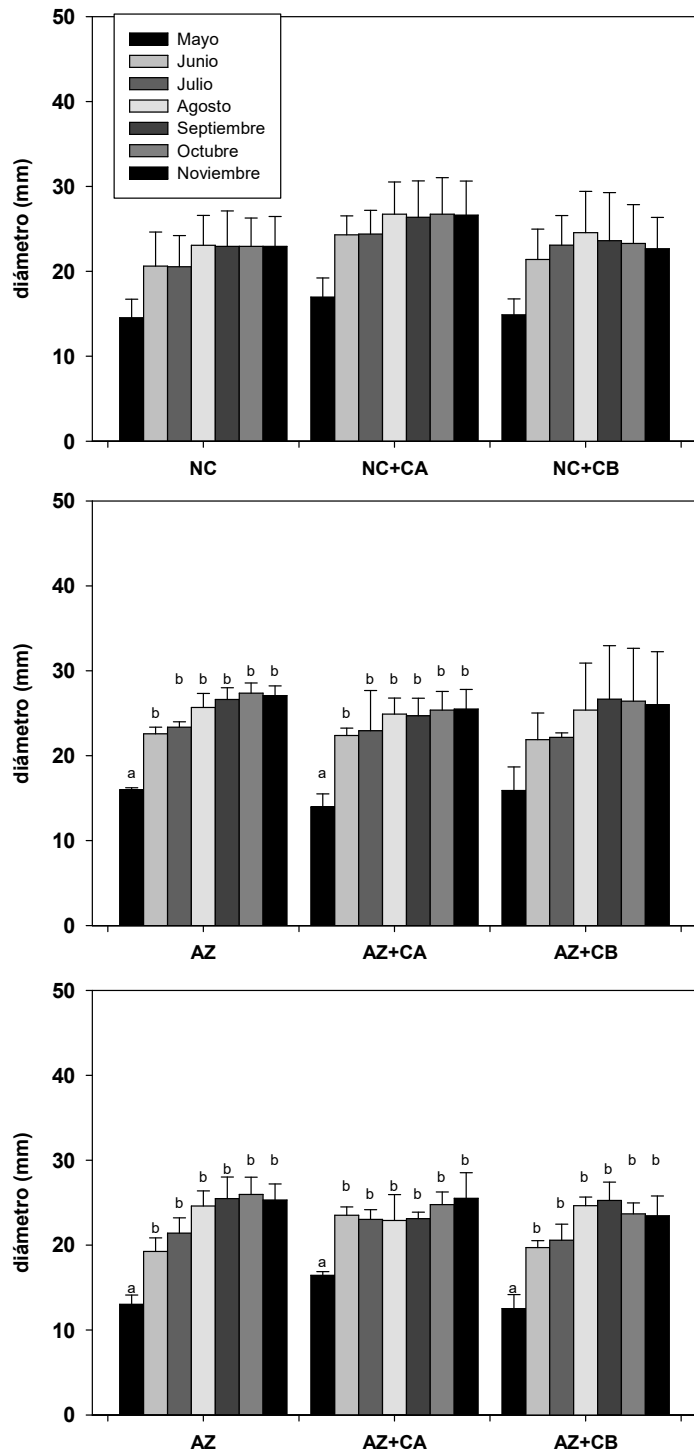
Las medidas de diámetro del tronco presentan diferencias claras entre los dos ciclos de estudio. En el primer ciclo (2012, Figura IV.23) los valores del muestreo de mayo no presentan diferencias significativas y se sitúa alrededor de los 5 cm. Todos los valores aumentaron durante este ciclo, como se observa en la Figura IV.25. El diámetro

VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores



**Figura IV.25.** Valores medios ( $\pm DS$ ) de los diámetros de las plantas de Paulownia en 2012. En cada suelo y tratamiento, las diferencias significativas debidas a la evolución con el tiempo están marcadas con distintas letras (Test de Tukey  $p < 0,05$ ).

VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores



**Figura IV.26.** Valores medios ( $\pm DS$ ) de los diámetros de las plantas de Paulownia en 2013. En cada suelo y tratamiento, las diferencias significativas debidas a la evolución con el tiempo están marcadas con distintas letras (Test de Tukey  $p < 0,05$ )

de las plantas del tratamiento V fueron siempre los más bajos, seguidos de V+BC y V+AC, así en el muestreo de noviembre los diámetros las plantas creciendo en suelos NC y AZ presentaron valores comprendidos entre 30 y 36 mm, mientras que en las de V oscilaron entre 19,5 y 20 mm.

En el segundo ciclo, correspondiente al rebrote, se partió de diámetros mayores (valor medio 15 mm en mayo) que en el ciclo anterior (Figura IV.24), que fueron creciendo hasta estabilizarse, en casi todos los casos a partir de agosto (Figura IV.26). En el mes de junio, se experimentó el mayor engrosamiento, situándose el diámetro en un valor medio de 22 mm, que aumenta en agosto a 25 mm y así se mantiene hasta noviembre. Quizás lo más interesante es que en los muestreos mensuales no se encontraron diferencias significativas, al final del segundo ciclo (noviembre 2013) por tanto no se encontraron diferencia significativas entre los suelos, ni efectos de las enmiendas en ninguno de los tres suelos.

#### IV.2.7.2. Efectos en la producción de biomasa

En las dos cosechas realizadas los valores de producción de biomasa de Paulownia, expresada como la biomasa seca, no superó los 300 g por contenedor en ningún suelo o tratamiento (Tabla IV.9). Estos bajos valores indican que se trata de una madera ligera

**Tabla IV.9.** Resultado del ANOVA de la biomasa seca de Paulownia en los suelos de los distintos tratamientos ( $n=3$ ). Valores medios y error standard ( $g \pm ES$ )

Muestreo	Tratamiento	Suelo NC	Suelo AZ	Suelo V
<b>Marzo 2013</b>	-	136 $\pm$ 16	144 $\pm$ 5,9	39 $\pm$ 17 a
	AC	148 $\pm$ 18	146 $\pm$ 0,2	92 $\pm$ 14 b
	BC	137 $\pm$ 16	152 $\pm$ 20	102 $\pm$ 14 b
<b>(gl=8) p</b>		0,642	0,713	0,045
		<i>dns</i>	<i>dns</i>	-
<b>Octubre 2013</b>	-	167 $\pm$ 7	174 $\pm$ 2 a	139 $\pm$ 20 a
	AC	194 $\pm$ 33	200 $\pm$ 22 ab	186 $\pm$ 2,5 ab
	BC	194 $\pm$ 12	261 $\pm$ 39 b	205 $\pm$ 33 b
<b>(gl=8) p</b>		0,258	0,015	0,027
		<i>dns</i>	-	-

*p*, probabilidad; *gl*, grados de libertad; *dns*, diferencias no significativas

En cada suelo. Los valores con distinta letra difieren significativamente (test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

de baja densidad de la biomasa de acuerdo con Akyildiz et al. (2010). En general, en la primera cosecha (marzo 2013) la biomasa fue menor que en la segunda (octubre 2013). Después de la primera cosecha, los brotes se produjeron de manera espontánea y más vigorosamente en la primavera siguiente. Esta capacidad de volver a crecer más

## VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores

vigorosamente es típico de especies de crecimiento rápido (Gurvich et al., 2005) y explica la mejor producción obtenida en la segunda cosecha.

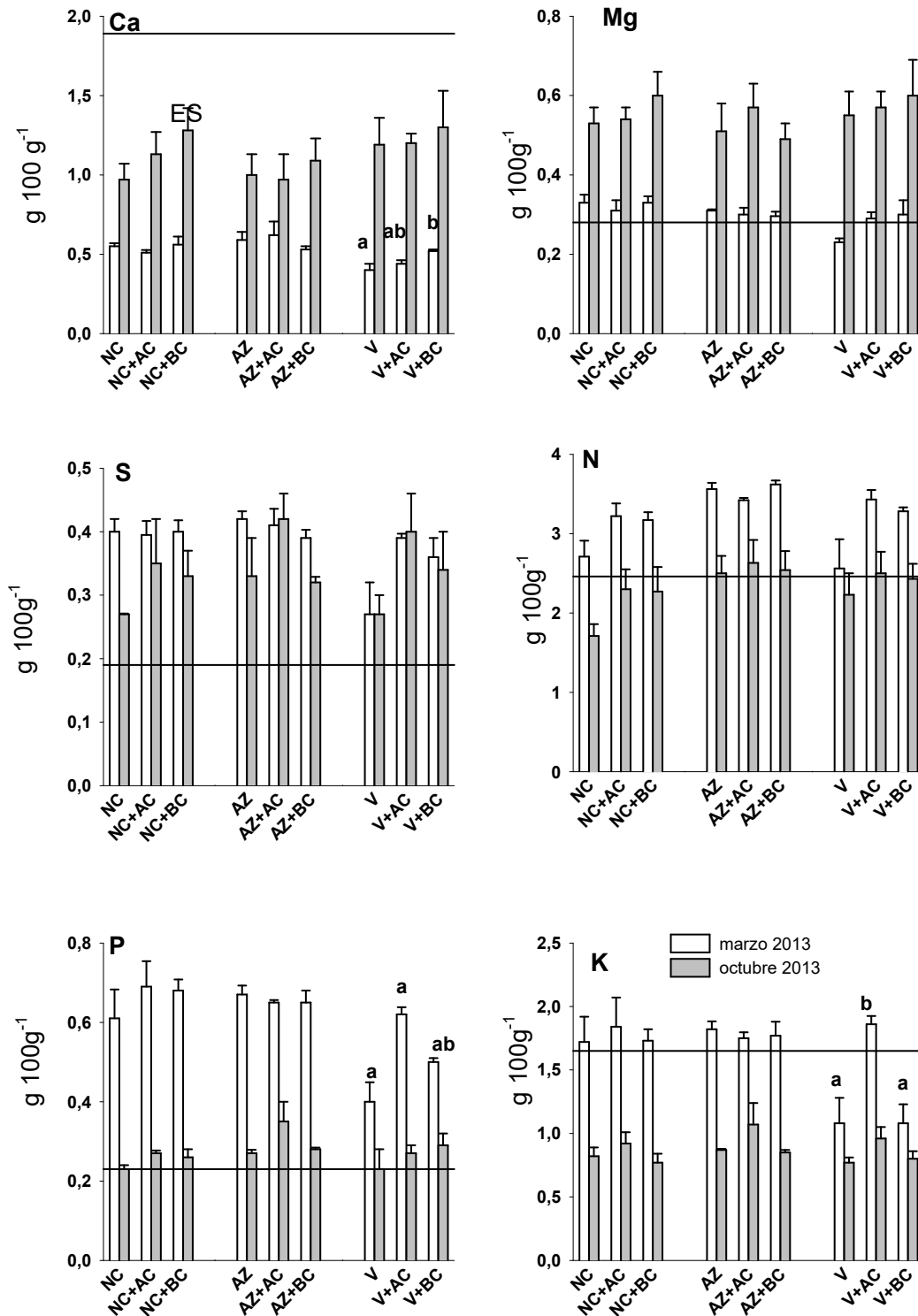
La aplicación de enmiendas tuvo un efecto positivo en la producción de biomasa aunque no siempre significativo estadísticamente (Tabla IV.9). Así, en la primera cosecha (marzo 2013) el aumento debido a las enmiendas sólo fue significativo en el suelo V, suelo en el que se obtuvieron los valores más bajos de biomasa, lo que está de acuerdo con las alturas y diámetros del primer corte (Figura IV.23), y en el que fue fundamental la adición de enmiendas para aumentar la biomasa.

En el segundo corte, los efectos positivos de las enmiendas sobre la producción de biomasa se hicieron más evidentes, sobre todo en los suelos contaminados con elementos traza, AZ y V. La aplicación de AC dio lugar a aumentos medios del 15% en el suelo no contaminado NC y del 16% en el AZ, en comparación con sus correspondientes suelos no enmendados. Para el tratamiento de compost de biosólidos (BC), los aumentos medios fueron del 16% en el suelo NC y el 50% en el suelo AZ.

En el suelo ácido V la aplicación de las enmiendas dio lugar a aumentos en la producción de biomasa de 34% y 47%, para AC y BC respectivamente. El análisis de la varianza de la biomasa obtenida en cada suelo, tanto con la enmienda AC, como con la BC mostró que no había diferencias significativas en ninguno de los dos casos ( $p=0,764$  y  $p=0,071$  respectivamente). Por consiguiente, la aplicación de enmiendas a este suelo contaminado y ácido (V), produjo valores de biomasa similares a la de los otros suelos, demostrando los beneficios de las enmiendas en este suelo degradado, que ya se puso de manifiesto al estudiar sus propiedades químicas y bioquímicas que mejoraron notablemente con las enmiendas (ver apartados IV.2.1 al IV.2.6). Otros autores también han obtenido resultados similares en diferentes experimentos con enmiendas (Park et al., 2011), señalando los beneficios para la productividad de la planta de la adición al suelos de material orgánico de calidad. Estos resultados son especialmente importantes porque permiten la utilización de suelos contaminados y degradados para este tipo de plantaciones y similares, no utilizables con fines alimentarios.

### *IV.2.7.3. Nutrientes en hojas*

En general en el muestreo de mayo 2013, las concentraciones de macronutrientes en las hojas de *Paulownia* fueron muy similares en los tres suelos (con y sin enmienda), aunque ligeramente más bajas en el suelo V (Figura IV.27). En este muestreo sólo se



**Figura IV.27.** Concentración de nutrientes en hojas de Paulownia en marzo y octubre 2013. En cada muestreo, las diferencias significativas para cada suelo debidas a la aplicación de enmiendas están marcadas con distintas letras ( $p < 0,05$ ). Las líneas horizontales en cada una de las gráficas corresponden a los valores normales de cada uno de los nutrientes para esta especie (Mills and Jones, 1991).

## VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores

encontraron diferencias significativas en las concentraciones de Ca y P en el suelo V, que aumentaron con las enmiendas.

En el segundo muestreo (octubre 2013) las concentraciones de macronutrientes en las hojas fueron muy similares en los tres suelos, sin que se encontraran diferencias significativas debidas a las enmiendas.

Comparando los resultados de ambos muestreos se observa que las concentraciones de Ca y Mg fueron más altas en el muestreo de octubre, mientras que las de N, P y K fueron más altas en el muestreo de mayo. En el caso del S no se aprecia un patrón claro (Figura IV.27). La explicación está en que de acuerdo con Pugnaire (2001), la concentración de nutrientes en hojas muestra un patrón estacional. El muestreo de mayo 2013 corresponde a hojas jóvenes (recién brotadas tras el invierno), mientras que el de octubre 2013, son hojas maduras y están punto de caer, debido a la naturaleza caduca de la *Paulownia*. Así, aquellos elementos que tienen una función metabólica activa como N, P y K aumentan durante el desarrollo de la hoja y bajan después. Parte de este descenso es debido al incremento en la proporción de estructuras de la pared celular y a la translocación de nutrientes fuera de la hoja antes de la senescencia (Pugnaire y Chapin, 1993). Por el contrario, los nutrientes menos móviles como Ca y Mg aumentan con la edad de la hoja. Madejón (2004) describió patrones similares en hojas de distintas especies arbóreas.

En el primer muestreo para todos los suelos y tratamientos las concentraciones en hojas de N, P, Mg y S fueron más altas que los valores normales para *Paulownia tomentosa* dados por Mills y Jones (1991) (2,46 % para N, 0,23 % para P, 0,28 para Mg y 0,19 para S). En el caso del K, las concentraciones en los tratamientos V y V+BC estuvieron por debajo del valor normal (1,65 %); en este caso el aumento de la concentración de este elemento se debe al aporte de K con el compost de alperujo, rico en este elemento (Tabla III.2). En el segundo muestreo, debido a las causas anteriormente mencionadas, todas las concentraciones de K y algunas de N estuvieron por debajo de estos niveles normales. Las concentraciones de Ca en ambos muestreos estuvieron en todos los casos por debajo del valor normal de 1,86 % (Mills and Jones, 1991).

A pesar del incremento de K y P disponible en suelo debido a las enmiendas AC y BC (Figura IV.14), sólo se encontraron diferencias significativas en caso del K, ya comentado anteriormente, y del P en el suelo V (Figura IV.27).



Las diferencias entre la concentración de nutrientes en suelo y plantas puede estar relacionadas con la regulación de la absorción de los macronutrientes por las raíces; aunque el suelo presente elevadas concentraciones de nutrientes las plantas solo absorben los nutrientes necesarios.

Resultados similares de la concentración de nutrientes en el suelo no contaminado NC y en el contaminado AZ, está probablemente relacionados con la baja disponibilidad de los elementos traza en suelo AZ (Figura IV.15), que no afecta a la absorción de los nutrientes por la planta. Estos resultados también están relacionaos con el contenido relativamente alto de COT en el suelo AZ que ayuda a mantener los niveles nutricionales adecuados en el suelo (Figura IV.13). En el caso del suelo ácido V la adición de las enmiendas fue necesaria para mantener los niveles nutricionales normales, ya que en estos suelos con mayor disponibilidad de elementos traza (Figura IV.15) la absorción de los nutrientes por la planta puede ser modificada (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). Estos resultados ponen de manifiesto que en suelos ácidos contaminados la adición de enmiendas puede ser necesaria para el desarrollo adecuado de las plantas.

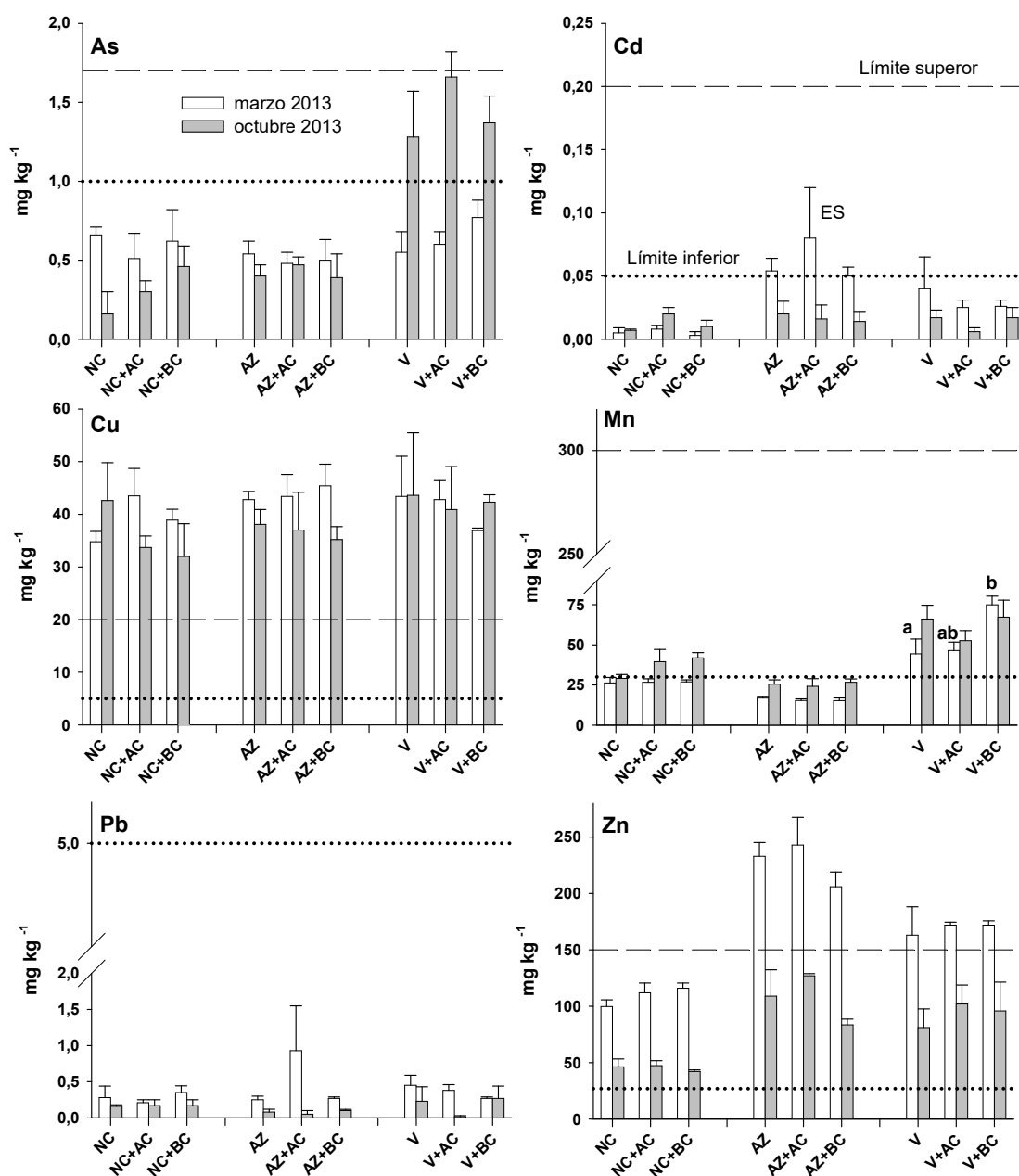
#### *IV.2.7.4. Elementos traza en hojas*

Los valores medios de las concentraciones de As, Cd, Cu, Pb y Zn en hojas de Paulownia en los tres suelos estudiados no muestran diferencias significativas atribuibles a las enmiendas. En el caso del Mn, se observan diferencias significativas entre los tratamiento del suelo V (Figura IV.28).

Los valores medios de Cd, Cu, Pb y Zn fueron más bajos en el muestreo de octubre, descenso que fue especialmente evidente en el caso el Zn, mientras que los de Cd y Mn aumentaron en ese segundo muestreo. De acuerdo con diversos autores las mayores concentraciones de elementos traza suelen ocurrir en las hojas más maduras, debido al mayor tiempo de exposición, y a la respuesta de las plantas de acumular los elementos potencialmente tóxicos en las hojas antes de su caída (Ernst et al., 1992; Madejón 2004).

Las concentraciones de As, Cd, Mn y Pb en hojas estuvieron siempre dentro de los intervalos considerados normales en hojas (Kabata-Pendias y Pendias, 2001): As, 1-1,7 mg kg<sup>-1</sup>; Cd, 0,05-0,2 mg kg<sup>-1</sup>; Mn, 30-300 mg kg<sup>-1</sup>; Pb, 5-10 mg kg<sup>-1</sup>. El aumento de As en los suelos V está directamente relacionado con el aumento del pH del suelo, ya que la disponibilidad de este elemento aumenta con el pH (Madejón y Lepp, 2007).

## VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores



**Figura IV.28.** Concentración de elementos traza en hojas de *Paulownia* en marzo y octubre 2013. En cada muestreo, las diferencias significativas para cada suelo debido a la adición de enmiendas están marcadas con distintas letras ( $p < 0,05$ ). Las líneas horizontales en cada una de las gráficas corresponden a los intervalos normales de cada uno de los elementos en plantas (Kabata-Pendias y Pendias, 2001).

No obstante, las concentraciones de este elemento no superan el límite superior del intervalo de normalidad. En el caso del Mn las concentraciones medias en hojas fueron más altas en el suelo ácido V en comparación con NC y AZ, debido a que la disponibilidad de este elemento es mayor a pH ácidos como corresponde al suelo V y por tanto las plantas son capaces de absorberlo fácilmente bajo condiciones ácidas (Kabata Pendias y Pendias, 2001).

De acuerdo con los resultados obtenidos, esta especie arbórea parece tener la capacidad de excluir el Cd. En el suelo V, más ácido, es especialmente importante, porque a pesar de que este elemento es muy móvil a pH ácidos, y fácilmente absorbible y acumulable en raíces y hojas, en estas condiciones de acidez (Kabata-Pendias y Pendias, 2001; Alloway, 2013), en el caso de la *Paulownia* no se observó dicha acumulación.

Las concentraciones medias de Cu estuvieron siempre por encima del límite superior del intervalo normal establecido para plantas ( $5\text{-}30\text{ mg kg}^{-1}$ , Kabata-Pendias and Pendias, 2001), así como de las concentración normales establecida para *Paulownia tomentosa* ( $15\text{ mg kg}^{-1}$ , Mills y Jones, 1991). Estos resultados sugieren que esta especie tiene la capacidad de acumular Cu, incluso en suelos no contaminados con este elemento como es el caso de suelo NC (concentración media pseudo total en suelo de  $19\text{ mg kg}^{-1}$ ). Las concentraciones medias en hojas alcanzaron valores máximos de  $50\text{ mg kg}^{-1}$ , similares a las medidas en una plantación de esta misma especie para la explotación de biomasa en una zona no contaminada (Madejón et al., en revisión). Esta habilidad de la *Paulownia* para acumular y tolerar Cu ha sido descrita recientemente por Jiang et al. (2012).

En el primer muestreo las concentraciones medias de Zn en hojas de *Paulownia* en los suelos AZ y V superaron el límite superior de las concentraciones normales de este elemento ( $27\text{-}150\text{ mg kg}^{-1}$ , Kabata-Pendias y Pendias, 2001) Sin embargo, en el muestreo final dichas concentraciones estuvieron en todos los suelos dentro del intervalo considerado normal en plantas. Las concentraciones más altas se obtuvieron en el suelo AZ (con un valor máximo mayor de  $250\text{ mg kg}^{-1}$ ) a pesar de que no fue en este suelo donde se observaron los mayores valores de disponibilidad (Figuras IV.15). En cada muestreo las concentraciones más altas de Zn se observaron en los suelos contaminados (AZ y V). Azarrello et al. (2012) y Wang et al. (2009) han descrito la eficiencia de *P. fortunei* para la absorción y acumulación de Zn, que según los últimos

## VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores

autores llega a 3000 mg kg<sup>-1</sup> de Zn en hojas en suelos con una concentración de 1000 mg kg<sup>-1</sup> de este elemento.

### IV.2.7.5. Correlaciones suelo-planta y Coeficientes de Transferencia

El estudio de las correlaciones suelo-planta se llevó a cabo utilizando los resultados de las concentraciones elementos traza en planta con: 1) suelo (totales y disponibles) en los dos muestreos, 2) el agua de poro, Dicho estudio puso de manifiesto que solo se obtuvieron correlaciones positivas y significativas para Cd y Zn disponibles: Cd planta- $\text{CaCl}_2$ muestreo1 0.589\*\*p<0.001, Zn planta-  $\text{CaCl}_2$ muestreo1 0.742\*\* p<0.001, Zn planta- $\text{CaCl}_2$ muestreo2 0.498\*\* p<0.008. También se observaron correlaciones significativas para Cd en el agua de poro y en las hojas: 0.506\*\* p<0.07. Asimismo, se encontraron correlaciones significativas entre concentraciones totales de Cd y Zn en el suelos y las hojas: Cd 0.821\*\* p<0.001 y Zn 0.901\*\* p<0.001. Ciadamidaro et al., (2013) encontraron resultados similares en álamo blanco.

Para calcular la proporción del elemento traza que es transferido del suelo a la parte aérea de la Paulownia, se determinó el Coeficiente de Transferencia (CT). Este coeficiente se define como la razón entre la concentración del elemento traza en la parte aérea de la planta y la concentración del elemento en el suelo, y se considera que es un indicador de la biodisponibilidad (Adriano, 2001). La Tabla IV.10 muestra que la

**Tabla IV.10.** Coeficientes de transferencia (CT) medios suelo-hoja de Pawlonia en los elementos contaminantes en lo suelos estudiados.

CT medio	As	Cd	Cu	Pb	Zn
NC	0,06	0,15	1,98	0,01	1,49
AZ	0,005	0,04	0,19	0,0009	0,25
V	0,003	0,02	0,23	0,0004	0,35

tendencia de los coeficientes de transferencia es prácticamente igual en los tres suelos  $\text{Pb} < \text{As} < \text{Cd} < \text{Zn} < \text{Cu}$ ; la única anomalía es la encontrada para en Pb y Zn en el suelo V, que este caso es  $\text{Cu} < \text{Zn}$ . Es importante destacar que los valores más altos correspondieron al suelo no contaminado NC: alrededor de 2 veces superior para el Pb, 5 para Cd y Zn y 10 para As y Cu, que en los suelos contaminados AZ y V. Este hecho sugiere que a medida que aumenta la concentración de elementos traza en el suelo, las plantas tienen una mayor restricción para su transporte al interior de la planta, siendo un comportamiento propio de plantas exclusoras. Por otra parte, en la misma tabla se

observa que los CT de Cu y Zn de las plantas de Paulownia fueron los más altos, indicando una cierta preferencia por estos elementos, respecto los otros estudiados.

#### *IV.2.7.6. Elementos traza en raíz-tronco-hoja*

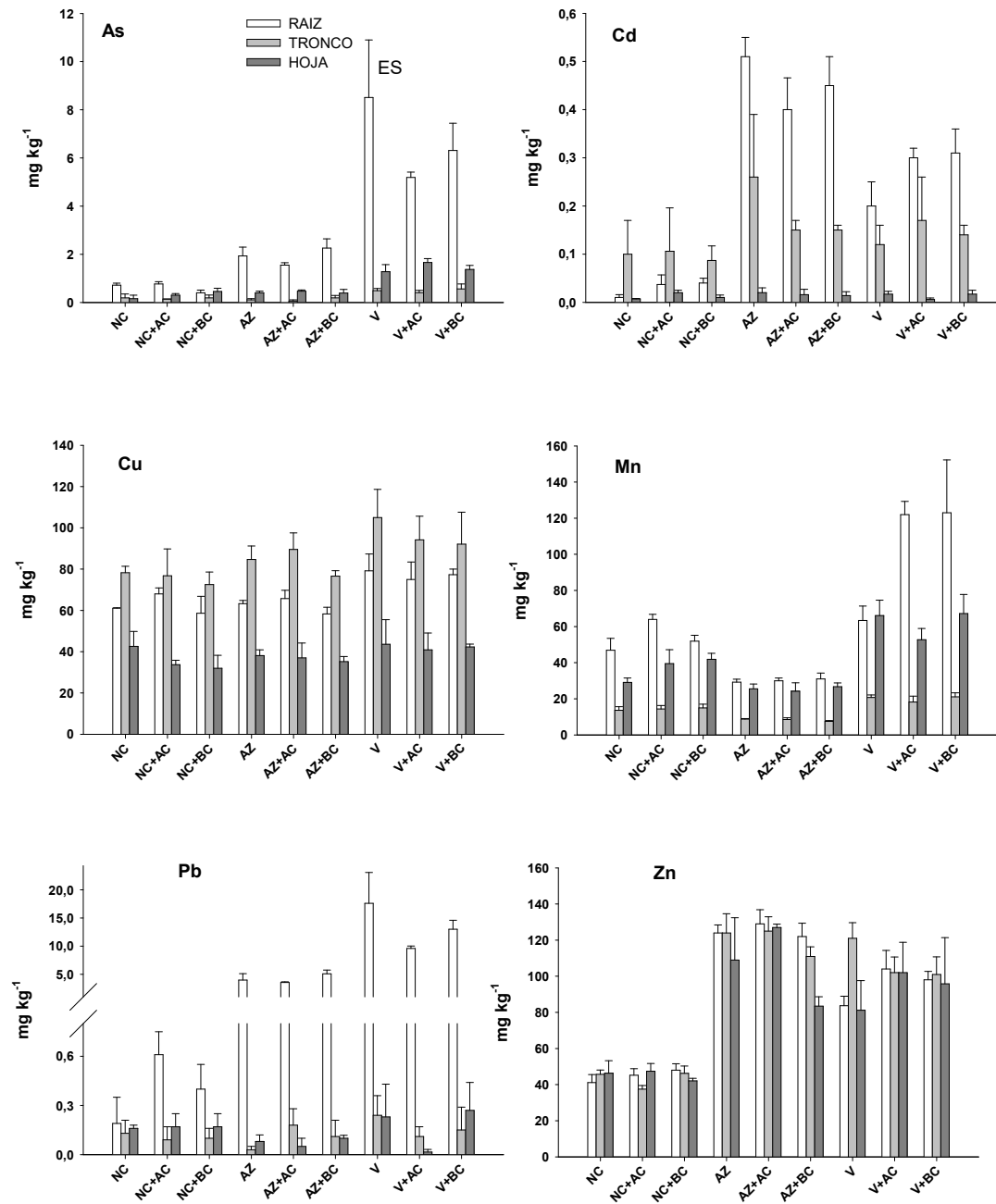
Para estudiar la acumulación de los elementos traza en las principales partes (raíz, tronco y hojas) de Paulownia, al final del experimento, se cortó el árbol y se separaron las susodichas fracciones; en el caso del tronco hubo que formar una muestra

Según se observa en la Figura IV.29, no se apreciaron en ninguno de los suelos diferencias significativas en las concentraciones medias de As, Cd, Cu, Mn, Pb y Zn en raíz, tronco y hojas debidas a las enmiendas.

En un estudio reciente Zhao et al. (2014) encontraron que los valores de las concentraciones medias de Pb, Zn, Cd y Cu seguían los siguientes patrones: tronco<ramas<hojas; tronco<raíces gruesa<raíces intermedias<raíces finas), que no se cumple en el presente estudio. Así, las concentraciones más altas de As y Pb en todos los suelos y tratamientos se alcanzaron en las raíces; los valores máximos se encontraron en el suelo V sin enmienda: máximo As 8,5 mg kg<sup>-1</sup> y Pb 17,6 mg kg<sup>-1</sup> (Figura IV.29), coincidiendo con el suelo en el que la concentración total de estos elementos es más alta (Tabla III.1). Por el contrario, las concentraciones más bajas se obtuvieron generalmente en el tronco, siendo por tanto el patrón de distribución: raíz>hoja>tronco. Resultados similares de máxima acumulación de As en raíces en diferentes especies vegetales han sido encontrados por Madejón et al. (2003b) y Madejón y Lepp (2007). En el caso del Pb, la absorción de este elemento por la planta y posterior transporte a la parte aérea suele ser baja, siendo una vez absorbido retenido principalmente en la raíz. Para este elemento es efectiva la barrera “suelo-planta” (Cha, 1989; Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Ambos elementos son tóxicos a bajas concentraciones para el resto de la cadena trófica, con lo que la mayor acumulación en raíces hace a esta especie una candidata para reforestar zonas contaminadas con ambos elementos. Resultados de menor acumulación de As y Pb en tronco respecto a la hoja en *Pouulus alba* han sido puestos de manifiesto por descritos Madejón et al. (2004).

En general también se observaron concentraciones de Mn más altas en las raíces, aunque las diferencias en acumulación respecto a tronco y hojas no fueron tan grandes como para As y Pb (Figura IV.29). De hecho en todos los tratamientos del suelo AZ y en suelo V sin enmienda, las concentraciones medias de Mn fueron similares en raíz y

VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores



**Figura IV.29.** Concentración de elementos traza en raíz, troco y hoja de *Paulownia* al final del experimento.

hojas. Las diferencias observadas respecto a As y Pb están relacionadas con la función metabólica que tiene el Mn en hojas, debido a su importante papel en la fotosíntesis (Kabata-Pendias y Pendias, 2001). Las concentraciones más altas de Mn se observaron en plantas del suelo V, especialmente las del tratamiento BC, y las más bajas en AZ, lo que está directamente relacionado con la disponibilidad de este elemento cuyos valores más altos son los del suelo V (Figura IV.15). Este comportamiento, puede deberse a una absorción pasiva de Mn, ya que las plantas responden a pequeños cambios de concentración en el suelo y que el elemento sea rápidamente translocado hacia la parte aérea de la planta (Kabata- Pendias y Pendias , 2001).

Las concentraciones medias de Cd en raíces y tronco fueron mucho más altas en las plantas de los suelos contaminados AZ y V (Figura IV.29), en los que el patrón de distribución fue: raíz>tronco>hojas, lo que concuerda con lo encontrado por Tzvetkova et al. (2015) en dos híbridos de *Paulownia* en suelos muy contaminados con este elemento. En cambio, en el suelo NC, los valores más altos se encontraron en el tronco, siendo la distribución tronco>raíz>hojas, lo que concuerda con resultados obtenidos en otras especies vegetales (Madejón et al., 2007) y árboles (Pulford y Watson, 2003), que también encontraron translocación de este elemento a la parte aérea, ya que es un elemento móvil dentro de la planta.

La distribución de Cu en las partes estudiadas de las plantas fue tronco>raíz>hojas (Figura IV.29). Los valores más altos se observaron en el tronco de las plantas del suelo V sin enmendar ( $105 \text{ mg kg}^{-1}$ ). En ese mismo suelo se alcanzaron también los valores más altos en raíces ( $79,2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y en hojas ( $43,6 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Estos resultados contrastan con los de Wang et al., (2009) que encontraron el siguiente patrón de distribución: raíces>tronco>hojas.

En general, en cada suelo no se encontraron diferencias significativas entre los valores medios de las concentraciones de Cu y de Zn en las tres partes de las plantas estudiadas (Figura IV.29). Los valores medios más altos de las concentraciones de Zn se observaron en las plantas de los suelos contaminados AZ y V, siendo los valores medios de las plantas del suelo AZ algo más altas de las correspondientes del suelo V, a pesar que la disponibilidad de este elemento fue más alta en este suelo (Figura IV.15). Azzarello et al. (2012) en un estudio con *Paulownia tomentosa*, concluyen que esta planta es capaz de tolerar elevadas concentraciones de Zn, que da lugar a altas concentraciones en estructuras particulares como la pared celular de los peciolo y las vacuolas de los pelos radicales. En el presente estudio peciolo y hojas se analizaron

conjuntamente, por lo que no pudo comprobarse este hecho en las muestras de *P. fortunei*.

### *IV.2.7.7. Potencial uso de P. fortunei para la fitorrecuperación de suelos contaminados con elementos traza*

La mayor parte de los estudios de fitorrecuperación de suelos contaminados con elementos traza realizados hasta la fecha han tenido como objetivo la fitoextracción, y en gran parte se han dedicado a la identificación y en el uso de plantas hiperacumuladoras. Sin embargo, como se ha comentado en la introducción la utilización de estas plantas plantea numerosos inconvenientes (Khan et al., 2000; Kamnev y van der Lelie, 2000; Clemente et al., 2005). Una alternativa a la utilización de hiperacumuladoras herbáceas, son algunas especies leñosas resistentes los elementos traza, que tienen una alta tasa de crecimiento, un sistema de raíces profundo y la capacidad de crecer en suelos pobres en nutrientes, por lo que son factibles de utilizar para la recuperación de suelos contaminados con dichos elementos (Pulford y Watson, 2003). Sin embargo, a este respecto sólo hay algunos estudios en la literatura, la mayoría de ellos relacionados con el uso de álamos y sauces para la recuperación de suelos contaminados Cd (Robinson et al., 2000; Klang-Westin y Eriksso, 2003; Dickinson y Pulford, 2005).

En los últimos tiempos se están utilizando distintas especies del género *Paulownia* para la fitorrecuperación de suelos contaminados con metales pesados debido más a su muy alta productividad de biomasa, que a su potencial de acumulación de metales (Doumet et al., 2008). Otras especies del género *Paulownia*, como *P. fortunei* se han utilizado también con éxito para fines de fitorrecuperación (Doumet et al, 2008; Wang et al., 2009) debido a su tolerancia a los metales pesados (Doumet et al., 2011), y a su excepcional tasa de un crecimiento.

En el presente estudio al haberse llevado a cabo en condiciones de “semi-campo” se ha calculado la capacidad de acumulación de los elementos traza por árbol (Tabla IV.11). En general, la capacidad de extracción estos elementos por la planta fue más alta en el segundo ciclo debido a los mayores valores de la biomasa en este ciclo (Tabla IV.9). Por otra parte, sólo en cuatro casos (Cd en suelo V ciclo 1; Pb en suelos NC y AZ ciclo 1; Mn en suelo V ciclo 1) se encontraron diferencias significativas debidas a la aplicación de enmiendas, que sin embargo no pueden explicarse en función de las mismas.



A pesar de las altas concentraciones de los elementos menos móviles de los estudiados, As y Pb, en los suelos contaminados (AZ y V; Tabla III.1), en el primer ciclo las plantas no extrajeron cantidades muy distintas de estos suelos de las correspondientes al suelo no contaminado NC (valores medios As~15 µg; Pb~13 µg) (Tabla IV.11).

En el segundo ciclo las cantidades extraídas, tanto de As como de Pb, fueron mayores que en el primero. En el caso del As los valores medios correspondientes a los suelos NC y AZ fueron unas 2 veces mayores que en el primer ciclo, pero en suelo V el valor medio (103 µg), fue más de tres veces superior a los correspondientes en los otros dos suelos. En el caso del Pb, los valores medios siguen la tendencia NC<AZ<V (Tabla IV.11). Aunque Zhao et al., (2014) proponen a *P. fortunei* por su capacidad para acumular Pb, en el presente estudio no se han encontrado un resultado similar, debido probablemente a la baja disponibilidad de este elemento en los suelos estudiados que está por debajo límite de detección del método utilizado para su estimación.

Tampoco se observaron en el segundo ciclo diferencias significativas en la acumulación de Cd debidas a las enmiendas. Los valores medios en cada suelo siguieron la tendencia NC<V<AZ, la misma que la producción de biomasa (Tabla IV.9).

Los valores más altos de extracción por la planta correspondieron al Cu y Zn. Los valores medios de Cu en el segundo ciclo fueron más altos que en el primero, entre 3,5 y 4,5 veces mayores, correspondiendo los valores más altos en este ciclo a los suelos contaminados (AZ y V). En el caso del Zn los resultados mostraron una tendencia similar a los del Cu, en el primer ciclo los valores fueron más bajos que en segundo, siendo el aumento entre 2,5 y 3,7 veces. Tanto para el Cu como para el Zn se observó que las mayores cantidades extraídas correspondían a los suelos contaminados, siendo los valores de Cu muy similares en los suelos AZ y V, pero los de Zn fueron más altos en el suelo AZ. Jiang et al., (2012) y Azzarello et al. (2012) también han observado la capacidad de las plantas de *Paulownia* para la absorción y acumulación de Cu y Zn, lo que podría aprovecharse para su utilización en la fitorrecuperación de suelos, contaminados con estos elementos.

Por último, las cantidades extraídas de Mn en cada suelo fueron superiores en el segundo ciclo alrededor de 4 veces más altas.

VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores

**Tabla IV.11.** Cantidades de elementos traza ( $\mu\text{g}$ ; valores medios $\pm$ ES) extraídos en la biomasa de *Paulownia*. En cada suelo, los valores de cada elemento seguidos de distinta letra difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Tratamiento	As	Cd	Cu	Mn	Pb	Zn
Primer ciclo						
NC	17,3 $\pm$ 6,0	4,60 $\pm$ 0,99	3723 $\pm$ 151	785 $\pm$ 117	10,7 $\pm$ 0,74 a	3084 $\pm$ 541
NC+AC	19,5 $\pm$ 3,0	3,33 $\pm$ 0,53	4228 $\pm$ 328	672 $\pm$ 27,0	22,1 $\pm$ 1,75 b	3033 $\pm$ 223
NC+BC	8,20 $\pm$ 1,0	2,15 $\pm$ 1,22	3665 $\pm$ 658	657 $\pm$ 70,1	9,23 $\pm$ 3,50 a	3671 $\pm$ 1056
AZ	12,6 $\pm$ 1,9	16,3 $\pm$ 1,13	5142 $\pm$ 533	515 $\pm$ 33,7	16,0 $\pm$ 1,52 ab	9389 $\pm$ 652
AZ+AC	17,0 $\pm$ 2,9	13,3 $\pm$ 2,61	4943 $\pm$ 313	463 $\pm$ 42,0	4,05 $\pm$ 2,93 a	9032 $\pm$ 383
AZ+BC	18,8 $\pm$ 12,8	19,9 $\pm$ 5,09	4481 $\pm$ 890	410 $\pm$ 85,9	20,8 $\pm$ 5,22 b	7876 $\pm$ 1663
V	11,3 $\pm$ 5,4	3,51 $\pm$ 0,42 a	3216 $\pm$ 767	577 $\pm$ 115 a	8,00 $\pm$ 0,33	2987 $\pm$ 284
V+AC	21,1 $\pm$ 3,1	8,07 $\pm$ 1,07 ab	4055 $\pm$ 390	1313 $\pm$ 121 ab	20,2 $\pm$ 7,83	5777 $\pm$ 872
V+BC	13,3 $\pm$ 3,0	9,78 $\pm$ 1,51 b	3480 $\pm$ 380	1620 $\pm$ 258 b	11,2 $\pm$ 1,97	4950 $\pm$ 752
Segundo ciclo						
NC	33,5 $\pm$ 26,2	16,5 $\pm$ 12,0	13454 $\pm$ 909	2502 $\pm$ 255	24,4 $\pm$ 15,6	8026 $\pm$ 457
NC+AC	27,9 $\pm$ 5,10	7,59 $\pm$ 4,71	14427 $\pm$ 3813	2904 $\pm$ 565	14,1 $\pm$ 11,4	7060 $\pm$ 894
NC+BC	41,8 $\pm$ 25,5	15,1 $\pm$ 6,24	13465 $\pm$ 1441	3112 $\pm$ 364	19,2 $\pm$ 10,4	8753 $\pm$ 861
AZ	22,5 $\pm$ 8,80	46,4 $\pm$ 22,5	15151 $\pm$ 1312	1808 $\pm$ 77,5	5,82 $\pm$ 3,78	22833 $\pm$ 1712
AZ+AC	17,4 $\pm$ 10,6	28,9 $\pm$ 5,55	17334 $\pm$ 3334	1806 $\pm$ 63,2	38,2 $\pm$ 22,7	24552 $\pm$ 3308
AZ+BC	42,7 $\pm$ 14,4	35,5 $\pm$ 10,2	18178 $\pm$ 3579	2188 $\pm$ 509	35,6 $\pm$ 32,7	26822 $\pm$ 5275
V	98,7 $\pm$ 12,0	17,6 $\pm$ 3,40	16215 $\pm$ 1730	4311 $\pm$ 766	40,9 $\pm$ 13,1	19403 $\pm$ 1275
V+AC	86,9 $\pm$ 13,2	30,2 $\pm$ 16,0	17261 $\pm$ 2210	3643 $\pm$ 653	20,0 $\pm$ 10,2	19118 $\pm$ 1638
V+BC	125 $\pm$ 57,4	24,4 $\pm$ 2,73	16649 $\pm$ 1953	4589 $\pm$ 816	33,7 $\pm$ 31,0	19263 $\pm$ 2163

En el presente experimento se ha realizado un balance de masa. Suponiendo que en cada contenedor había unos 140 kg de suelo, se ha estimado la cantidad total de As, Cd, Cu, Pb y Zn en los suelos sin tratar y tratados (Tabla IV.12). Los valores correspondientes a los suelos tratados, se han estimado teniendo en cuenta las cantidades de cada uno de esos elementos aportadas con las enmiendas (Tabla IV.13), que en todos los casos fueron inferiores a los errores estándar (ES) de los valores en los suelos sin tratar, por lo que dichos aportes son insignificantes respecto a las cantidades existentes originalmente. En la Tabla IV.12 se muestran también las cantidades totales extraídas por las plantas. A partir las cantidades de As, Cd, Cu, Pb y Zn totales en los suelos y las extraídas por las plantas se ha estimado la proporción de estos elementos extraída por las plantas de Paulownia (Tabla IV.14). Los resultados de esta tabla está en consonancia con los coeficientes de transferencia suelo-hojas (Tabla IV.10): 1) la eficacia de la extracción es mayor en el suelo no contaminado; 2) en cada suelo las extracciones más bajas corresponden a los elementos menos móviles (As y Pb) y las más altas a Cu y Zn.

Los resultados obtenidos muestran que las cantidades de elementos traza extraídas por las plantas no son adecuadas para considerar esta especie como planta fitoextractora, al menos bajo las condiciones del presente estudio. Sin embargo, el hecho de que esta planta crezca en suelos contaminados y que su crecimiento mejore con la adición de enmiendas, la hacen viable para la fitoestabilización de dichos elementos, permitiendo la utilización de esos suelos para la obtención de su biomasa con fines energéticos.

### **V.2.8. Discusión general y conclusiones del experimento en contenedores al aire libre (condiciones de semicampo)**

El crecimiento durante dos años de *P. fortunei* en dos los suelos estudiados condiciones de semi-campo, dio lugar a mejoras en las propiedades químicas de los mismos. Así por ejemplo, en los suelos sin enmendar la sola presencia de la planta dio lugar a aumentos del pH y de los contenidos en materia orgánica (COT) de los suelos, sin descender apreciablemente las concentraciones en nutrientes de los mismos. La adición de las enmiendas mejoró aún más todas estas propiedades de los suelos, especialmente en los más degradados. Estos resultados concuerdan con las observaciones de Wang et al., (2009) de un estudio similar en suelos contaminados y su rizosfera. Según estos autores,

VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores

**Tabla IV.12.** Comparación de las cantidades de elementos traza en el suelo y extraídos por la planta de Paulownia (mg; valores medios±ES)

	As total suelo	As total extraído planta	Cd total Suelo	Cd total extraído planta	Cu total suelo	Cu total extraído planta
NC	1210±274	0,051±0,027	85±7	0,021±0,012	2794±289	17,2±0,92
NC+AC	1211	0,047±0,006	85	0,011±0,005	2837	18,7±3,83
NC+BC	1216	0,050±0,026	86	0,017±0,006	2879	17,1±1,58
AZ	15120±7155	0,035±0,009	516±166	0,063±0,023	22410±5792	20,3±1,42
AZ+AC	15121	0,034±0,011	516	0,042±0,006	22453	22,3±3,35
AZ+BC	15122	0,062±0,019	516	0,055±0,011	22453	22,7±3,69
V	28063±13699	0,110±0,013	3254±154	0,021±0,003	22477±3538	19,4±1,89
V+AC	28065	0,108±0,014	325	0,038±0,016	22556	21,3±2,24
V+BC	28074	0,138±0,057	326	0,034±0,003	22556	20,1±1,99

	Pb total suelo	Pb total extraído planta	Zn total suelo	Zn total extraído planta
NC	2261±6	0,035±0,016	7488±475	11,1±0,7
NC+AC	2265	0,036±0,012	7574	10,1±0,9
NC+BC	2289	0,028±0,011	7761	12,4±1,4
AZ	31860±1823	0,022±0,004	68445±4712	32,2±1,8
AZ+AC	31864	0,042±0,023	68531	33,6±3,3
AZ+BC	31888	0,056±0,033	68804	34,7±5,5
V	75943±27398	0,049±0,013	50540±4855	22,4±1,3
V+AC	75951	0,040±0,013	50697	24,9±1,9
V+BC	75994	0,045±0,031	51041	24,2±2,3

**Tabla IV.13.** Cantidades de elementos traza aportados a los suelos con las enmiendas (Valores medios, mg±DS)

Aportado, mg	Suelos NC y AZ		Suelo V	
	AC	BC	AC	BC
As	1,10±0,10	6,15±0,27	2,02±0,19	11,3±0,5
Cd	0,11±0,005	0,88±0,04	0,21±0,008	1,62±0,08
Cu	43,2±0,51	85±4,9	79,3±0,94	157±9
Mn	165±2	260±16	303±4	476±30
Pb	4,48±0,03	28,0±1,8	8,22±0,05	51,3±3,3
Zn	85,8±5,1	273±15	157±9	501±27

**Tabla IV.14.** Estimación de la proporciones en ‰ de As, Cd, Cu, Pb y Zn extraídos por las plantas de *Paulownia* de cada suelo.

Suelo	As, ‰	Cd, ‰	Cu, ‰	Pb, ‰	Zn, ‰
NC	0,042	0,23	6,0	0,015	1,47
AZ	0,003	0,097	0,9	0,0007	0,47
V	0,004	0,008	0,9	0,0006	0,46

en los suelos en los que crecía *Paulownia*, las propiedades físico-químicas mejoraron con el tiempo, lo que indica que esta especie es capaz de mejorar el ecosistema del suelo en el que crece.

La estimación de la disponibilidad de elementos traza en el suelo mediante la extracción con  $\text{CaCl}_2$  0,01 M el análisis del de agua de poro, fueron en general coincidentes y pusieron de manifiesto que la aplicación de enmiendas orgánicas es una medida eficaz para disminuir la disponibilidad de los elementos traza especialmente en suelos ácidos. El efecto conjunto de las enmiendas y del desarrollo de las plantas dieron lugar al aumentar el pH de los suelos y consecuentemente la disminución de la disponibilidad de elementos traza para las plantas en los mismos. Por consiguiente, la aplicación de enmiendas es fundamental cuando se aplican técnicas de fitoestabilización de suelos contaminados con elementos traza. Es muy importante resaltar la acción de la propia planta en la estabilización de los elementos traza, debido a la acción de los exudados producidos en la rizosfera que contribuyen a la disminución de la disponibilidad de dichos elementos. Ciadamidaro et al. (2013) encontraron resultados similares en un ensayo en contenedores con álamo blanco.

El estudio integrado de las actividades enzimáticas estudiadas de los suelos puso de manifiesto que la planta mejoró paulatinamente el conjunto de la actividad

## VI. 2. Resultados y discusión del experimento en contenedores

microbiana del suelo, incluso en los suelos que no recibieron enmienda, demostrando la capacidad mejoradora de esta especie, incluso en condiciones adversas.

La aplicación de enmiendas orgánica a los suelos, aumentó la producción de biomasa hasta niveles similares a los producidos en suelos no contaminados, produciendo una acumulación de elementos traza en la biomasa relativa baja. Por lo tanto, las plantaciones de *P. fortunei* podrían representar una oportunidad para mejorar el equilibrio económico de la revegetación de suelos contaminados, teniendo en cuenta que otras aplicaciones comerciales tales como la producción de alimentos o forrajes de cultivos no se recomienda en estos suelos. Para evaluar adecuadamente el equilibrio económico de estas plantaciones, deben de tenerse en cuenta los costes de producción, de transporte, de las enmiendas orgánicas y de aplicación. Las enmiendas utilizadas en este estudio se producen en las plantas de extracción del aceite de oliva (Compost de alperujo, AC), así como en las plantas de depuración de aguas residuales (Compost de biosólidos, BC), por lo el coste de adquisición de estos materiales para el uso agroforestal es generalmente muy baja. Su utilización contribuye además al reciclaje de residuos orgánicos abundantes y en el área mediterránea.

Por último, otros factores ambientales tienen que ser también considerados al proponer *P. fortunei* como la planta para forestar en suelos degradados. Las especies del género *Paulownia* no son nativas de la región Mediterránea. Aunque su expansión como especie invasoras no se ha documentado en esta región, la invasión de algunas especies de *Paulownia* en áreas ecológicamente alteradas de América del Norte y Europa Central está recibiendo cada vez más atención (Essl, 2007; Kuppinger et al., 2010; Todorović et al., 2010). El potencial de estas especies para invadir áreas naturales no alteradas es probable que sea baja, teniendo en cuenta los requisitos de condiciones de luz para la germinación de la semilla y la susceptibilidad de las semillas a patógenos del suelo (Todorović et al 2010; Yadav et al., 2013).

Los resultados obtenidos muestran que el uso combinado de *P. fortunei* y la adición enmiendas orgánicas al suelo podría ser una estrategia factible para la recuperación de áreas contaminadas con elementos traza bajo clima mediterráneo y promover su valorización económica.

## **V. CONCLUSIONES**





Los resultados del experimento de campo para la recuperación de un suelo ácido moderadamente contaminado con elementos traza, mostraron que el suelo experimentó una *recuperación natural* que aumentó con el tiempo. La aplicación de enmiendas una inorgánica (espuma de azucarera) y dos orgánicas (compost de biosólidos y leonardita) intensificó dicha recuperación.

En la capa de 0-15 cm de suelo, la espuma de azucarera (material rico en carbonato cálcico) fue la enmienda más eficiente para elevar el pH del suelo y reducir la movilidad/disponibilidad de los elementos traza. Esta enmienda mantuvo su efecto seis años después de dos aplicaciones sucesivas, no habiéndose observado efectos adicionales después de otras dos nuevas aplicaciones. Dos aplicaciones de las dos enmiendas orgánicas aumentaron el pH y el contenido en materia orgánica, y redujeron la movilidad/disponibilidad de los elementos traza. La aplicación de otras dos aplicaciones de las enmiendas orgánicas mejoró ligeramente los resultados. Las tres enmiendas, y especialmente la espuma de azucarera, mejoraron además la fertilidad química y bioquímica del suelo. En la capa subsuperficial (15-30 cm) del suelo el efecto de las enmiendas fue mucho menor.

Las mejoras producidas en el suelo potenciaron su colonización por las especies vegetales espontáneas existentes en los suelos no contaminados adyacentes, aumentando el recubrimiento vegetal en las parcelas enmendadas, lo que disminuye potencialmente la diseminación de las partículas de suelo contaminadas a otros suelos adyacentes.

Estos resultados ponen de manifiesto la viabilidad de la *recuperación natural asistida* de este suelo.

El estudio del desarrollo de la especie de crecimiento rápido (*Paulownia fortunei*) en condiciones de semi-campo en dos suelos moderadamente contaminados con elementos traza, uno ácido y otro neutro, y un suelo no contaminado con pH neutro, mostró que la aplicación de dos enmiendas (compost de alperujo y compost de biosólidos) mejoró todas las propiedades de los suelos, especialmente la del suelo ácido.

## CONCLUSIONES

El efecto conjunto de las enmiendas y del desarrollo de las plantas produjo aumentos del pH y disminución de la movilidad/disponibilidad de los elementos traza, especialmente en el suelo ácido. Las enmiendas también tuvieron un efecto positivo sobre las propiedades químicas y bioquímicas de los suelos que aumentó con el tiempo, y que fue más importante en el suelo ácido, cuya fertilidad de partida era más baja.

La mera presencia de la planta dio lugar a la mejora de las propiedades químicas y bioquímicas de los suelos, así como a estabilización de los elementos traza en ellos, atribuible al efecto de los exudados producidos por la planta que repercute positivamente en la actividad microbiológica en la zona radical.

Las enmiendas produjeron aumento del diámetro, la altura, así como de la biomasa de las plantas de *Paulownia*, que fueron más importantes en el suelo ácido. En general las concentraciones de nutrientes y elementos traza en raíz, tronco y hoja estuvieron dentro de los intervalos normales de esta especie, no encontrándose efectos atribuibles a las enmiendas, aunque las concentraciones de los elementos traza fueron más altas en las plantas del suelo no contaminado. Las cantidades totales de elementos traza extraídas por las plantas no son suficientes para considerar esta especie como planta fitoextractora, al menos bajo las condiciones del presente estudio.

El hecho de que las plantas de *Paulownia* crezcan en suelos contaminados con elementos traza y que su crecimiento mejore con la aplicación de enmiendas, las hacen viables para la fitoestabilización de dichos elementos, permitiendo la utilización de esos suelos para la producción de biomasa con fines energéticos.

## **V.I. BIBLIOGRAFÍA**



- Adriano, D.C. (2001) *Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risk of metals*. 2ª Edición. Springer-Verlag, Nueva York, EE.UU.
- Adriano, D.C., Wenzel, W.W., Vangronsveld, J. & Bolan, N.S. (2004) Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* **122**, 121-142.
- Agele, S.O. (2007) Efficacy of organic wastes amendment on the establishment and biomass yield of grass species on a degraded Alfisol. *Journal of Plant Interactions* **2**, 195-201.
- Aguilar, J., Dorronsoro, C., Gómez-Ariza, J.L. & Galán, E. (1999) *Los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado en Andalucía y la metodología y la técnica para la toma de muestra y análisis para su investigación*. Junta de Andalucía, Sevilla, España, pp. 257.
- Ahumada, I. & Schalscha, E.B. (1993) Fractionation of cadmium and copper in soils: Effects of redox potential. *Agrochimica* **37**, 281-283.
- Akyildiz, M.H. & Kol, H.S. (2010) Some technological properties and uses of paulownia (*Paulownia tomentosa* Steud.) wood. *Journal of Environmental Biology* **31**, 351-355.
- Alastuey, A., García-Sánchez, A., López, F. & Querol, X. (1999) Evolution of pyrite mud weathering and mobility of heavy metals in the Guadiamar valley after the Aznalcóllar spill, south-west Spain. *Science of the Total Environment* **242**, 41-55.
- Alburquerque, J.A., De la Fuente, C. & Bernal, M.P. (2011) Improvement of soil quality after "alperujo" compost application to two contaminated soils characterised by differing heavy metal solubility. *Journal of Environmental Management* **92**, 733-741.
- Alexander, M. (1977) *Introduction to soil microbiology*. 2ª Edición. John Wiley & Sons Inc., Nueva York, EE.UU.
- Alfaia, S.S., Ribeiro, G.A., Nobre, A.D., Luizão, R.C. & Luizão, F.J. (2004) Evaluation of soil fertility in smallholder agroforestry systems and pastures in western Amazonia. *Agriculture, Ecosystem and Environment* **102**, 409-414.
- Allen, H.E. (1997) *Importance of metal speciation in natural waters and soils to risk assessment*. Report of International Workshop on Risk Assessment of Metals and their Inorganic Compounds. International council on metals and the environment, Ottawa, Canadá, pp. 11-35.

- Allen, J.S., Whitten, J.L., Murray, M. & Duggan, O. (1997) The adsorption of pollutants by peat, lignite and activated chars. *Journal of Environment Chemical Technology and Biotechnology* **68**, 442-452.
- Allison, S.D. & Treseder, K.K. (2008) Warming and drying suppress microbial activity and carbon cycling in boreal forest soils. *Global Change Biology* **14**, 2898–2909.
- Alloway, B.J. (1990) The origins of heavy metals in soils. En: Alloway, B.J. (Ed.) *Heavy metals in soils*. Blackie and John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, **Capítulo 3**, 28-39.
- Antón Pacheco, C., Arranz, J.C., Baretino, D., Carrero, G., Jiménez, M., Gómez, J.A., Gumiel, J.C., López-Pamo, E., Martín Rubí, J.A., Martínez Pledel, B., de Miguel, E., Moreno, J., Ortiz, G., Rojas, J.G., Silgado, A. & Vázquez, E. (2001) Actuaciones para el reconocimiento y retirada de los lodos depositados sobre el terreno, y su restauración edáfica y morfológica. *Boletín Geológico Minero* **112 número especial**, 93-121.
- Aoyama, M., Itaya, S. & Otawa, M. (1993) Effects of copper on the decomposition of plant residues, microbial biomass, and  $\beta$ -glucosidase in soils. *Soil Science and Plant Nutrition* **39**, 557–566.
- Arenas, J.M., Carrascal, F., Gil, A. & Montes, C. (2008) Breve historia de la construcción del corredor verde del Guadiamar. En: *La restauración ecológica del río Guadiamar y el proyecto del Corredor Verde*. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía, Sevilla. Cap. 2, 29-64.
- Arenas, J.M., Carrero, G., Galache, J., Mediavilla, C., Silgado, A. & Vázquez, E.M., (2001). Actuaciones realizadas tras el accidente de Aznalcóllar. *Boletín Geológico y Minero* **112 número especial**, 35-56.
- Azzarello, E., Pandolfi, C., Giordano, C., Rossi, M., Mugnai, S. & Mancuso, S. (2012) Ultramorphological and physiological modifications induced by high zinc levels in *Paulownia tomentosa*. *Environmental and Experimental Botany* **81**, 11– 17.
- Baker, A.J.M. (1981) Accumulators and excluders-strategies in the response to plants of heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* **3**, 643-646.
- Bargagli, R. (1998) *Trace Elements in Terrestrial Plants: An ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery*. Springer-Verlag, Berlin.
- Baum, C., Leinweber, P. & Schlichting, A. (2003) Effects of chemical conditions in rewetted peats on temporal variation in microbial biomass and acid phosphatase activity within the growing season. *Applied Soil Ecology* **22**, 167–174.

- Bentsen, N.S. & Felby, C. (2012) Biomass for energy in the European Union – a review of bioenergy resource assessments. *Biotechnology for Biofuels* **5**, 25.
- Bernal, M. P., Clemente, R. & Walker, D. J. (2006) The role of organic amendments in the bioremediation of heavy metal-polluted soils. En: Gore R.W. (Ed.), *Environmental Research at the Leading Edge*. Nova Science Publishers, Inc., pp. 1-57.
- Bernal, M.P., Sánchez-Monedero, M.A., Paredes, C. & Roig, A. (1998) Carbon mineralization from organic wastes at different composting stages during their incubation with soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **69**, 175-189.
- Bevacqua, R.F. & Mellano, V.J. (1994) Cumulative effects of sludge compost on crop yields and soil properties. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **25**, 395–406.
- Bhargava, A., Carmona, F.F., Bhargava, M. & Srivastava, S. (2012) Approaches for enhanced phytoextractions of heavy metals. *Journal of Environmental Management* **105**, 103-120.
- Blum, W.E.H., Horak, O., Mentler, A. & Puschenreiter, M. (1998) Trace elements. En: Sabljic, A. (Ed.) *Environmental and Ecological Chemistry Vol. 2, Encyclopedia of Life Support Systems*. UNESCO, Francia, pp. 156-164.
- Bode, H. (1998) *Communication via Matthews P, Anglian Water Co (UK)*. Ruhrverband, Essen, Alemania.
- Bohn, H.L., McNeal, B.L. & O'Connor, G.A. (1979). *Soil Chemistry*. John Wiley & So. Inc., Nueva York. EE.UU.
- Bolan, S.N., Park, J.H., Robinson, B., Naidu, R. & Huh, K.Y. (2011) Phytostabilization: a green approach to contaminant containment. *Advances in Agronomy* **112**, 145-204.
- Bolt, G.H. & Bruggenwert, M.G.M. (1976) *Soil Chemistry: A. Basic Elements*. Developments in Soil Science 5A. Elsevier Scientific Pub, Co., Nueva York. EE.UU.
- Bonmatí, M., Jiménez, P., Álvarez, H., Calero, E., Juliá, M., Morillo, M. & Nuñez, E. (2000) Changes in enzyme activities during the reclamation of two soils from limestone quarries in Catalonia using high doses of sewage sludge. En: García, C., Hernández, M.T. (Eds.) *Research and Perspectives of Soil Enzymology in Spain*, CEBAS-CSIC, Murcia, pp. 253–293.
- Bowen, H.J.M. (1979) *Environmental Chemistry of the Elements*. Academic Press, Londres, Reino Unido, pp. 228.

- Bower, C.A., Reitemeier, R.F. & Fireman, M. (1952) Exchangable cation analysis of saline and alkali soils. *Soil Science* **73**, 251-261.
- Brady, N.C. & Weil, R.R. (2002) *The Nature and Properties of Soils*. 13<sup>a</sup> edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, Nueva Jersey. EE.UU.
- Brown, K.W. (1997) Decontamination of polluted soils. En: Iskandar, I.K., Adriano, D.C. (Eds.) *Remediation of soils contaminated with metals*. Science Reviews, Northwood, **Capítulo 3**, 47-66.
- Brown, S.L., Chaney, R.L., Angle, J.S. & Baker, A.J.M. (1994) Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and bladder campion for zinc- and cadmium contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* **23**, 1151-1157.
- Burgos, P., Pérez de Mora, A. Madejón, P., Cabrera, F. & Madejón, E. (2008) Trace elements in wild grasses: a phytoavailability study on a remediated field. *Environmental Geochemistry and Health* **30**, 109-114.
- Cabrera, F. & Madejón, E. (2014) Enmiendas para la recuperación de suelos contaminados por elementos traza. En: Cabrera, F. (Ed.) *Residuos orgánicos en la restauración/rehabilitación de suelos degradados y contaminados*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Cabrera, F. (2000) La contaminación por metales pesados en el valle del Guadiamar tras el vertido de Aznalcóllar. *Retema: Revista técnica de medio ambiente* **13, 74**, 37-48.
- Cabrera, F., Ariza, J., Madejón, P., Madejón, E. & Murillo, J.M. (2008a) Mercury and other trace elements in soils affected by the mine tailing spill in aznalcóllar (sw spain). *Science of the Total Environment* **390**, 311-322.
- Cabrera, F., Clemente, L., Díaz Barrientos, E., López, R. & Murillo, J.M. (1999) Heavy metal pollution of soils affected by the Guadiamar toxic flood. *The Science of the Total Environment* **242**, 117-129.
- Cabrera, F., Murillo, J.M., Madejón, P., Domínguez, M.T., Burgos, P., Madejón, E., Marañón, T., Pérez de Mora, A., Cordón, R., Moreno, F. & Girón., I.F. (2008b) *Los suelos del Guadiamar: Contaminación por elementos traza tras el accidente minero de Aznalcóllar*. En: La restauración ecológica del río Guadiamar y el proyecto del Corredor Verde. *Consejería de Medio Ambiente*. Junta de Andalucía, Sevilla. España. **Cap. 7**, 145-164.
- Calfapietra, C., Ainsworth, E.A. & Beier, C. et al (2010) Challenges in elevated CO<sub>2</sub> experiments on forests. *Trends in Plant Science* **15**, 5–10.



- Campbell, P.G.C. (1995) Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. En: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.) *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. John Wiley & Sons Ltd, pp. 45-102.
- Campbell, P.G.C., Stokes, P.M. & Galloway, J.N. (1983) The effect of atmospheric deposition on the geochemical cycling and biological availability of metals. En: *Heavy Metals in the Environment*. Heidelberg International Conference, CEP Consultants, Edinburgo, Reino Unido, **Vol. 2**, 760-763.
- Carreira, J.A., Viñepla, B., García-Ruiz, R., Ochoa, V. & Hinojosa, M.B. (2008) Recovery of biochemical functionality in polluted flood-plain soils: The role of microhabitat differentiation through revegetation and rehabilitation of the river dynamics. *Soil Biology and Biochemistry* **40**, 2088-2097.
- Carter, M.R., Gregorich, E.G., Angers, D.A., Beare, M.H., Sparling, G.P., Wardle, D.A. & Voroney, R.P. (1999) Interpretation of microbial biomass measurements for soil quality assessment in humid temperate regions. *Canadian Journal of Soil Science* **79**, 507-520.
- CEC (Comission of the European Communities) (1986) *Council Directive of 12 June on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture*. Oficial Journal of the Eurpean Community, No. L151/6/86/278/EEC.
- Chander, K. & Brookes, P.C. (1991) Is the dehydrogenase assay invalid as a method to estimate microbial activity in copper contaminated soils? *Soil Biology and Biochemistry* **23**, 909-915.
- Chander, K., Brookes, P.C. & Harding, S.A. (1995). Microbial biomass dynamics following addition of metal-enriched sewage sludges to a sandy loam. *Soil Biology and Biochemistry* **27**, 1049–1421.
- Chaney, R.L. (1989) Toxic element accumulation in soils and crops: protecting soil fertility and agricultural food chains. En: Bar-Yosef, B., Barrow, N.J., Goldshmid, J. (Eds.) *Inorganic Contaminants in the Vadose Zone*. Springer-Verlag, Berlin, Alemania, pp. 140–158.
- Chaney, R.L., Malik, K.M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S. & Baker, A.J.M. (1997) Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology* **8**, 279-284.

- Chaney, R.L., Broadhurst, C.L. & Centofanti, T. (2010) Phytoremediation of soil trace elements. En: Hooda, P. (Ed.) *Trace Elements in Soils*. Blackwell Publ, Oxford, Reino Unido, pp 311–352.
- Chen, S.K., Edwards, C.A. & Subler, S. (2003) The influence of two agricultural biostimulants on nitrogen transformations, microbial activity, and plant growth in soil microcosms. *Soil Biology and Biochemistry* **35**, 9–19.
- Chirko, C.P., Gold, M.A., Nguyen, P.V. & Jiang, J.P. (1996) Influence of direction and distance from trees on wheat yield and photosynthetic photon flux density ( $Q_p$ ) in a *Paulownia* and wheat intercropping system. *Forest Ecology and Management* **83**, 171-180.
- Ciadamidaro, L., Madejón P. & Madejón, E. (2014a) Soil chemical and biochemical properties under *Populus alba* growing: Three years study in trace element contaminated soils. *Applied Soil Ecology* **73**, 26–33.
- Ciadamidaro, L., Madejón, E., Puschenreiter M. & Madejón P. (2013) Growth of *Populus alba* and its influence on soil trace element availability. *The Science of the Total Environment* **454-455**, 337–347.
- Ciadamidaro, L., Madejón, E., Robinson, B. & Madejón, P. (2014b) Soil plant interactions of *Populus alba* in contrasting environments. *Journal of Environmental Management* **132**, 329-337.
- Clemente, R., Almela, C. & Bernal, M.P. (2006). A remediation strategy based on active phytoremediation followed by natural attenuation in a soil contaminated by pyrite waste. *Environmental Pollution* **143**, 397-406.
- Clemente, R., Walker, D.J. & Bernal, M.P. (2005) Uptake of heavy metals and As by *Brassica napus* grown in contaminated soil in Aznalcóllar (Spain): The effects of soil amendments. *Environmental Pollution* **138**, 46-58.
- Climent, M.D., Abad, M. & Aragón, P. (1996) *El Compost de Residuos Sólidos Urbanos (RSU). Sus Características y Aprovechamiento en Agricultura*. Ediciones y Promociones LAV S.L., Valencia, España.
- CMA (Consejería de Medio Ambiente) (2001) Corredor Verde del Guadiamar. *Consejería de Medio Ambiente*, Junta de Andalucía, Sevilla.
- CMA (Consejería de Medio Ambiente) (2003) Ciencia y Restauración del Río Guadiamar. Abril 1998–Abril 2001. *Consejería de Medio Ambiente*, Junta de Andalucía, Sevilla.

- CMA (Consejería de Medio Ambiente) (2008) La restauración ecológica del río Guadiamar y el proyecto del Corredor Verde. La historia de un paisaje emergente. *Consejería de Medio Ambiente*, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Colinet, E., Gonska, H., Griepink, B. & Muntau, H. (1983a) EUR-Report 8834 EN, Commission of the European Communities.
- Colinet, E., Gonska, H., Griepink, B. & Muntau, H. (1983b) EUR-Report 8835 EN, Commission of the European Communities.
- Compton, H., Brown, S., Henry, C. & Sprenger, M. (2001) Use of biosolids and lime to restore a metal affected ecosystem in Leadville, Co. Proc. 6th ICOBTE 2001, Guelph, Canada
- Conesa, H.M., Evangelou, M.W.H., Robinson, B.H. & Schulin, R. (2012) A Critical View of Current State of Phytotechnologies to Remediate Soils: Still a Promising Tool? *The Scientific World Journal*, Article ID 173829.
- Cooke, C.A. & Abbott, M.B. (2008) A paleolimnological perspective on industrial-era metal pollution in the central Andes, Perú. *The Science of the Total Environment* **393**, 262-272.
- Cooperband, L., Bollero, G. & Coale, F. (2002) Effect of poultry litter and composts on soil nitrogen and phosphorus availability and corn production. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **62**, 185-194.
- Dauber, J., Brown, C., Fernando, A.L., Finnan, J., Krasuska, E., Ponitka, J., Styles, D., Thrän, D., Van Groenigen, K.J., Weih, M. & Zah, R. (2012) Bioenergy from “surplus” land: Environmental and socio-economic implications. *BioRisk* **7**, 5–50.
- De la Rosa, D. (2008) *Evaluación Agro-ecológica de Suelos*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. España.
- Declercq, I., Cappuyns, V. & Duclos, Y. (2012) Monitored natural attenuation (MNA) of contaminated soils: State of the art in Europe—A critical evaluation. *The Science of the Total Environment* **426**, 339-405.
- Diaz-Barrientos, E., Madrid, L., Cabrera, F. & Contreras, M.C. (1991) Comparison of two methods of sample preparation for determination by atomic absorption spectrophotometry of heavy metals in soils and sediments. *Communications in Soil Science & Plant Analysis* **22 (15-16)**, 1559-1568.
- Dick, R.P. (1997) Enzyme activities as integrative indicators of soil health. En: Parkhurst, C.E. (Ed.) *Bioindicators of Soil Health*. CAB International, Oxon, Reino Unido.

- Dick, R.P., Breakwell, D. & Turco, R. (1996) Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrating biological indicators. En: Doran, J.W., Jones, A.J. (Eds.) *Handbook of Methods for Assessment of Soil Quality*. Soil Science Society of America Specific Publications, Madison, WI, EE.UU, pp. 242-272.
- Dickinson, N.M., & Pulford, I.D. (2005) Cadmium phytoextraction using short rotation coppice Salix: the evidence trail. *Environmental International* **31**, 609–613.
- Dilly, O. & Blume, H.P. (1998) Indicators to assess sustainable land use with reference to soil microbiology. *Advances in Geoecology* **31**, 121–128.
- Domínguez, M.T., Marañón, T., Murillo, J.M., Schulin R. & Robinson B.H. (2008) Trace element accumulation in woody plants of the Guadamar Valley, SW Spain: A large-scale phytomanagement case study. *Environmental Pollution* **152**, 50-59.
- Doran, J.W. & Safley, M. (1997) Defining and assessing soil health and sustainable productivity. En: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R. (Eds.) *Biological indicators of soil health*. CAB International, Wallingford, EE.UU, pp. 250-25.
- Doran, J.W. & Zeiss, M.R. (2000). *Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality*. Agronomy & Horticulture -- Faculty Publications. Paper 15. University of Nebraska – Lincoln, EE.UU.
- Doran, J.W., Parkin, T.B. (1994) Defining and assessing soil quality. En: Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., Stewart, B.A. (Eds.) *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. SSSA Special Pub. 34. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, EE.UU.
- Doumett, S., Fibbi, D., Azzarello, E., Mancuso, S., Mugnai, S., Petruzzelli, G. & del Bubba, M. (2011) Influence of the application renewal of glutamate and tartrate on Cd, Cu, Pb and Zn distribution between contaminated soil and paulownia tomentosa in a pilot-scale assisted phytoremediation study. *International Journal of Phytoremediation* **13**, 1-17.
- Doumett, S., Lamperi, L., Checchini, L., Azzarello, E., Mugnai, S., Mancuso, S., Petruzzelli, G. & Del Bubba, M. (2008) Heavy metal distribution between contaminated soil and Paulownia tomentosa, in a pilot-scale assisted phytoremediation study: Influence of different complexing agents. *Chemosphere* **72**, 1481-1490.
- Duffus, J.H. (2002) "Heavy metals" - a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **74**, 793-807.

- EC (2006) *Thematic Strategy for Soil Protection*. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2006:0231:FIN:EN:PDF>
- EC (2012) *The implementation of the Soil Thematic Strategy and ongoing activities*. [http://eusoiils.jrc.ec.europa.eu/library/jrc\\_soil/policy/DGENV/COM\(2012\)46\\_EN](http://eusoiils.jrc.ec.europa.eu/library/jrc_soil/policy/DGENV/COM(2012)46_EN), pp. 15.
- Eghball, B. & Power, J.F. (1999) Phosphorus- and nitrogen-based manure and compost applications: Corn production and soil phosphorus. *Soil Science Society of America Journal* **63**, 895-901.
- Eijsackers, H., Herrchen, M. & Strehlow, R. (1997) Background, major statements and conclusions. En: Herrchen, M., Debus, R., Pramanik-Strehlow, R. (Eds.) *Bioavailability as a key property in terrestrial ecotoxicity assessment and evaluation*. Proceedings of the European Workshop at the Fraunhofer-Institute for Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Schmallenberg, Fraunhofer IRB Verlag, Stuttgart, Alemania, pp. 7-12.
- Eivazi, F. & Tabatabai, M.A. (1990) Factors affecting glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **20**, 601-606.
- Ellis, R.J., Morgan, P., Weightman, A.J. & Fry, J.C. (2003). Cultivation dependant and independant approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal contaminated soil. *Applied Environmental Microbiology* **69**, 3223–3230.
- Ermst, W.H.O., Verkleij, J.A.C. & Schat, H. (1992) Metal tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica*. **41**, 229-248.
- Essl, F. (2007) From ornamental to detrimental? The incipient invasion of Central Europe by *Paulownia tomentosa*. *Preslia* **79**, S. 377–389.
- Evanko, C.R. & Dzombak, D.A. (1997) *Remediation of metal-contaminated soils and groundwater*. Technology Repost TE-97-01. Ground-water remediation Techonlogies Analysis Center (GWRTAC), Pittsburgh, PA, EE.UU.
- Fabiani, A., Gamalero, E., Castaldini, M., Cossa, G.P., Musso, C., Pagliai, M. & Berta, G. (2009) Microbiological polyphasic approach for soil health evaluation in an Italian polluted site. *The Science of the Total Environment* **407**, 4954-4964.
- Fernández Caliani, J.C. (2008) Una Aproximación al Conocimiento del Impacto Ambiental de la Minería en la Faja Piritica Ibérica. *Macla* **10**, 24-28.
- Förstner, U. (1999) Introduction. En: Azcue, J.M. (Ed.). *Environmental Impacts of Mining activities*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Alemania, pp. 1-3.

- Freitas, H., Prasad, M.N.V. & Pratas, J. (2004) Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of São Domingos mine in the south east of Portugal: environmental implications. *Environment International* **30**, 65-72.
- Frische, T., Mebes, K.H. & Filser, J. (2003) *Assessing the bioavailability of contaminants in soils: a review on recent concepts*. Environmental Research of the Federal Ministry of the Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety. Research Report 201 64 214. UBA-FB 000405. Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt), Section IV 2.3. Carsta Hufenbach, Berlin, Alemania.
- Gambrell, R.P. (1994). Trace and toxic metals in wetlands: a review. *Journal of Environmental Quality* **23**, 883-891.
- García Izquierdo, C. & Lobo Bedmar, M. (2007) Rehabilitación de suelos degradados y contaminados mediante la aplicación de compost. En: Moreno Casco, J., Moral Herrero, R. (Eds.) *Compostaje*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. **Capítulo 18**, pp. 425-448.
- García, C., Hernández, T., Roldán, A., Albaladejo, J. & Castillo, V. (2000) Organic amendment and mycorrhizal inoculation as a predict in afforestation of soils with *Pinus halepensis* Miller: effect on their microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry* **32**, 1173–1181.
- García, E., Garcia, C. & Hernandez, T. (2012) Evaluation of the suitability of using large amounts of urban wastes for degraded arid soil restoration and C fixation. *European Journal Soil Science* **63**, 650-658.
- García-Ruiz, R., Ochoa, V., Hinojosa, M.B. & Carreira, J.A. (2008) Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry* **40**, 2137–2145.
- Gee, G.W. & Bauder, J.W. (1986) Particle size analysis. En: *Methods of soil analysis. Part I. Physical and Mineralogical Methods*. Agronomy n° 9, 2ª edición, ASA.
- Geebelen, W., Adriano, D.C., Van der Lelie, D. & Vangronsveld, J.C. (2003) Selected bioavailability assays to test the efficacy of amendment-induced immobilization of lead in soils. *Plant Soil* **249**, 217-228.
- Gil Sotres, F., Trasar Cepeda, C., Leirós, M.C. & Seoane, S. (2005) Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 877-887.

- Giller, K.E., Witter, E. & McGrath, S.P. (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology & Biochemistry* **30**, 1389-1414.
- Gil-Sostrés, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C. & Seoane, S. (2005) Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 877-887.
- Grimalt, J.O., Ferrer, M. & McPherson, E. (1999) The mine tailing accident in Aznalcóllar. *The Science of the Total Environment* **242**, 3-11.
- Gurvich, D.E., L. Enrico, and A.M. Cingolani. (2005) Linking plant functional traits with post-fire sprouting vigour in woody species in central Argentina. *Austral Ecology* **30**, 789-796.
- Gustafsson, H.E., Lundgren, T., Lindvall, M., Lindahl, L-A., Eriksson, N., Jönaon, H., Broman, P.G. & Göransson, T. (1999) The swedish acid mine drainage experience: research, development and practice. En: Azcue, J.M. (Ed.) *Environmental Impacts of Mining activities*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Alemania, pp. 203-228.
- Hamade, R. & Osame, M. (1996) Minamata disease and other mercury syndromes. En: Chang, L.W. (Ed.) *Toxicology of metals*. CRC Press, Boca Raton, FL, EE.UU., pp. 337-351.
- Hamelink, J.L., Landrum, P.F., Bergman, H.F. & Benson, W.H. (1994) *Bioavailability: Physical, chemical, and biological interactions*. SETAC Publication Series. Proceedings of the thirteenth Pellston workshop, Pellston, MI, 17-22 August 1992. Lewis Publishers, Boca Raton, EE.UU.
- Hanley, M. & Fenner, M. (2001) Growth of aleppo pine (*pinus halepensis*) deprived of single mineral nutrients. *Journal Mediterranean Ecology* **2**, 107-112.
- Hartley, W., Uffindell, L., Plumb, A., Rawlinson, H.A., Putwain, P. & Dickinson, N.M. (2008) Assessing biological indicators for remediated anthropogenic urban soils. *The Science of the Total Environment* **405**, 358-369.
- Hazelton, P., Murphy, B., 2007. *Interpreting soil test results: what do all the numbers mean?*. CSIRO Publishing, Collinwood, Victoria, Australia.
- Hernández, M.T. & García, C. (2014) Enmiendas para la recuperación ecosostenible de los suelos. En: Cabrera, F., (Ed) *Residuos orgánicos en la restauración/rehabilitación de suelos degradados y contaminados*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Hesse, P.R. (1971) *A Textbook of Soil Chemical Analysis*. Chemical Publishing Co. Inc., Nueva York, pp 255-300.

- Hinojosa, M.B., García-Ruiz, R., Viñepla, B. & Carreira, J.A. (2004) Microbiological rates and enzyme activities as indicators of functionality in soils affected by the Aznalcóllar toxic spill. *Soil Biology and Biochemistry* **36**, 1637–1644.
- Hodson, M.E. (2004) Heavy metals - geochemical bogey men? *Environmental Pollution* **129**, 341-343.
- Houba, V.J.G., Lexmond, T.M., Novozamsky, I. & Van Der Lee, J.J. (1996) State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *The Science of the Total Environment* **178**, 21-28.
- Hoyt, P.B. & Turner, R.C. (1975) Effects of organic materials added to a very acid soil on pH, aluminium, exchangeable NH<sub>4</sub> and crop yield. *Soil Science* **119**, 227-237.  
<http://digitalcommons.unl.edu/agronomyfacpub/15>
- IEA (2009) *Bioenergy: A sustainable and Reliable energy source. A review of status and prospects*. International Energy Agency (IEA), Paris, Francia.
- Impellitteri, C.A. & Allen, H.A. (2006) Effect of humic substances on attenuation of metals: bioavailability and mobility in Soil. En: Hamon, R., McLaughlin, M., Lombi, E. (Eds.) *Natural attenuation of trace element availability in soils*. CRC Press, EE.UU. **Capítulo 6**, 89-112.
- ISO (1995) *Soil quality, Extraction of trace elements soluble in aqua-regia*, ISO 11466.
- ITGE (1998) *Contribución al establecimiento del fondo geoquímico previo a la rotura de la balsa minera de Aznalcóllar, en el aluvial del río Guadiamar (Sector Aznalcóllar-Entremuros)*. Instituto Tecnológico Geominero de España, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.
- Jiang, X.J., Luo, Y.M., Liu, S.L., Ding, K.Q., Wu, S.C., Zhao, Q.G. & Christie, P. (2003) Changes in soil microbial biomass and Zn extractability over time following Zn addition to a paddy soil. *Chemosphere* **50**, 855-861.
- Jiang, Z-F., Huang, S-Z., Han, Y-L., Zhao, J-Z. & Fu, J-J. (2012) Physiological response of Cu and Cu mine tailing remediation of *Paulownia fortunei* (Seem) Hemsl. *Ecotoxicology* **21**, 759–767.
- Jones, A. (editor) (2012) *The State of Soil in Europe : A contribution of the JRC to the European Environment Agency's Environment State and Outlook Report— SOER 2010*. JRC Reference Reports. Publications Office of the European Union.
- Jones, D.L., Hodge, A. & Kuzyakov, Y. (2004) Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist* **163**, 459–80.



- Jones, K.C. (1991) Contamination trends in soils and crops. *Environmental Pollution* **69**, 311- 326.
- Kabata-Pendias, A. & Adriano, C. (1995) *Trace metals. En: J.E.Rehceigl (Ed) Soils amendments and environmental quality.* CRC, Lewis Pub, Boca Raton, EE.UU. **Capítulo 4**, 139-167.
- Kabata-Pendias, A. & Pendias, H. (2001) *Trace Elements in Soils and Plants*, 3<sup>a</sup> ed. CRC Press, Boca Raton, FL, EE.UU. pp. 432.
- Kabata-Pendias, A. & Pendias, H. (1992) *Trace Elements in Soils and Plants*, 2<sup>a</sup> ed. CRC Press, Boca Raton, FL, EE.UU. pp. 365.
- Kabata-Pendias, A. (2004) Soil-plant transfer of heavy metals -- an environmental issue. *Geoderma* **122**, 143-149.
- Kahn, A.G., Kuek, C., Chaudhry, T.M., Khoo, C.S. & Hayes, W.J. (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytichelators in heavy metal contaminated land remedaiton. *Chemosphere* **41**, 197-207.
- Kamnev, A.A. & van der Lelie, D. (2000) Chemical and biological parameters as tools to evaluate and improve heavy metal phytoremediation. *Bioscience Reports* **20**, 239-258.
- Kandeler, E. & Gerber, H. (1988) Short-Term assay of soil urease activity using colorimetric determination ammonium. *Biology and Fertility of Soil* **6**, 68-72.
- Kandeler, E., Kampichler, C. & Horak, O. (1996) Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils* **23**, 299–306.
- Kandeler, E., Stemmer, M. & Klimanek, E.M. (1999) Response of soil microbial biomass, urease, and xylanase within particle size fraction to long-term soil management. *Soil Biology and Biochemistry* **31**, 261–273.
- Kidd, P., Barceló, J., Bernal, M. P., Navari-Izzo, F., Poschenrieder, C., Shilev, S., Clemente, R. & Monterroso, C. (2009) Trace element behaviour at the root–soil interface: Implications inphytoremediation. *Environmental and Experimental Botany* **67**, 243–259.
- Klang-Westin, E., & Eriksson, J. (2003) Potential of Salix as a phytoextractor for Cd and moderately contaminated soils. *Plant & Soil* **249**, 127–137.
- Knox, A., Seaman, J.C., Mench, M.J. & Vangronsveld, J. (2001) Remediation of metal- and radionuclides-contaminated soils by in situ stabilization techniques. En:

- Iskandar, I.K. (Ed.) *Environmental restoration of metal-contaminated soils*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, ERE.UU.
- Kozdrój, J. & van Elsas, J.D. (2000). Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology & Biochemistry* **32**, 1405-1417.
- Kumpiene, J. (2010) Trace element immobilization in soil using amendments. En: Hooda, P.S. (Ed.) *Trace elements in Soils*. Wiley-Blackwell, Chichester, Reino Unido. **Capítulo 15**, 353-380.
- Kuperman, R.G. & Carreiro, M.M. (1997) Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* **29**, 179-190.
- Kuppinger, D.M., Jenkins, M.A. & White, P.S. (2010) Predicting the post-fire establishment and persistence of an invasive tree species across a complex landscape. *Biological Invasions* **2**, 3473-3484.
- Lal, R., Kimble, J.M., Follet, R.F. & Cole, C.V. (1998) *The potential of US cropland to sequester carbon and mitigate the greenhouse effect*. Sleeping bear Press, Ann Arbor, MI, EE.UU. pp 128.
- Landner, L., Oberg, M.O. & Aringberg-Laavatz. (1995) *Cadmium in Fertilizers*. OECD workshop, Stockholm, Suecia.
- Larchevêque, M., Ballini, C., Korboulewsky, N. & Montès, N. (2006) The use of compost in afforestation of Mediterranean areas: Effects on soil properties and young tree seedlings. *The Science of the Total Environment* **369**, 220-230.
- Larney, F.J. & Angers, D.A. (2012) The role of organic amendments in soil reclamation: A review. *Canadian Journal of Soil Science* **92**, 19-38.
- Larney, F.J., Janzen, H.H., Olson, B.M. & Olson, A.F. (2009) Erosion-productivity-soil amendment relationships for wheat over 16 years. *Soil and Tillage Research* **103**, 73-83.
- Lavoie, J-M., Capek-Menard, E. & Chornet, E. (2010) Evaluation of the co-product pulp from *Salix viminalis* energy crops. *Biomass and Bioenergy* **34**, 1342-1347.
- Lee, I.S., Kim, O.K., Chang, Y.Y., Bae, B., Kim, H.H. & Baek, K.H. (2002) Heavy metal concentrations and enzyme activities in soil from a contaminated Korean shooting range. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **94**, 406-411.
- Lena, Q.M. & Gade, R.N. (1997) Chemical fractionation of cadmium, copper, nickel, and zinc in contaminated soils. *Journal of Environmental Quality* **26**, 259-264.

- Leyval, C. & Berthelin, J. (1993) Rhizodeposition and net release of soluble organic compounds by pine and beech seedlings inoculated with rhizobacteria and ectomycorrhizal fungi. *Biology and Fertility of Soils* **15**, 259–267.
- Lombi, E., Zhao, F.J., Zhang, G., Sun, B., Fitz, W., Zhang, H. & McGrath, S.P. (2002b) In situ fixation of metals in soils using bauxite residue: Chemical assessment. *Environmental Pollution* **118**, 435-443.
- López Piñeiro, A., Albarrán, A., Nunes, J.M.R. & Barreto, C. (2008) Short and medium-term effects of two-phase olive mill waste application on olive grove production and soil properties under semiarid mediterranean conditions. *Bioresource Technology* **99**, 7982-7987.
- López-Pamo, E., Baretino, D., Antón-Pacheco, C., Ortiz, G., Arránz, J.C., Gumiel, J.C., Martínez-Pledel, M., Aparicio, O. & Montouto, O. (1999) The extent of the Aznalcóllar pyritic sludge spill and its effects on soils. *The Science of the Total Environment* **242**, 57-88.
- López-Piñeiro, A., Murillo, S., Barreto, C., Muñoz, A., Rato, J.M., Albarrán, A. & García, A. (2007) Changes in organic matter and residual effect of amendment with two-phase olive-mill waste on degraded agricultural soils. *The Science of the Total Environment* **378**, 84-89.
- Lucas-Borja, M.E., Wic-Baena, C., Moreno J.L., Tarek, D., García, C. & Andrés-Abellán, M. (2011) Microbial activity in soils under fast-growing Paulownia (*Paulownia elongata* x *fortunei*) plantations in Mediterranean areas. *Applied Soil Ecology* **51**, 42-51.
- Macek, T., Makova, M. & Mas, J. (2000) Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances* **18**, 23-34.
- Madejón P., Alaejos J., García-Álbala J., Fernández M. & Madejón E. Three-year study of fast-growing trees in degraded soils amended with composts: effects on soil fertility and productivity. *Journal of Environmental Management* (en revision).
- Madejón, E., Burgos, P., López, R. & Cabrera, F. (2003a) Agricultural use of three organic residues: effect on orange production and on properties of a soil of the «Comarca Costa de Huelva» (SW Spain). *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **65**, 281–288.
- Madejón, E., López, R., Murillo, J.M. y Cabrera, F. (2001) Agricultural use of three (sugarbeet) vinasse composts: effect on crops and on chemical properties of a soil of

- the Guadalquivir river valley (SW Spain). *Agriculture, Ecosystems & Environment* **84**, 55-65.
- Madejón, E., Madejón, P., Pérez de Mora, A., Burgos, P. & Cabrera, F. (2009a) Trace elements, pH and organic matter evolution in contaminated soils under assisted natural remediation: a four-year field study. *Journal of Hazardous Materials* **162**, 931-938.
- Madejón, E., Pérez de Mora, A., Felipe, E., Burgos, P. & Cabrera, F. (2006a) Soil amendments reduce trace element solubility in a contaminated soil and allow regrowth of natural vegetation. *Environmental Pollution* **139**, 40-52.
- Madejón, P. & Lepp, N.W. (2007) Arsenic in soils and plants of woodland regenerated on an arsenic-contaminated substrate: A sustainable natural remediation? *The Science of the Total Environment* **379**, 256-262.
- Madejón, P. (2004) *Elementos traza y nutrientes en plantas y suelos afectados por el vertido minero de Aznalcóllar*. Tesis doctoral, Sevilla, España.
- Madejón, P., Burgos, P., Murillo, J.M., Cabrera, F., & Madejón, E. (2009b) Bioavailability and accumulation of trace elements in soils and plants of a highly contaminated estuary (Domingo Rubio tidal channel, SW Spain) *Environmental Geochemistry and Health* **31**, 629-642
- Madejón, P., Marañón, T., Murillo, J.M. & Robinson, B. (2004) White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests. *Environmental Pollution* **132**, 145-155.
- Madejón, P., Murillo, J.M., Marañón, T. & Cabrera, F. (2006b) Bioaccumulation of trace elements in a wild grass three years after the Aznalcóllar mine spill (south Spain). *Environmental Monitoring and Assessment* **114**, 169-189.
- Madejón, P., Murillo, J.M., Marañón, T. & Lepp, N.W. (2007) Factors affecting accumulation of thallium and other trace elements in two wild Brassicaceae spontaneously growing on soils contaminated by tailings dam waste. *Chemosphere* **67**, 20-28.
- Madejón, P., Murillo, J.M., Marañón, T., Cabrera, F. & López, R. (2002) Bioaccumulation of As, Cd, Cu, Fe and Pb in wild grasses affected by the Aznalcóllar mine spill (SW Spain). *The Science of the Total Environment* **290**, 105-120.

- Madejón, P., Murillo, J.M., Marañón, T., Cabrera, F. & Soriano, M.A. (2003b) Trace element and nutrient accumulation in sunflower plants two years after the Aznalcóllar mine spill. *The Science of the Total Environment* **307**, 239–257.
- Madejón, P., Perez-de-Mora, A., Burgos, P., Cabrera, F., Lepp, N.W. & Madejón, E. (2010) Do amended, polluted soils require re-treatment for sustainable risk reduction? - Evidence from field experiments. *Geoderma* **159**, 174-181.
- Madrid, L. (2010) "Heavy metals": Reminding a long-standing and sometimes forgotten controversy. *Geoderma* **155**, 128-129.
- Majer, B.J., Tschirko, D., Paschke, A., Wennrich, R., Kundi, M., Kandeler, E. & Knasmüller, S. (2002). Effects of heavy metal contamination on micronucleus induction in *Traescandia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **515**, 111–124.
- Marschner, H. & Romheld, V. (1983) In vivo measurement of root-induced pH changes at the soil–root interface: effect of plant species and nitrogen source. *Plant Physiology* **111**, 241–251.
- Martin, J.K. & Merckx, R. (1992) The partitioning of photosynthetically fixed carbon within the ryzosphere of barley and wheat. *Soil Biology & Biochemistry* **4**, 1147-1156.
- Mayor, X. & Rodà, F. (1994) Effects of irrigation and fertilization on stem diameter growth in a mediterranean holm oak forest. *Forest Ecology and Management* **68**, 119-126.
- McGrath, S. P., Zhao, J. & Lombi, E. (2002) Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Advances in Agronomy* **75**, 1-56.
- McLaughlin, M.J. (2001) Bioavailability of metals to terrestrial plants. En: Allen, h.E. (Ed.) *Bioavailability of metals in terrestrial ecosystems. Importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes and plants*. SETAC Press, Pensacola, FL, EE.UU.
- Meers, E., Lamsal, S., Vervaeke, P., Hopgood, M., Lust, N. & Tack ,F.M.G. (2005) Availability of heavy metals for uptake by *Salix viminalis* on a moderately contaminated dredged sediment disposal site. *Environmental Pollution* **137**, 354–364.
- Meers, E., Unamuno, V.R., Du Laing, G., Vangronsveld, J., Vanbroekhoven, K., Samson, R., Diels, L., Geebelen, W., Ruttens, A., Vandegheuchte, M. & Tack,

- F.M.G. (2006) Zn in the soil solution of unpolluted and polluted soils as affected by soil characteristics. *Geoderma* **136**, 107-119.
- Melero, S., López-Bellido, R.J., López-Bellido, L., Muñoz-Romero, V., Moreno, F. & Murillo, J.M. (2011) Long-term effect of tillage, rotation and nitrogen fertiliser on soil quality in a Mediterranean vertisol. *Soil and Tillage Research* **114**, 97-107.
- Melero, S., Vanderlinden, K., Ruiz, J.C. & Madejón, E., (2008) Long-term effect on soil biochemical status of a vertisol under conservation tillage system in semi-arid Mediterranean conditions. *European Journal of Soil Biology* **44**, 437-442.
- Mench, M., Lepp N., Bert, V., Schwitzguébel, J.-P., Gawronski, S.W., Schröder, P. & Vangronsveld, J. (2010) Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. *Journal of Soil and Sediments* **10**, 1039-1070.
- Mench, M., Schwitzguébel, J.P., Schröder, P., Bert, V., Gawronski, S. & Gupta, S. (2009) Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environmental Science and Pollution Research* **16**, 876-900.
- Méndez, M.O. & Maier, R.M. (2008) Phytostabilization of mine tailings in arid and semiarid environments—an emerging remediation technology. *Environmental Health Perspectives* **116**, 278-283.
- Mertens, J., Van Nevel, L., De Schrijver, A., Piesschaert, F., Osterbaan, A., Tack, F.M.G. & Verheyen, K. (2007) Tree species effect on the redistribution of soil metals. *Environmental Pollution* **149**, 173-181
- Mills, H., & Jones, J.B. (1991) *Plant analysis hand book II*. MicroMacro Publishing, Inc., EE.UU.
- Mohammad, M.J. & Athamneh, B.M. (2004) Changes in soil fertility and plant uptake of nutrients and heavy metals in response to sewage sludge application to calcareous soils. *Journal of Agronomy* **3**, 229-236.
- Mokolobate, M.S. & Haynes, R.J. (2002) Comparative liming effect of four organic residues applied to an acid soil. *Biology and Fertility of Soils* **35**, 79-85.
- Moreno, B., Garcia-Rodriguez, S., Cañizares, R., Castro, J. & Benítez, E. (2009) Rainfed olive farming in south-eastern Spain: Long-term effect of soil management on biological indicators of soil quality. *Agriculture Ecosystems & Environment* **131**, 333-339.

- Moreno, B., Nogales, R., MacCi, C., Masciandaro, G. & Benitez, E. (2011) Microbial eco-physiological profiles to estimate the biological restoration of a trichloroethylene-contaminated soil. *Ecological Indicators* **11**, 1563-1571.
- Moreno, J.L., García, C. & Hernández, T. (2003) Toxic effect of cadmium and nickel on soil enzymes and the influence of adding sewage sludge. *European Journal of Soil Science* **54**, 377-386.
- Moreno, J.M. (2005) *Principales conclusiones de la evaluación preliminar de los impactos en España por efecto del cambio climático*. Secretaría General Técnica, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, España.
- Murphy, J. & Riley, J.P. (1962) A modified single method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* **27**, 31-36.
- Naidu, R., Krishnamurti, G.S.R., Bolan, N.S., Wenzel, W. & Megharaj, M. (2001) Heavy metal interactions in soils and implications for soil microbial biodiversity. En: Prasad, M.N.V. (Ed.) *Metals in the Environment. Analysis by Biodiversity*. Marcel Dekker Inc., Nueva York. EE.UU. pp 401-431.
- Nannipieri, P., Ceccanti, B., Cervelli, S. & Matarese E. (1980) Extraction of phosphatase, urease, protease, organic carbon and nitrogen from soil. *Soil Science Society of America Journal* **44**, 1011-1016.
- Naramabuye, F.X. & Haynes, R.J. (2006) Effect of organic amendments on soil pH and Al solubility and use of laboratory indices to predict their liming effect. *Soil Science* **171**, 754-763.
- Nicolás, C. Hernández, T. & Garcia C. (2012) Organic amendments as strategy to increase organic matter in particle-size fractions of a semiarid soil. *Applied Soil Ecology* **57**, 50-58.
- Nielsen, M.N. & Winding, A. (2002) *Microorganisms as indicators of soil health*. Technical Report No. 388. National Environmental Research Institute, Dinamarca.
- Nye, P.H. (1981) Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. *Plant & Soil* **61**, 7-26.
- Obbard, P. (2001) Measurement of dehydrogenase activity using 2-piodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyltetrazolium chloride (INT) in the presence of copper. *Biology and Fertility of Soils* **33**, 328-330.
- Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S. & Dean, L.A. (1954) *Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate*. U.S. Department of Agriculture, Report 939. EE.UU.

- Panagos, P., Van Liedekerke, M., Yigini, Y. & Montanarella, L. (2013) Contaminated sites in Europe: review of the current situation based on data collected through a European network. *Journal of Environmental and Public Health* ID 158764.
- Pankhurst, C.E., Hawke, B.G., McDonald, H.J., Kirkby, C.A., Buckerfield, J.C., Michelsen, P., O'Brien, K.A., Gupta, V.V.S.R. & Doube, B.M. (1995) Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **35**, 1015–1028.
- Pardo, T., Bernal, M.P. & Clemente, R. (2014) Efficiency of soil organic and inorganic amendments on the remediation of a contaminated mine soil: I. Effects on trace elements and nutrients solubility and leaching risk. *Chemosphere* **107**, 121-128.
- Paredes, C., Cegarra, J., Bernal, M.P. & Roig, A. (2005) Influence of olive mill wastewater in composting and impact of the compost on a Swiss chard crop and soil properties. *Environment International* **31**, 305-312.
- Park, J.H., Lamb, D., Paneerselvam, P., Choppala, G., Bolan, N. & Chung, J.W. (2011) Role of organic amendments on enhanced bioremediation of heavy metal(loid) contaminated soils. *Journal of Hazardous Material* **185**, 549-574.
- Pastor, J. & Hernández, A.J. (2002) Estudio de suelos de vertederos sellados y de sus especies vegetales espontáneas para la fitorrestauración de suelos degradados y contaminados del centro de España. *Anales de Biología* **24**, 145–153.
- Pennanen, T., Perkiömäki, J., Kiikilä O., Vanhala, P., Neuhoven, S. & Fritze, H. (1998) Prolonged, simulated acid rain and heavy metal deposition: separated and combined effects on forest soil microbial community structure. *FEMS Microbiology Ecology* **27**, 291–300.
- Pérez de Mora, A., Burgos, P., Madejón, E., Cabrera, F., Jaeckel, P. & Schloter, M. (2006a) Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments. *Soil Biology and Biochemistry* **38**, 327-341.
- Pérez de Mora, A., Madejón, E., Burgos, P. & Cabrera, F. (2006b) Trace element availability and plant growth in a mine-spill contaminated soil under assisted natural remediation I. Soils. *The Science of the Total Environment* **363**, 28-37.
- Pérez de Mora, A., Madejón, E., Burgos, P. & Cabrera, F. (2006c) Trace element availability and plant growth in a mine-spill-contaminated soil under assisted natural remediation. II. Plants. *The Science of the Total Environment* **363**, 38-45.



- Pérez de Mora, A., Madejón, P., Burgos, P., Cabrera, F., Lepp, N.W. & Madejón, E. (2011) Phytostabilization of semiarid soils residually contaminated with trace elements using by-products: Sustainability and risks. *Environmental Pollution* **159**, 3018-3027.
- Pérez de Mora, A., Madrid, F., Cabrera, F. & Madejón, E. (2007) Amendments and plant cover influence on trace element pools in a contaminated soil. *Geoderma* **139**, 1-10.
- Pérez de Mora, A., Ortega-Calvo, J.J., Cabrera, F. & Madejón, E. (2005) Changes in enzyme activities and microbial biomass after "in situ" remediation of a heavy metal-contaminated soil. *Applied Soil Ecology* **28**, 125-137.
- Petruzzelli, G. (1997) Soil sorption of heavy metals. Ecological Issues and Environmental Impact Assessment. En: Cheremisinoff, P.N. (Ed.) *Advances in Environmental Control Technology Series*. Gulf Publishing Company, Houston/London. **Capítulo 5**, 145-174.
- Pfeifer, H.R., Derron, M.H., Rey, D., Schlegal, C., Atteia, O., Dalla Piazza, R., Dubois, J.P. & Mandia, Y. (2000) Natural trace element input into the soil-sediment-water-plant system: examples of background and contaminated situations in Switzerland, Eastern France and Northern Italy. En: Markert, B., Friese, K. (Eds.) *Trace Elements: their distribution and effects in the environment*. Elsevier, Oxford, Reino Unido. pp. 33-86.
- Pickering, W.F. (1986) Metal ion speciation- soils and sediments. *Ore Geological Reviews* **1**, 83-146.
- PICOVER (2000) *Programa de Investigación del Corredor Verde del Guadiamar 1999-2002*. Junta de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente.
- Porta, J., López-Acevedo, M. & Roquero, C. (2003) *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. 3ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. pp. 960.
- Pugnaire, F.I. & Chapin III, F.S. (1993) Controls over nutrient resorption from leaves of evergreen Mediterranean species. *Ecology* **74**, 124-129.
- Pugnaire, F.I. (2001) Variability of inorganic nutrient concentrations in leaves. *New Phytologist* **150**, 499-507.
- Pulford, I.D. & Watson, D. (2003) Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. *Environment International* **29**, 529– 540.
- Querol, X., Alastuey, A., López-Soler, A., Plana, F., Mesas, A., Ortiz, L., Alzaga, R., Bayona, J.M. & de la Rosa, J. (1999) Physico-chemical characterization of

- atmospheric aerosols in a rural area affected by the Aznalcollar toxic spill, southwest Spain during the soil reclamation activities. *The Science of the Total Environment* **242**, 89-104.
- Quevauliller, P.H., Lachica, M., Barahona, E., Gomez, A., Rauret, G., Ure, A. & Muntau, H. (1998) Certified reference material for the quality control of EDTA- and DTPA extractable trace element contents in calcareous soil (CRM 600). *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **360**, 505-511.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N.V. & Freitas, H. (2012) Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. Research review paper. *Biotechnology Advances* **30**, 1562–1574.
- Ramos, L., Hernandez, L.M. & Gonzales, M.J. (1994) Sequential fractionation of copper, lead, cadmium and zinc in soil from or near Doñana national park. *Journal of Environmental Quality* **23**, 50–57.
- Rauret, G., López Sánchez, J.F., Sahuquillo, A., Rubio, R., Davidson, C., Ure, A. & Quevauliller, P.H. (1999) Improvement of the three step sequential extraction procedure prior to the certification of the new sediment and soil reference materials. *Journal of Environment Monitoring* **1**, 57-61.
- Rauret, G., Rubio, R. & López-Sánchez, J.F. (1989) Optimization of Tessier procedure for metal solid speciation in river-sediments. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **36**, 69-83.
- Real Decreto 9/2005 (2005) BOE 1833-1843.
- Remón, E., Bouchardon, J.L., Le Guédard, M., Bessoule, J.J. & Conord, C. (2013) Are plants useful as accumulation indicators of metal bioavailability? *Environmental Pollution* **175**, 1–7.
- REN21 (2013) *Renewables Global Status Report (GSR)REN21. Renewables 2013 Global Status Report. Renewable Energy Network for the 21th Century*. (Paris: REN21 Secretariat). ISBN 978-3-9815934-0-2.
- Renella, G., Landi, L., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Pietramellara, G. & Mench, M. (2008) Long-term effects of aided phytostabilisation of trace elements on microbial biomass and activity, enzyme activities, and composition of microbial community in the Jales contaminated mine spoils. *Environmental Pollution* **152**, 702–712.
- Robinson, B.H., Mis, T.M., Petit, D., Fung, L.E., Green, S.R. & Clothier, B.E. (2000) Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant & Soil* **227**, 301-306.

- Robinson, Brett, H., Bañuelos, G., Conesa, H.M., Evangelou, M.W.H. & Schulin, R. (2009) The phytomanagement of trace elements in soil. *Critical Reviews in Plant Science* **28**, 240–266.
- Ross, S.M. (1994) Sources and forms of potentially toxic metals in soil-plant systems. En: Ross, S.M. (Ed.) *Toxic Metals in Soil-Plant Systems*. Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido. pp 3-25.
- Rossel, D., Tarradellas, J., Bittom, G. & Morel, J.L. (1997) Use of enzymes in soil ecotoxicology: a case for dehydrogenase and hydrolytic enzymes. En: Tarradellas, J., Bitton, G., Rossel, D. (Eds.) *Soil Ecotoxicology*. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Ratón, FL, EE.UU.
- Salt, D.E., Smith, R.D. & Raskin, I. (1998) Phytoremediation. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 643-668.
- Sardans, J., Rodà, F. & Peñuelas, J. (2004) Phosphorus limitation and competitive capacities of *Pinus halepensis* and *Quercus ilex* subsp. *rotundifolia* on different soils. *Plant Ecology* **174**, 305-317.
- Sartori, F., Lai, R., Ebinger, M.H. & Parrish, D.J. (2006) Potential soil carbon sequestration and CO<sub>2</sub> offset by dedicated energy crops in the USA. *Critical Reviews in Plant Sciences* **25**, 441-472.
- SECOVER (2004) *Plan de Seguimiento Ecorregional del Paisaje Protegido Corredor Verde del Guadiamar*. Junta de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente.
- Seoánez Calvo., M. (1999) *El Gran Diccionario del Medio Ambiente y de la Contaminación*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Seybold, C.A., Herrick, J.E. & Brejda, J.J. (1999) Soil resilience: a fundamental component of soil quality. *Soil Science* **164**, 224–234.
- Shortall, O.K. (2013) “Marginal land” for energy crops: Exploring definitions and embedded assumptions. *Energy Policy* **62**, 19–27.
- Shuman, L.M. (1985) Fractionation method for soil micronutrients. *Soil Science* **140**, 11-22.
- Sijm, D., Kraaij, R. & Belfroid, A. (2000) Bioavailability in soil or sediment: exposure of different organisms and approaches to study it. *Environmental Pollution* **108**, 113-119.
- Simón, M., Ortiz, I., García, I., Fernández, E., Fernández, J., Dorronsoro, C. & Aguilar, J. (1999) Pollution of soils by the toxic spill of a pyrite mine (aznalcollar, Spain). *The Science of the Total Environment* **242**, 105-115.

- Sims, R.H., Hasting, A., Schlamadinger, B., Taylor, G. & Smith, P. (2006) Energy crops: current status and future prospects. *Global Change Biology* **12**, 2054–2076.
- Six, J., Elliot, E.T. & Paustian, K. (2000) Soil macroaggregate turnover and microaggregate formation: a mechanism for C sequestration under non-tillage agriculture. *Soil Biology & Biochemistry* **32**, 2099-2103.
- Soil Survey Staff (1996) *Keys to Soil Taxonomy*. US Department of Agriculture, Soil Conservation Service, Washington D.C. EE.UU.
- Solé, M., Casas, J.M. & Lao, C. (2003) Removal of Zn from aqueous solutions by low-rank coal. *Water, Air and Soil Pollution* **144**, 57-65.
- Sopper, WE. (1993) *Municipal Sludge use for Land Reclamation*. Lewis Publishers, Ann Arbor, MI. EE.UU.
- Speir, T.W. & Ross, D.J. (2002) Hydrolytic enzyme activities to assess soil degradation and recovery. En: Burns, R.G., Dick R.P. (Eds.) *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, Nueva York, EE.UU. pp. 407–431.
- Steinweg, J.M., Dukes, J.S., Paul, E.A. & Wallenstein, M.D. (2013) Microbial responses to multifactor climate change: effects on soil enzymes. *Frontiers in Microbiology* **4**, 146 (1-11).
- Steinweg, M., Dukes, J.S., & Wallenstein, M.D. (2012) Modeling the effects of temperature and moisture on soil enzyme activity: linking laboratory assays to continuous field data. *Soil Biology and Biochemistry* **55**, 85–92.
- Szott, L.T., Palm, C.A., Sanchez, P.A., (1991) Agroforestry on acid soils of the humid tropics. *Advances in Agronomy* **45**, 275–300.
- Tabatabai, M.A. & Bremner, J.M. (1970) Arylsulphatase activity of soils. *Soil Science Society of America Proceeding* **34**, 225–229.
- Tabatabai, M.A. (1982) Soil enzymes, En: Page, A.L., Miller, E.M., Keeney, D.R., (Eds.) *Methods of Soil Analyses. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, American Society of Agronomy, Madison, WI, EE.UU. pp. 903–947.
- Tejada, M., Hernández, M.T. & García, C. (2006) Application of Two Organic Amendments on Soil restoration: effects on the soil biological properties. *Journal of Environmental Quality* **35**, 1010-1017.
- Terry, R.E. (1998) Use of soil conditioners to enhance and speed bioremediation of contaminated soils. En: Wallace, A., Terry, R.E. (Eds.) *Handbook of Soil*

- Conditioners. Substances that Enhance the Physical Properties of Soils*. Marcel Dekker, Inc., New York, EE.UU. pp. 551-573.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C. & Bisson, M. (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry* **51**, 844–851.
- Todorovic, S., Bozic, D., Simonovic, A., Filipovic, B., Dragicevic, M., Giba, Z. & Grubisic, D. (2010) Interaction of fire-related cues in seed germination of the potentially invasive species *Paulownia tomentosa* Steud. *Plant Species Biology* **25**, 193-202.
- Tomlinson, D.L., Wilson, J.G., Harris, C.R. & Jeffrey, D.W. (1980) Problems in the assessment of heavy-metal levels in estuaries and the formation of a pollution index. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* **33**, 566-575.
- Tordoff, G.M., Baker, A.J.M. & Willis, A.J. (2000) Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous wastes. *Chemosphere* **41**, 219-228.
- Tornos Arroyo, F. (2003) La Geología y Metalogenia de la Faja Piritica Ibérica. *Macla* **10**, 13-23.
- Trasar-Cepeda, C., Gil-Sotres, F. & Leiros, M.C. (2007) Thermodynamic parameters of enzymes in grassland soils from Galicia, NW Spain. *Soil Biology and Biochemistry* **39**, 311–319.
- Trevors, J.T. (1984) Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the INT and the TTC assay. *Soil Biology and Biochemistry* **16**, 673–674.
- Tzvetkova, N., Miladinova, K., Ivanova, K., Georgieva, T., Geneva, M., Markovska, Y. (2015) Possibility for using of two paulownia lines as a tool for remediation of heavy metal contaminated soil. *Journal of Environmental Biology* **36**, 53-59.
- U.S. Environmental Protection Agency (1998) *Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils, Method 3051a*. Office of Solid Waste and Emergency Response, U.S. Government Printing Office, Washington, DC. EE.UU.
- USEPA (1996) *Report: Recent developments for in situ treatment of metal contaminated soils*. US Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response.
- USEPA (1997) *Technology alternatives for the remediation of soils contaminated with As, Cd, Cr, Hg and Pb*. EPA/540/S-95/500. Office of Emergency and Remedial Response. Washington DC, 20460.
- Van Camp, L., Bujarrabal, B., Gentile A.R., Jones, R.J.A., Montanarella, L., Olazabal, C. & Salvaradjou, S.K. (2004) *Reports of the Technical Working Groups established*

- under the Thematic Strategy for Soil Protection*, EUR 21319 EN/3, 872 p., Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- Van Cauwenberghe, L. & Roote, D.S. (1998) *In Situ Bioremediation*. TO-98-01. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center. Pittsburgh, EE.UU.
- Van Driel, W. & Smilde, K.W. (1990) Micronutrients and heavy Metals in Dutch agriculture. *Fertilizer Research* **25**, 115-126.
- Vangronsveld, J. & Cunningham, S.D. (1998) Introduction to the concepts. En: Vangronsveld, J. (Ed.) *Metal-contaminated soils: in-situ inactivation and phytoremediation*. Springer, Berlin, Alemania. pp. 1-15.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., van der Lelie, D. & Mench, M. (2009) Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research* **16**, 765–794.
- Vázquez, S., Agha, R., Granado, A., Sarro, M., Esteban, E., Peñalosa, J. & Carpena, R., (2006) Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. *Water, Air and Soil Pollution* **177**, 349-365.
- Walker, D.J., Clemente, R. & Bernal, M.P. (2004) Contrasting effects of manure and compost on soil pH, heavy metal availability and growth of *Chenopodium album* L. in a soil contaminated by pyritic mine waste. *Chemosphere* **57**, 215-224.
- Walkley, A. & Black, I.A. (1934) An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed determination of the chromic acid titration method. *Soil Science* **37**, 29-38.
- Wallenstein, M.D., Haddix, M.L., Lee, D.D., Conant, R.T. & Paul, E.A. (2012) A litter-slurry technique elucidates the key role of enzyme production and microbial dynamics in temperature sensitivity of organic matter decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* **47**, 18–26.
- Wang, J., Zhang, C.B. & Jin, Z.X. (2009) The distribution and phytoavailability of heavy metal fractions in rhizosphere soils of *Paulownia fortunei* (seem) Hems near a Pb/Zn smelter in Guangdong, PR China. *Geoderma* **148**, 299–306.
- Wang, Q. & Shogren, J.F. (1992) Characteristics of the crop-paulownia system in China. *Agriculture Ecosystem & Environment* **39**, 145–152.
- Warren, A. (2002) Land degradation is contextual. *Land Degradation & Development* **13**, 449–459.

- Waters, R.D., Brady, P.V. & Borns, D.J. (1998) Natural attenuation of metals and radionuclides – An overview of the Sandia/DOE approach. *Waste Management* **98**, Tucson, AZ, EE.UU..
- Wenzel, W.W., Adriano, D.C., Slat, D. & Smith, R. (1999) Phytoremediation: a plant microbe-based remediation system. En: Adriano, D.C., Bollag, J.M., Frankenberger, W.T., Sims, R.C. (Eds.) *Bioremediation of Contaminated Soils*. Association of Social Anthropologists Monograph n° 37, Madison, WI, EE.UU. pp. 457-508.
- White, W.M. (2001) *Trace elements in igneous processes*. En: Gepchemistry, Cap. 7, 259-313. [www.geo.cornell.edu/geology/classes/Chapters/Chapter07.pdf](http://www.geo.cornell.edu/geology/classes/Chapters/Chapter07.pdf)
- Wild, A. (1988) Micronutrients and toxic elements. En: Wild, A. (Ed.) *Russell's soil conditions & plant growth*. 11ª edición. Longman Scientific & Technical. Harlow, Inglaterra. Cap. 23, 780-814.
- Wolińska, A. & Stępniewska, Z. (2012) Dehydrogenase activity in the soil environment. *Biochemistry Genetics Molecular Biology* **14**, 183–210.
- Wong, M.H. (2003) Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* **50**, 775–780.
- Wong, M.T.F. & Swift, R.S. (1995) Amelioration of aluminium phytotoxicity with organic matter. En: Date, R.A., Grundon, N. J., Rayment, G.E., Probert, M.E. (Eds.) *Plant-Soil Interactions at Low pH: Principles and Management*. Kluwer, Dordrecht, Holanda.
- Xiong, J., Madejón, P., Madejón, E., Cabrera, F. (2015) Assisted natural remediation of a trace element-contaminated acid soil: and eight-year field study. *Pedosphere* **25**, 250-262.
- Yadav, N.K., Vaidya, B.N., Henderson, K., Lee, J.F., Stewart, W.M., Dhekney, S.A. & Joshee, N. (2013) A Review of Paulownia Biotechnology: A Short Rotation, Fast Growing Multipurpose Bioenergy Tree. *American Journal of Plant Science* **4**, 2070-2082.
- Zalesny, Jr. R.S., Donner, D.M., Coyle, D. R. & Headlee, W. L. (2012) An approach for siting poplar energy production systems to increase productivity and associated ecosystem services. *Forest Ecology and Management* **284**, 45–58.
- Zhao X., Liu J., Xia X., Chu J., Wei Y., Shi S., Chang E., Yin W. & Jiang Z. (2014) The evaluation of heavy metal accumulation and application of a comprehensive bio-concentration index for woody species on contaminated sites in Hunan, China. *Environmental Science and Pollution Research* **21**, 5076–5085.

- Zhu, Z. (1991) Evaluation and model optimisation of Paulownia intercropping system - A project summary report. En: Zhu, Z., Cai, M., Wang, S., Jiang Y. (Eds.), *Agroforestry Systems in China*. Chinese Academy of Forestry, People's Republic of China and International Development Research Centre, Canadá, pp. 30-43.
- Zinati, G.M., Li, Y.C. & Bryan, H.H. (2001) Utilization of compost increases organic carbon and its humin, humic and fulvic acid fractions in calcareous soil. *Compost Science and Utilization* **9**, 156–162.