



GRADO EN QUÍMICA

Trabajo Fin de Grado



Efectos de la aplicación del biochar en un suelo contaminado por elementos traza

Autor: Arturo Santa-Olalla Lozano

Sevilla, 2020

Efectos de la aplicación del biochar en un suelo contaminado por elementos traza

Autor:

Arturo Santa-Olalla Lozano

Tutores:

D^a M^a Elena Fernández Boy, Profesora del Departamento de *Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla*

D. José María De la Rosa Arranz, investigador contratado Doctor del *Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC)*

Universidad de Sevilla, 2020.

ÍNDICE

Resumen.....	5
1. Introduction.....	7
1.1 Polluted soils: a global issue.....	7
1.2 Soil Organic Matter.....	8
1.3 Organic amendments.....	11
2. Objetivos.....	14
3. Materiales y Métodos.....	14
3.1 Descripción de los biochars empleados, la zona de estudio y la toma de muestras	14
3.1.1 Biochars empleados.....	14
3.1.2 La zona de estudio y toma de muestras.....	15
3.2 Propiedades físicas y químicas del suelo.....	17
3.2.1 pH y Conductividad Eléctrica.....	17
3.3 Propiedades hídricas del suelo.....	17
3.3.1 Humedad y Contenido total de agua.....	17
3.3.2 Capacidad de Retención Hídrica del suelo.....	18
3.4 Caracterización química del suelo.....	19
3.4.1 Materia orgánica total del suelo.....	19
3.4.2 Análisis elemental.....	20
3.4.3 Materia orgánica oxidable.....	21

3.4.4 Determinación del contenido en azúcares.....	22
3.4.5 Extracción de ácidos húmicos del suelo.....	23
3.4.6 Espectroscopia de Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).....	25
4. Resultados y discusión.....	26
4.1 Propiedades físicas y químicas del suelo.....	26
4.1.1 pH y Conductividad eléctrica.....	26
4.2 Propiedades hídricas del suelo.....	27
4.2.1 Humedad, contenido total de agua y capacidad de retención hídrica.....	27
4.3. Caracterización química del suelo.....	29
4.3.1 Materia orgánica del suelo.....	29
4.3.2 Análisis elemental (CT y NT).....	30
4.3.3 Materia orgánica oxidable.....	31
4.3.4 Contenido en azúcares.....	31
4.3.5 Ácidos húmicos.....	31
5. Conclusions.....	35
6. Bibliografía.....	35

Resumen

En paralelo al crecimiento de la industrialización durante las últimas décadas se ha observado un incremento de la actividad minera y de las zonas contaminadas por elementos traza. Estos contaminantes persistentes representan un problema global, degradando y alterando los ecosistemas de todo el mundo y ponen en riesgo tanto el hábitat de muchas especies vegetales y animales, como la propia existencia del ser humano. Se debe tener en cuenta que la capacidad a escala mundial de alimentar a una población en continuo crecimiento dependerá fundamentalmente de la capacidad para conservar los suelos y que no pierdan capacidad productiva.

Tradicionalmente se han empleado diversas enmiendas, tanto orgánicas como inorgánicas, para la recuperación de suelos contaminados con metales. Recientemente se ha propuesto el biochar, un material orgánico recalcitrante producto de la pirólisis de biomasa, como enmienda que por su pH alcalino, gran superficie específica, porosidad, alta capacidad de retención hídrica, podría tener una buena capacidad de adsorción y estabilización de los elementos traza en el suelo. Sin embargo, poco se sabe de como afectaría su aplicación a largo plazo a la materia orgánica del suelo, que resulta de vital importancia al desempeñar funciones cruciales para la vida de los microorganismos y las plantas.

Para este trabajo de fin de grado se han estudiado los efectos de la aplicación de dos tipos de biochar, biochar de cascarilla de arroz (BA) y biochar de hueso de aceituna (BO), en suelos cercanos al Corredor Verde del Guadiamar con distinto grado de contaminación por elementos traza: un suelo ácido contaminado (SAC) y un suelo moderadamente ácido contaminado (SMC). Esta zona fue afectada por el vertido de lodos con metales pesados de Aznalcóllar en 1998. Tras 20 meses desde la aplicación de ambos biochars se ha medido su efecto en diversas propiedades físicas y químicas de los suelos. Por otra parte, se ha realizado una caracterización química de la materia orgánica de los suelos. Los resultados obtenidos han mostrado que el biochar incrementa sensiblemente el pH del suelo, incrementa su capacidad para retener el agua y por tanto la humedad del suelo, originando también un aumento de la cantidad de carbono orgánico total y de materia orgánica del suelo. Estos resultados sugieren una mejora parcial de algunas propiedades físicas y químicas en estos suelos contaminados por elementos traza al ser enmendados con biochar, facilitando su recuperación y el desarrollo de vegetación. También sugieren una mejora sustancial de la cantidad de

materia orgánica del suelo, que cumple funciones vitales para el desarrollo de la vida de microorganismos y plantas. Se ha estudiado también el posible efecto de ambos biochars en la fracción de ácidos húmicos del suelo. Para ello se analizó el contenido en ácidos húmicos y su composición mediante Espectroscopía de Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR). Se ha comprobado que la fracción de ácidos húmicos del suelo no ha sido alterada, lo que indica una baja degradabilidad del biochar 20 meses después de su aplicación.

1. Introduction

1.1 Polluted soils: a global issue

Recent estimates suggest that approximately 5 to 6 million ha of arable land worldwide are irreversibly lost each year as a result of soil pollution, soil degradation and marginalization. This is a serious problem since it has been showed that an increase by approximately 70% of agricultural production will be necessary between 2005 and 2050 because it is estimate that the global population would increase from 7,5 billion to 9,8 billion by 2050 (Tripathi *et al.*, 2019). Accordingly to Schröder *et al.* (2018) the main causes of soil degradation across Europe have been identified to be: overgrazing (35%), agriculture (28%), deforestation (30%), producing fuel wood (7%), and industrialization (4%) amounting degradation to about 10 million ha per year (European Parliament, 2009). Similar results were reported by Longobardi *et al.* (2016). Based on estimates by the European Environment Agency (Bardos *et al.*, 2008), the number of sites where potential polluting activities have been carried out in the EU is approximately three million and, of these, an estimated 250.000 sites may need urgent remediation (Panagos *et al.*, 2013). Costs for remediation projects of polluted sites usually range from €50.000 to €500.000 per site (40% of reported cases). Hence, the problem has been recognized, but not solved. In any case, degraded soil is less suited to prevent droughts and flooding and more prone to lose biodiversity (EEA, 2012). Hence, there is a need for soil pollution management in order to reduce health issues and improve food security. Establishing technology development and rehabilitation practices for polluted land and the adoption of sustainable systems in industrial and agricultural activities are a way towards soil management (Tripathi *et al.*, 2019). A restoration of degraded land could be a major contribution to unlock increased production of food, bioenergy and other ecosystem services from land (Kidd *et al.*, 2015). Hence, and following consequently the strategy of the Agriculture, Food Security and Climate Change (FACCE) mission, a change in the EU's agricultural policies is needed to consider marginal, neglected or polluted sites for agricultural production, at least for raw materials and/or bioenergy, if not for feed and food (Schröder *et al.*, 2018). For those reasons, the European Commission adopted in 2006 the Soil Thematic Strategy (COM 231, 2006) and proposals for a Soil Framework Directive (COM 232, 2006) specifically to protect soils. Among the goals of these instruments is the protection of soils from a number of

threats, including contamination (Science Communication Unit, European Commission, 2013).

According to Tripathi *et al.* (2019), soil pollution, caused by inappropriate agricultural practices, improper management of industrial and domestic wastes, accidental spills, mining activities and deforestation, represents a serious threat to growing population ranging from health issues to food security. Especially soil polluted with toxic elements like As, Pb or Cd besides organic chemicals like PCBs (polychlorinated biphenyls) and PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) or antibiotics, causes serious risks to human health. In fact, heavy metals are on the top of the most concerning toxic contaminants, because they are showed to be the most frequently occurring contaminants in soil and groundwater as a result of a survey in 27 European countries, with 35 % and 31 % respectively, above mineral oil, PAH, BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylene), CHC (chlorinated hydrocarbons), cyanides, phenols and others (Figure 1) (Science Communication Unit, European Commission, 2013). It is estimated that 37% of degraded soils in the European Union are polluted with trace elements (EEA, 2007).

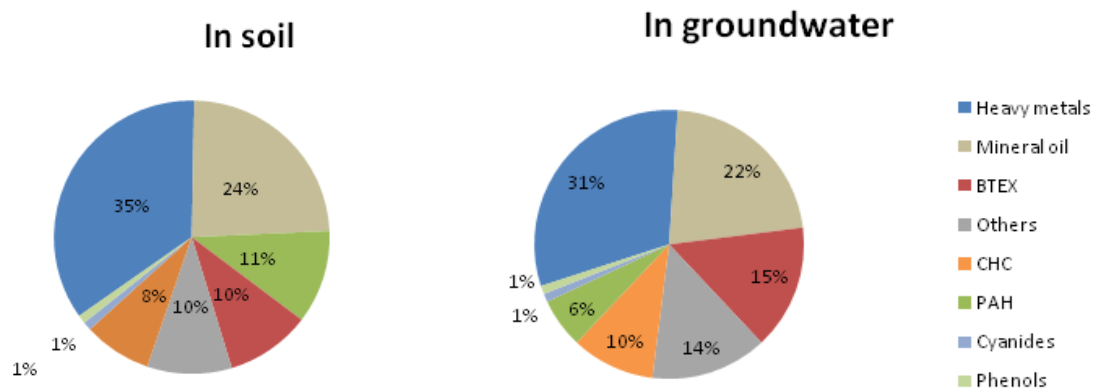


Figure 1. Results of the survey made to 27 european countries about the main pollutants in soil and groundwater (Huber and Prokop, 2012).

An example of soil pollution is found in the Aznalcollar disaster (Sevilla), which happened on 25th April in 1998, when a mineral waste dam broke and spilt tons of polluted sludges to the Agrio and Guadiamar rivers and riverbeds, within the Iberian Pyrite Belt (Figure 2). Thus, an environmental disaster was triggered, deeply polluting

more than 4600 ha around the river southwards to Doñana National Park, where Guadianar River drains. More than 30.000 kg of dead fish were removed and the habitats of many other animal species were destroyed or degraded (Domínguez *et al.*, 2016).

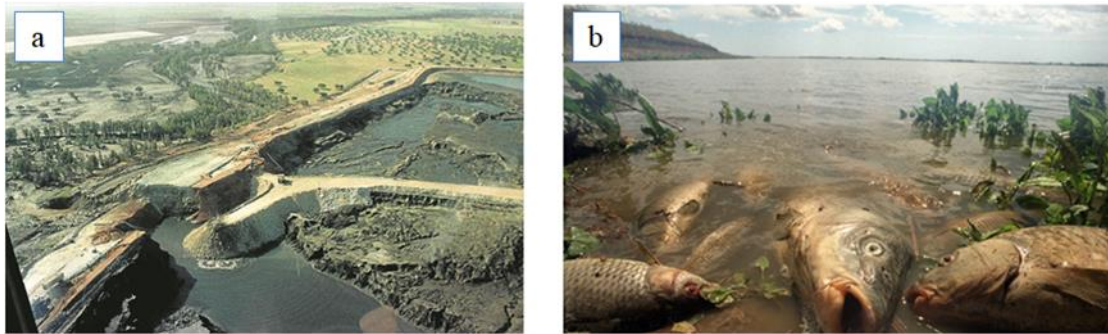


Figure 2. a) Image of the broken mineral waste pool and the spill into the river (Europa Press, 2020), b) image of dead fish in the riverside (Público, 2018).

Subsequently, the affected lands were purchased by the Regional Administration, and then afforested using native tree and shrub species (Domínguez *et al.*, 2008), and since 2003, most of the area (2706,8 ha) is protected by the Regional Administration as the Guadianar Green Corridor, where agricultural activity was forbidden and current activities were limited to low-intensity horse grazing for herbaceous control and fuel reduction (Madejón *et al.*, 2009), outdoor sports and ecotourism (Domínguez *et al.*, 2016). In addition, a great effort was made in order to remove the sludges from affected area and a recovery plan was started, including soil analysis that showed high contents of trace elements as As, Cd, Cu, Pb, Tl and Zn. (Domínguez *et al.*, 2015). The presence of these metals in soil, besides its acid pH (pH < 3), prevent the development and establishment of microbial communities and cultivation development, even the growth of wild plants at some areas (Cabrera *et al.*, 1999). Aznalcollar disaster is only an example of polluted soil but these soils represent a global issue that threat the human and wildlife. There is a variety of routes from soils to the human intake: eating soil, inhalation, skin contact and indirect contact. Eating soil is less concerning because it occurs accidentally in low frequency. Skin contact is dangerous to main of the toxic chemical compounds but it is not the case of heavy metals, only inorganic Hg and Cr (VI) can be absorbed. Inhalation, due to particles into the air released while working with soil, that may be inhaled by workers and others nearby. The most problematic

routes for heavy metals to be uptaken by the body is indirect contact. The bioavailability of heavy metals in soils induce that they enter into the food chain, frequently uptaken by plants. A contaminant becomes toxic in the human body once the body's own detoxification systems become overloaded. At this point, the body starts to be exposed to excess amounts of contaminants (Science Communication Unit, European Commission, 2013).

1.2 Soil Organic Matter

Soil Organic Matter (SOM) is the main stock of C in the Earth's surface (Post and Kwon, 2000), so little changes in its total content and above all in its biodegradability provokes changes in matter and energy fluxes and balances in the biogeochemical cycles of C and N. Hence the maintenance or increase of SOM levels and a sustainable management of biomass are very useful tools in order to reduce the actual impacts of the main environmental issues as climate change or desertification. In addition, in terms of soil's quality SOM has important functions as keeping moisture content, increasing aeration and avoiding compaction. Thanks to these, SOM is essential in order to keep soil's quality, being indispensable for vegetable and microbial life. The SOM is constituted by a great diversity of organic molecules comprising plant biopolymer residues (polysaccharides, lignin, proteins and cuticular materials), materials derived from them via decomposition processes, microbial tissues and humic substances (fulvic acids, humic acids and humines) (Zech *et al.*, 1997; Stevenson, 1994).

Humic acids (HAs) are one of the groups more active in SOM. HAs are heterogeneous macromolecules composed by a mixture of complex organic molecules with functional groups formed by biochemical and chemical reactions, and are soluble in alkaline medium. The degree of humification is described as the transformation process of the easily decomposable organic matter into stabilized and polymerized material (Jindo *et al.*, 2016). Humification is a consequence of microbial growth and activity that consist on rapid decomposition of primary plant residues, then slow decomposition of plant structural components and, finally, alterations of soil organic carbon and humic substances genesis (Balser, 2005). When this happens appears first fulvic acids which are medium-sized C-aromatic compounds. Fulvic acids then became into HAs by bonding each other's, increasing its molecular weight. Thus, HAs derivate from decomposition and oxidation of SOM. HAs have functions as important as regulators of

trace metal concentrations in soil solution and may act as plant growth promoters, being critical determinants of soil properties such as water-holding capacity, structure and aggregation, and nutrient retention and exchange (Balsler, 2005). They also play a great role not only in increasing soil fertility such as micronutrient uptake and phytohormones effect, but also contributing to C sequestration (Spaccini *et al.*, 2002). According to Zaccone *et al.* (2008), the HAs had shown their trend to form stable complexes with some metals, including As, Cr, Ni or Rb in ombotrophic bog. Furthermore, Clemente and Bernal (2006) reported that HAs successfully enhance the immobilization of heavy metal, as Zn or Pb, in acid soils, reflecting metal–HA interactions that lead to precipitation or flocculation processes. Clemente and Bernal (2006) also reported that their effects can be long-lasting due to the HAs's high microbiological stability (95% of the organic-C being resistant to decomposition). Similar results were reported by De la Rosa *et al.* (2014), demonstrating that HAs sequester trace elements, specially showing a high retention capacity for considerable amounts of Cu and Zn in sediments soils. The ability of humic substances to bind heavy metals can be attributed to their high content of oxygen-containing functional groups, including carboxyl, phenol, hydroxyl, enol and carbonyl structures (Aiken *et al.*, 1985).

1.3 The role of organic amendments for the restoration of heavy metal polluted soils

In order to get Guadiamar and Agrio riverbeds polluted soils recovered, amendments were suggested and applied in several plots by the Regional Administration in 1998. The amendments used included calcium-rich amendments like sugar beet-lime, with 70–80% CaCO₃, Fe-rich amendments (red soil), and organic matter amendments such as compost or manure. All of them were mixed within the plowed depth (20–25 cm) by disk harrowing (Domínguez *et al.*, 2016). The periodic analysis of polluted soils have shown that these amendments increased soil pH (from 4 to 7) and Total Organic Carbon (TOC, from <0,1% to 2,5%), and reduce significantly the presence of soluble trace elements such as Cd, Cu and Zn as a result of increased binding of labile elements to organic matter (Madejón *et al.*, 2010). Organic amendments can represent therefore a valuable tool to improve soil fertility sustainably, since some of them could contain all nutrients required for crop growth. Applying these amendments in marginal soils will positively influence a number of soil properties like soil organic carbon, available forms of phosphorus and potassium, microbial activity, water storage and soil pH (Schröder *et*

al., 2018). Ciadamidaro *et al.* (2016) demonstrate that organic amendment (compost) appears to be better factors in recovery of the biological and chemical quality of the soil, enhancing natural processes. Of course, application of organic amendments will also improve soil structure, which is also important to strengthen plants growth.

One of the organic amendments that can be applied to soils is the biochar. It is a highly C-aromatic solid product (De la Rosa *et al.*, 2014) resulting from the pyrolysis, or combustion in absence of oxygen, of organic residues (Lehmann and Joseph, 2009). Biochar can be used in soils for carbon sequestration, with carbon representing up to 90% of the mass (Schröder *et al.*, 2018). Even though carbon in char is considered stable and not bioavailable, its application to soils can increase soil fertility mainly through positive effects on soil structure and functionality (Agegnehu *et al.*, 2016). Containing pores and internal surfaces, depending on the structure of the starting material, biochar confers interesting features for amendments, developing properties of agronomic interest such as its high specific surface and porosity (macro- and micro-) (Figure 3), his cation exchange capacity, his cation sequestration by functional groups complexation, physical adsorption and trace elements precipitation (Lu *et al.*, 2012), his alkaline pH and his water holding capacity (WHC) (Whitman *et al.*, 2014). As biochar is broadly stable in soil, it has potential to rise soil water holding capacity through its often macroporous nature (μm -sized pore), especially important in clay soils, preventing them from cracking and increasing its available moisture (Sohi *et al.*, 2010). For these reasons, application of biochar to amend polluted agricultural soils had showed good results (e.g. Cao *et al.*, 2018; Beesley *et al.*, 2011; De la Rosa *et al.*, 2014; Glaser *et al.*, 2002; Laird *et al.*, 2010; Puga *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2013), ensuring a pH increase, a decrease of trace elements bioavailability (Figure 3) and its plant uptake (Puga *et al.*, 2015), increasing organic matter and total organic carbon and could provide structure to amended soil. Dias *et al.* (2010) and Zhang *et al.* (2014) also reported that the humification process during composting can be improved by the addition of biochar. Having a microstructure with pores of different dimensions and functional groups exposed on the surfaces, biochar can be favorable to microbial colonization, and this in turn has beneficial effects on soil fertility (Lehmann *et al.*, 2011). Hence, innovative applications foresee functionalization of biochar with beneficial microorganisms to decrease the use of chemical fertilizers. The better use of nutrients in circulation will decrease the climate footprint of chemical fertilizer

production and contribute to closing gaps in the circular bioeconomy, also, since it starts from waste material (Schröder *et al.*, 2018). In short-terms experiments biochar may be seen to create a net of stabilization of other organic matter (Liang *et al.*, 2010) and to decrease N₂O, CO₂ and methane emissions (Sohi *et al.*, 2010), with a carbon abatement estimated in about 1GtC yr⁻¹ (Lehmann, 2007). Thanks to all these biochar characteristics, biochar could be used as polluted soils treatment (Paz-Ferreiro *et al.*, 2014). Therefore, its application as soil amendment to heavy-metals polluted soils is proposed as an alternative for the remediation of those degraded soils.

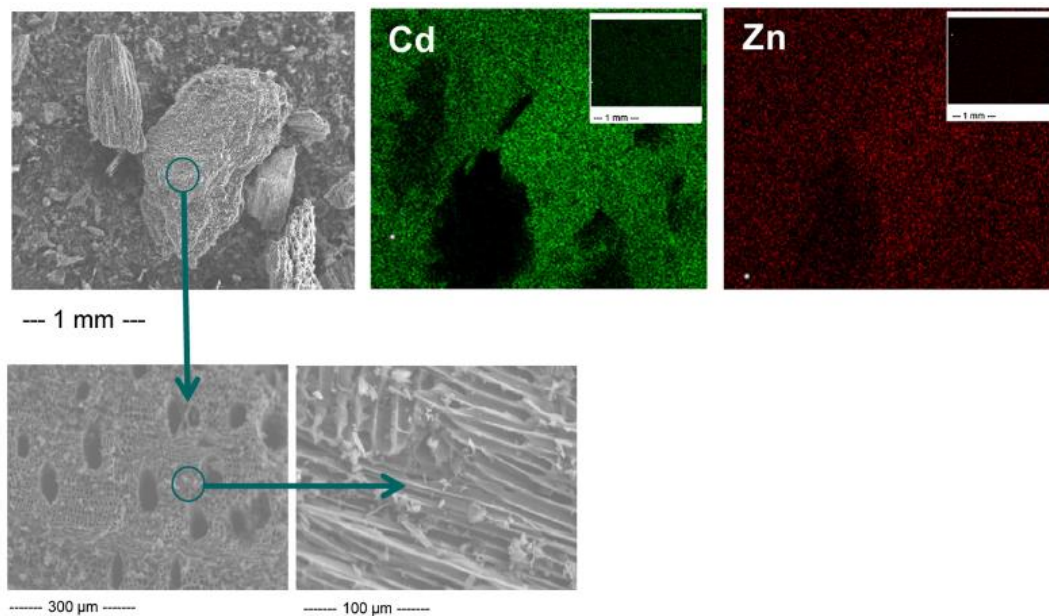


Figure 3. Images obtained by Scanning Electron Microscope (SEM) of hardwood biochar's surface at increasing magnifications and dot-maps with surface sorption of Cd (green) and Zn (red) (Beesley et al., 2011).

Nevertheless, little is known about the influence that biochar has in the structure, composition, fractionary distribution and stability of Soil Organic Matter (SOM) in polluted soils with trace elements. In fact, the effects of biochar addition in the amounts and composition of HAs are totally unknown nowadays. In order to close these gaps, this research tries to analyze the effects of biochar application in polluted soils physical and chemical properties, SOM fractionary distribution and HAs composition and amounts.

2. Objetivos

Teniendo en cuenta los aspectos mencionados anteriormente, los objetivos principales de este TFG han sido:

- Determinar los efectos de la enmienda con biochar de hueso de aceituna y cascarilla de arroz en las propiedades físicas y químicas de dos suelos con distinto grado de contaminación por elementos traza aproximadamente dos años después de su aplicación, incluyendo posibles variaciones en su composición y contenido en carbono.
- Estudiar el efecto a medio plazo de la aplicación de biochar en suelos contaminados con elementos traza en la composición de los ácidos húmicos del suelo.

3. Materiales y Métodos

3.1 Descripción de los biochars empleados, la zona de estudio y la toma de muestras

3.1.1 Biochars

Los biochars empleados fueron producidos anteriormente al inicio de este trabajo siguiendo el protocolo descrito por De la Rosa *et al.* (2019), mediante el sometimiento de las materias primas (cascarilla de arroz y hueso de aceituna) a un proceso de pirólisis, calentamiento a 500°C en atmósfera inerte (N₂), con un tiempo de residencia de 12 minutos, en un reactor rotatorio de pirólisis de la marca Pyreka (Pyreg, Alemania) alimentado por un tornillo sin fin. De aquí en adelante, estos biochars se denominan: BA al biochar de cascarilla de arroz y BO al biochar de hueso de aceituna. En la Tabla 1 se muestran las características de los biochars empleados:

Tabla 1. Principales características químicas de los biochars empleados en el experimento.

Biochar	pH ¹		CRH ²		CT ³ (g · kg ⁻¹)		NT ⁴ (g · kg ⁻¹)		HT ⁵ (g · kg ⁻¹)		H/C _{at} ⁶
	Media	d.e.	Media	d.e.	Media	d.e.	Media	d.e.	Media	d.e.	Media
BA	10,1	0,3	540	77	536,6	1,4	5,1	2,4	16,11	0,24	0,326
BO	9,3	0,2	66	6	927,1	1,6	1,6	0,9	25,15	0,64	0,361

*d.e.: Desviación estándar; 1) Medido en H₂O; 2) Capacidad de Retención Hídrica; 3) Carbono total; 4) Nitrógeno total; 5) Hidrógeno total; 6) Ratio H/C_{at} sirve como estimación del índice de aromaticidad siguiendo De la Rosa et al. (2019). Datos extraídos de De la Rosa *et al.* (2019).*

3.1.2. La zona de estudio y toma de muestras

Las parcelas estudiadas se encuentran en el Corredor Verde del Guadiamar (37° 23' 7,152" N, 6° 13' 43,175" O; Sanlúcar la Mayor, Provincia de Sevilla), a unos 15 km de la balsa minera. Se trata de un suelo arcilloso, formado principalmente por pizarra y esquisto (zona norte) y suelo limoso y marga (zona central) (Domínguez *et al.*, 2016). El suelo estudiado se clasifica como un Typic Xerofluvent según la taxonomía definida en Soil Survey Staff (2014).

El vertido de Aznalcóllar afectó más gravemente a la zona más cercana al canal del río y más cercana a la mina. Según las conclusiones de Domínguez *et al.* (2016), en un estudio realizado 16 años después del accidente, la fracción soluble de los metales As, Pb, Cd y Cu se redujo notablemente en las muestras de suelo más alejadas del canal: As de 2,6 a 1,0 mg kg⁻¹, Pb de 8,0 a 0,2 mg kg⁻¹, Cd de 0,2 a 0,0 mg kg⁻¹, Cu de 7,0 a 2,0 mg kg⁻¹, así como también se vieron reducidas en la zona norte del río, primeros 13 km del canal, comparadas con la zona central (de 15 a 30 km). También concluye que el pH del suelo aumenta al alejarse del canal (pH de 5 a 7).

El ensayo de campo se ha realizado sobre parcelas con diverso grado de contaminación por metales pesados teniendo parcelas de suelo ácido contaminado (SAC) y parcelas de suelo moderadamente ácido contaminado (SMC). Los suelos denominados SMC fueron tratados por la Junta de Andalucía, que retiró los lodos y la capa superficial del suelo, aproximadamente hasta 20 cm de profundidad (Madejón *et al.*, 2018). Sin embargo, los suelos SAC no tuvieron ningún tratamiento tras el vertido, quizás debido a la dificultad de tratar por completo una extensión de terreno tan grande.

En abril de 2018 se aplicaron 8 t ha⁻¹ de cada tipo de biochar a distintas parcelas señaladas y posteriormente se mezclaron con la capa superficial del suelo (5 cm), tanto de suelo SAC como SMC, dejando parcelas control sin biochar de ambos tipos de suelo. El día 4 de diciembre de 2019, aproximadamente 20 meses después de iniciado el experimento, se tomaron muestras de suelo de 6 parcelas diferentes, 3 de cada tipo de suelo (SAC y SMC) con una pala plana haciendo cortes de forma cúbica de 10x10x10 cm (Figura 4). Estas muestras se corresponden con una muestra control de cada tipo de suelo, y 2 muestras de las parcelas enmendadas con los biochars BA y BO respectivamente, siendo 6 el total de muestras de suelos utilizadas en el trabajo (Tabla 2). Todas las muestras fueron transportadas en bolsas selladas y llevadas inmediatamente al laboratorio, donde fueron secadas a 40 °C durante 48 h, tamizadas

(<2 mm), homogeneizadas y guardadas en bolsas selladas y debidamente etiquetadas a 4 °C.

Tabla 2. Nomenclatura de las muestras de suelo empleadas en el presente trabajo.

Parcelas	Tratamiento		
	Control C	Biochar BO	Biochar BA
Suelos Ácidos Contaminados	SAC-C	SAC-BO	SAC-BA
Suelos Moderadamente Ácidos Contaminados	SMC-C	SMC-BO	SMC-BA

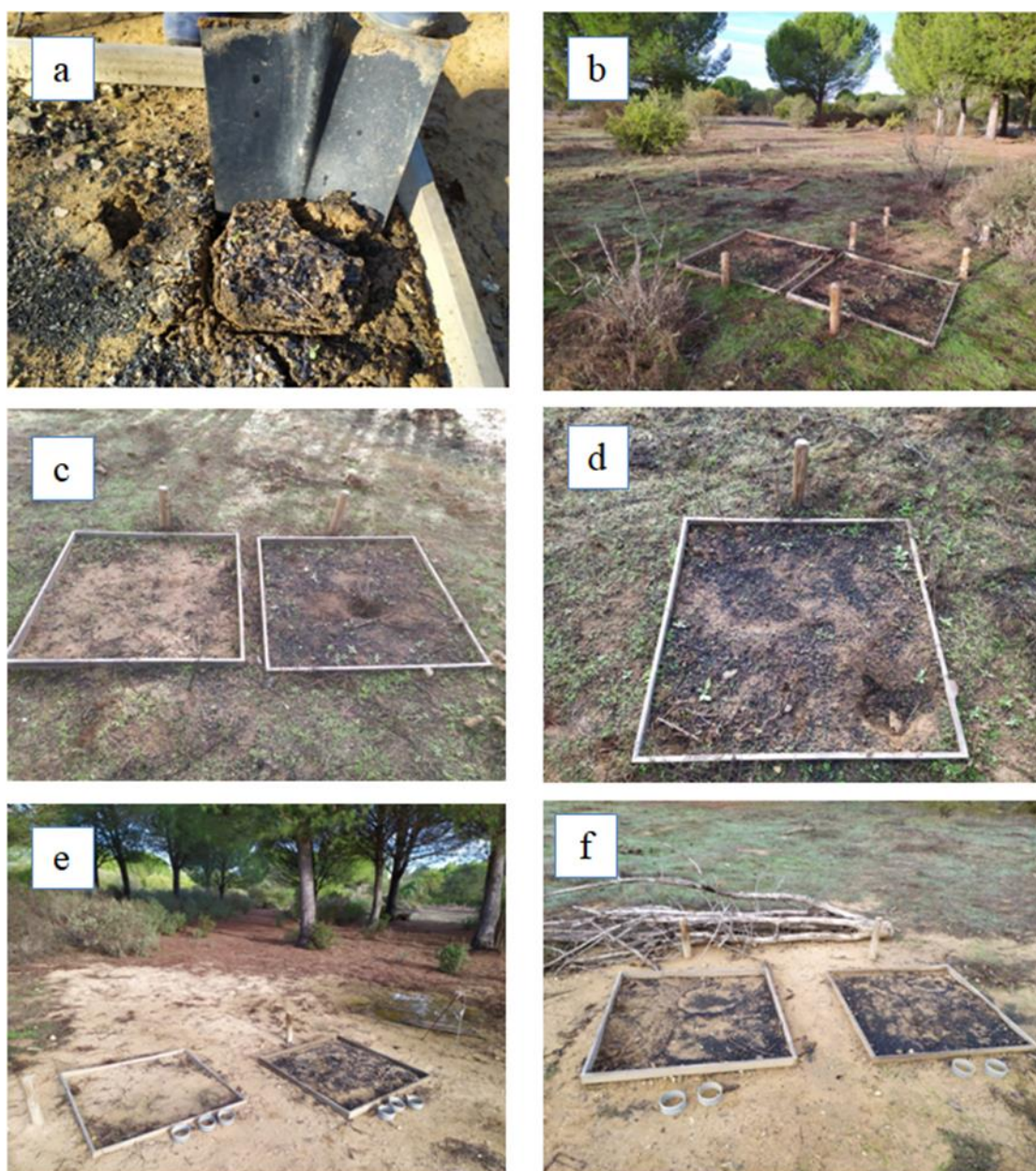


Figura 4. Fotografías de la zona de estudio y las parcelas estudiadas: a) toma de muestra, b) vista general de la zona SMC, c) parcelas SMC control (izquierda) y enmendada (derecha), d) parcela SMC enmendada, e) parcelas SAC control (izquierda) y enmendada (derecha) en la zona SAC, f) parcelas SAC enmendadas con biochar BA y BO (Fuente propia).

3.2 Propiedades físicas y químicas del suelo

3.2.1 pH y Conductividad Eléctrica

Para medir el pH y la Conductividad Eléctrica (CE) se pesaron 2 g de cada muestra de suelo seco y tamizado en tubos de centrífuga. Se añadieron 5 ml de H₂O mili-Q, se voltearon durante 30 minutos y se dejaron reposar durante otros 30 minutos. Se midió el pH de cada tubo con un pH-metro marca Crison 40 pH-meter (Crison, España), limpiando el electrodo con agua destilada y secándolo entre medidas. Después se filtró la mezcla por papel de filtro y se midió la CE de la solución filtrada de cada tubo con un conductímetro Crison Basic 20 (Crison, España). El pH-metro se calibró con disoluciones estándar de pH 4,01, 7,01 y 9,18, y el conductímetro se calibró con disoluciones estándar de 147 μS/cm, 1413 μS/cm y 12,88 mS/cm. Estas determinaciones se realizaron por duplicado.

3.3 Propiedades hídricas del suelo

3.3.1 Humedad y Contenido total de agua

Para determinar la humedad del suelo y el contenido total de agua se adaptó el protocolo descrito en “*Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis*” (FAO, 2008). Para ello, se pesaron 250 gramos de muestra de suelo fresco y se secaron a 40 °C en estufa durante 48 h. Se pesó el material secado y se determinó la humedad por duplicado expresada como porcentaje (%) sobre peso húmedo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{Masa suelo seco a } 40 \text{ }^\circ\text{C}}{\text{Masa suelo húmedo}} \times 100$$

Posteriormente, una alícuota del mismo material se sometió a un secado de 105 °C en estufa durante 48 h. Se pesó el producto de este secado y se determinó el contenido total de agua expresado como porcentaje (%) sobre peso húmedo mediante la fórmula:

$$\text{Contenido total de agua (\%)} = \frac{\text{Masa suelo seco a } 105 \text{ }^\circ\text{C}}{\text{Masa suelo húmedo}} \times 100$$

3.3.2 Capacidad de Retención Hídrica del suelo

La Capacidad de Retención Hídrica (CRH) es la cantidad de agua retenida en el suelo tras haber sido saturado en agua y posteriormente haber drenado el exceso de agua por

gravedad habiendo finalizado el movimiento de agua hacia abajo (Veihmeyer y Hendrickson, 1931). Para determinar la CRH del suelo se siguieron los protocolos Campos *et al.* (2020) y Veihmeyer y Hendrickson (1931). Se pesaron con precisión para cada muestra un juego compuesto por un matraz Erlenmeyer, un embudo de vidrio y un papel de filtro Whatman N° 2 humidificado con H₂O destilada, debidamente etiquetados. Posteriormente se pesaron 2 g de muestra de suelo que se colocó sobre el papel de filtro en cada uno de los conjuntos y después se saturó cada embudo con H₂O destilada, dejándola escurrir durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se pesaron nuevamente los embudos con la muestra ya húmeda y escurrida. Esta determinación se realizó por duplicado (Figura 5). La CRH se calculó como el cociente entre el peso del agua retenida por la muestra húmeda (escurrida) y la muestra seca, expresado en tanto por ciento como describe la siguiente fórmula:

$$\text{CRH (\%)} = \frac{\text{Masa del agua retenida por el suelo}}{\text{Masa inicial de la muestra seca}} \times 100$$



Figura 5. Muestras sometidas a medición de CRH (Fuente propia).

3.4 Caracterización del suelo

3.4.1 Materia orgánica del suelo medida por calcinación

La materia orgánica del suelo se determinó a partir de la pérdida de masa por ignición, siguiendo un método adaptado de Hoogsteen *et al.* (2015). Para ello se calcinó una alícuota de cada muestra de suelo primeramente a 550°C y posteriormente a 750°C. La hipótesis de partida es que la MO 550 °C se corresponde con la materia orgánica incompleta presente en el suelo, ya que el biochar, procedente de biomasa pirolizada a 500 °C, no se eliminaría por completo a 550 °C. Sin embargo, la calcinación a 750 °C, si incluiría la eliminación de toda la materia orgánica presente, incluido el biochar añadido.

Antes de someter las muestras a calcinación se secaron durante 24 h a 105 °C para eliminar la humedad. Para determinar la materia orgánica del suelo (MOS) por calcinación se pesaron en balanza de precisión 3 gramos de muestra seca en crisoles limpios, secos y etiquetados, posteriormente se introdujeron en un horno de mufla a 550 °C durante 5 h, donde la alta temperatura calcina la materia orgánica produciendo CO₂ y ceniza. Una vez transcurrido ese tiempo se pesaron las muestras de nuevo. Esta determinación se realizó por duplicado. Se calculó la cantidad de material perdido en forma de MOS, expresada en g kg⁻¹, mediante la siguiente fórmula:

$$MO\ 550\ (g \cdot kg^{-1}) = \frac{\text{Masa inic. muestra (g)} - \text{Masa muestra calcinada 550 } ^\circ\text{C (g)}}{\text{Masa inicial muestra (kg)}}$$

Posteriormente, para eliminar la materia orgánica del biochar (muy recalcitrante) se sometieron las muestras a 750° C durante 5 h. Esta determinación se realizó por duplicado (Figura 6). Se calculó la cantidad de material perdido, expresada en g kg⁻¹, mediante la fórmula:

$$MO\ 750\ (g \cdot kg^{-1}) = \frac{\text{Masa inic. muestra (g)} - \text{Masa muestra calcinada 750 } ^\circ\text{C (g)}}{\text{Masa inicial muestra (kg)}}$$



Figura 6. Aspecto que presenta la muestra de suelo tras someterse a 750°C durante 5h (Fuente propia).

3.4.2 Análisis elemental

El contenido total en C (CT) y N (NT) de los suelos se determinó mediante combustión seca usando un analizador elemental de microanálisis 2000 HT elemental micro-analyzer equipado con un detector térmico de conductividad (ThermoScientific, Bremen, Alemania) a 1020 °C, que mediante combustión catalizada transforma todo el C en CO₂ y en N en NO₂, que son determinados por espectrometría de masas. Para ello se pesaron 3 mg de cada muestra finamente molido en cápsulas de Sn. La determinación se realizó por duplicado (Figura 7).



Figura 7. Llenado de la cápsula de Sn con la muestra molida para análisis elemental (Fuente propia).

3.4.3 Materia orgánica oxidable

Para determinar el contenido de carbono orgánico fácilmente oxidable (CFO) de cada muestra de suelo se siguió una metodología de determinación colorimétrica adaptada por FAO (2019) basada en la oxidación húmeda del carbono orgánico del suelo propuesta en el método de Walkley y Black (1934). Se pesaron 0,5 g de muestra y las cantidades necesarias de glucosa para hacer una recta patrón con un rango de 0 a 8 mg de C. Se añadieron 2 ml de disolución $K_2Cr_2O_7$ al 10 % y se mezcló con varilla. Se añadieron lentamente 5 ml de H_2SO_4 , se agitó y se dejó reposar 30 minutos. Tras añadir 20 ml de H_2O y mezclar se dejó reposando durante toda la noche. Se filtró con papel de filtro y se midieron las absorbancias de los extractos filtrados a 600 nm. Esta determinación se realizó por triplicado (Figura 8). Empleando la recta patrón se determinan las cantidades de C presentes en las muestras y con ellas se calculó la cantidad de carbono orgánico fácilmente oxidable (CFO) en $g\ kg^{-1}$, empleando el peso exacto de la muestra inicial de suelo, empleando la siguiente ecuación:

$$CFO\ (g \cdot kg^{-1}) = \frac{n^{\circ}\ mg\ C}{n^{\circ}\ g\ suelo}$$

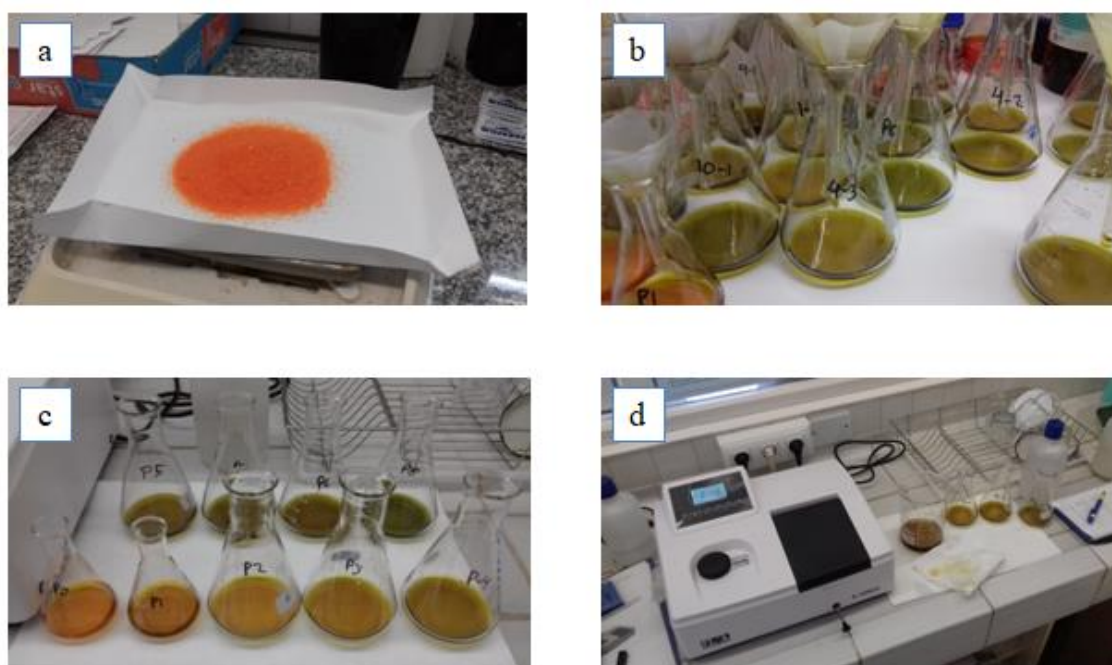


Figura 8. Distintos pasos del método aplicado: a) Pesado del $K_2Cr_2O_7$, b) Filtrado de los extractos de muestras y patrones, c) Extractos filtrados de la recta patrón, d) Espectrofotómetro utilizado (Fuente propia).

3.4.4 Determinación del contenido en azúcares

El contenido en azúcares se determinó siguiendo una adaptación del método descrito por Chantigny *et al.* (2006) para la extracción y la caracterización de materia orgánica soluble. Las hexosas en la materia orgánica disuelta del suelo son una fuente de energía para los microorganismos del suelo y su determinación sirve como indicador de la biodegradabilidad de la materia orgánica Chantigny *et al.* (2006).

Para determinar los azúcares solubles del suelo se pesaron 5 g de suelo y se mezclaron con 10 ml de disolución 5 mM de CaCl_2 durante 1 hora en volteador. Los extractos se filtraron con papel de filtro. Se preparó una disolución madre con 0,05 g de glucosa en 500 ml de H_2O mili-Q a partir de la cual se realizó una recta patrón con disoluciones de glucosa de concentración creciente. Se preparó una disolución ácida con 0.22 g de antrona y 100 ml de H_2SO_4 al 98 % v/v. En un tubo de ensayo de 10 ml se vertieron 1 ml del extracto de cada muestra o 1 ml de patrón con 2 ml de disolución ácida de antrona (Figura 9). Se agitó en vórtex, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos y se midió la absorbancia en cubeta de cristal a 625 nm. Se calculó la cantidad de azúcares de cada muestra con ayuda de la recta patrón. Esta determinación se realizó por triplicado.



Figura 9. Tubos de ensayo con las tres réplicas de una muestra antes de la medición por espectrofotometría (Fuente propia).

3.4.5 Extracción de ácidos húmicos del suelo

Para la extracción de los ácidos húmicos (AHs) del suelo se siguió el protocolo descrito por De la Rosa *et al.* (2011). Se pesaron 100 g de cada muestra y se pusieron en agitación con 120 ml de solución alcalina de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,1M con NaOH 0,1M durante 24 h. La fracción soluble en solución alcalina (extracto húmico total) se separó por centrifugación a 4.000 r.p.m. durante 15 min y filtración con filtro Whatman. Se repitió el proceso una vez más con 100 ml de solución $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.1M + NaOH 0,1M y luego otras tres veces con 100 ml NaOH 0,1M, 0,5M y 0,5M respectivamente, hasta que los extractos presentaron poca o nula coloración. El conjunto de los dos extractos de cada muestra se acidificó añadiendo HCl (37 %) hasta pH 1-1,5, precipitando los AHs. Se centrifugaron a 6.000 rpm durante 20 min y la fracción de AH se redisolvió en NaOH 0,5 M y se centrifugó a 7.000 r.p.m. durante 15 min. Las fracciones de AH se introdujeron en membranas de diálisis, se lavaron repetidamente y se dializaron frente a H_2O mili-Q hasta la eliminación exhaustiva de cloruros y sodio. Se acabó la diálisis cuando se hubo comprobado que el agua de lavado llegaba a un pH neutro (6,8-7,2) y la CE era menor de 300 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Se congelaron los AHs y se secaron por liofilización. Finalmente se eliminó la humedad residual en estufa a 40 °C durante 48 h y se pesaron (Figura 10). Esta determinación se realizó por duplicado. Se determinó el contenido en AHs en g kg^{-1} contenidos en cada muestra, con la siguiente ecuación:

$$\text{AHs (g} \cdot \text{kg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Masa de AHs de la muestra (g)}}{\text{Masa inicial de la muestra (kg)}}$$

Se determinó el contenido en C y N de los ácidos húmicos obtenidos. El contenido en C de AHs permite estimar la pureza de los AHs extraídos, ya que pueden contener arcillas en el extracto final si la centrifugación no ha sido lo suficientemente efectiva para separarlas.

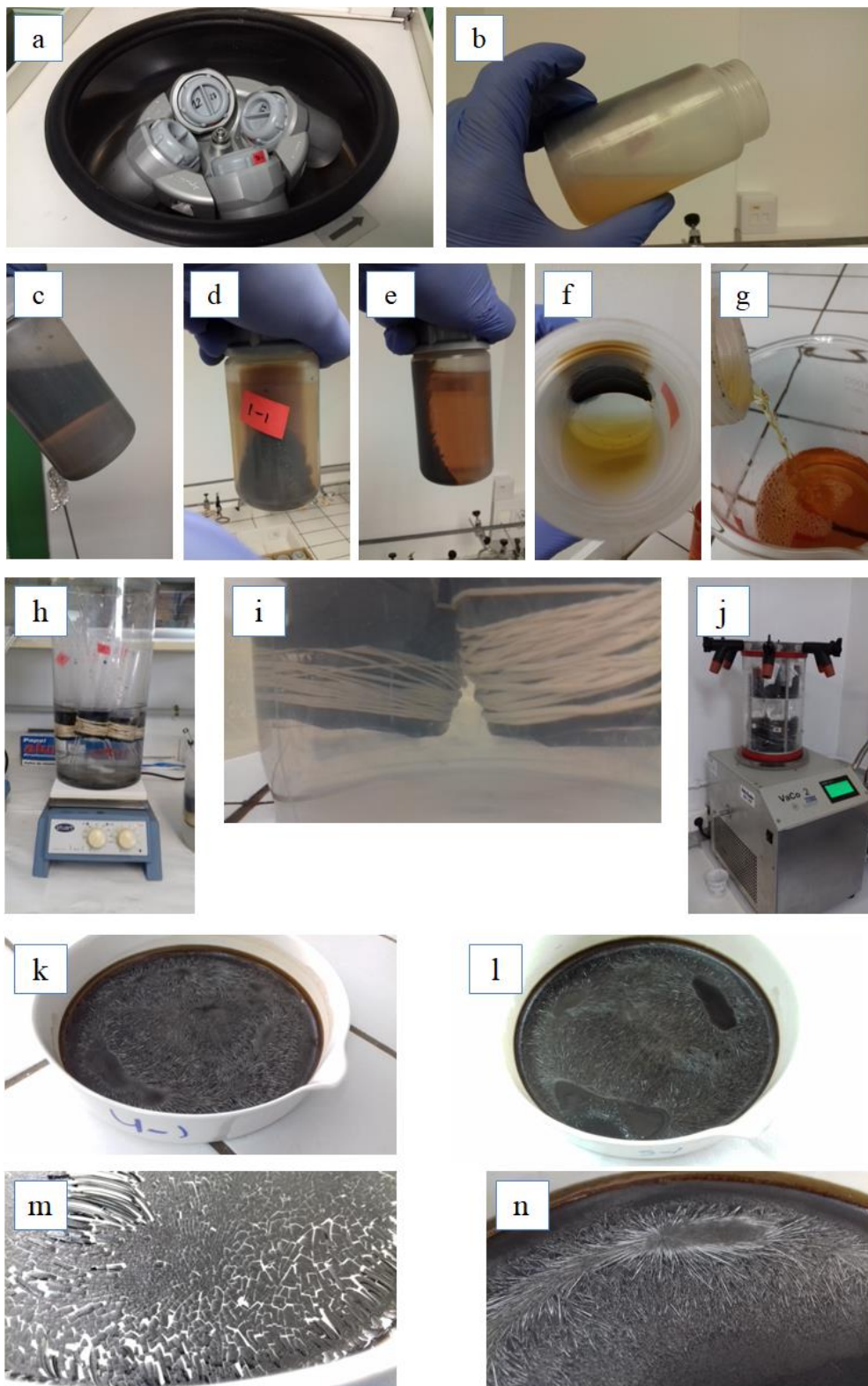


Figura 10. Distintas imágenes del proceso de extracción de AHs: a) centrifugado a 4000 rpm, b), d), e) y f) muestran el aspecto de las muestras tras el centrifugado a 7000 rpm, c) aspecto tras centrifugado a 4000 rpm, g) detalle del vertido del sobrenadante con ácidos fúlvicos, h) proceso de diálisis con agitación, i) detalle de las membranas de diálisis, j) equipo para liofilización, k) y l) aspecto de los extractos finales de AHs de dos muestras tras la liofilización, m) y n) detalles de extractos finales de AHs de dos muestras (Fuente propia).

3.4.6 Espectroscopia de Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Para caracterizar la composición de los AHs y evaluar posibles cambios en los grupos funcionales orgánicos debido a la enmienda con biochar se realizó el espectro de IR de cada una de las muestras de AHs según el protocolo descrito por Tandy *et al.* (2010).

Antes de realizar los espectros de infrarrojos de los ácidos húmicos extraídos, para cada muestra se elaboraron 2 pastillas con KBr en un pistón cilíndrico bajo alta presión y vacío, que se formularon con 100 mg de KBr seco a 200 °C y 1 mg de muestra molida en mortero de ágata, siguiendo el protocolo descrito por De la Rosa *et al.* (2014). Posteriormente se midieron los espectros en el rango de 4000 a 800 cm^{-1} en un espectrofotómetro marca Jasco Systems con transformada de Fourier (FT-IR), acumulando 60 scans para cada muestra (resolución 2 cm^{-1}) (Figura 11). Los espectros de las muestras se corrigieron tomando como blanco una pastilla de KBr puro. Toda la manipulación de los datos del IR fueron realizados usando JASCO spectra manager software ®.



Figura 11. a) Equipo de espectroscopía IR Jasco System; b) Pastilla de muestra con KBr en el soporte para medir su espectro IR (Fuente propia).

4. Resultados y discusión

4.1 Propiedades físicas y químicas del suelo

4.1.1 pH y Conductividad eléctrica

La adición de biochar a los suelos altamente contaminados incrementó el pH ligeramente (de $3,61\pm 0,02$ a $3,77\pm 0,39$ y $4,02\pm 0,09$). De manera similar el biochar de cascarilla de arroz incrementó levemente el pH de los suelos moderadamente contaminados (Tabla 3). El mayor incremento del pH del suelo después de añadir el biochar de cascarilla de arroz se debe a su pH más alcalino ($10,1\pm 0,3$). En el caso de la ligera disminución de pH (biochar de hueso de aceituna en suelo SAC), aunque no es significativa estadísticamente, la tendencia puede deberse a que el biochar no ha podido integrarse debidamente al suelo y no se ha integrado con él a nivel molecular. El aumento de pH en estos suelos ácidos tiene dos efectos positivos en la calidad del suelo enmendado. El primero es que un pH mayor favorecería el desarrollo de plantas. Un pH menor o cercano a 3, como se observa en la parcela control de SAC, dificulta el crecimiento y correcto desarrollo vegetal. El pH óptimo para el crecimiento de la mayoría de las plantas está entre 6,5 y 7, aunque muchas plantas pueden desarrollarse a pH entre 5,5 y 8,5. El segundo efecto positivo es la precipitación de los metales pesados que son más insolubles a mayor pH. De esta forma su biodisponibilidad disminuye, evitando su traspaso desde el suelo a las plantas y a las capas freáticas.

En el caso de la CE la Tabla 3 muestra que, en los suelos de acidez media, SAC, la CE de los suelos enmendados con biochar disminuye respecto a la muestra control, presentando una notable reducción el suelo tratado con biochar de cascarilla de arroz (de 64 ± 14 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 17 ± 12 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Este resultado podría indicar que el biochar está formando complejos órgano-minerales, captando iones del medio. En cambio, en el caso del suelo SAC los suelos enmendados presentan una mayor conductividad, siendo más elevado el aumento en el suelo enmendado con biochar de hueso de aceituna (de 429 ± 9 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 561 ± 15 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Aun así, los valores de CE registrados en todas las muestras se pueden considerar valores normales en suelos no indicando en ningún caso problemas de un exceso de sales solubles que pudieran dificultar el normal desarrollo de la vegetación.

Tabla 3. pH y Conductividad Eléctrica de las muestras de suelo de las parcelas estudiadas.

Muestra	pH ¹		CE ² (μ S/cm)	
	Media	d.e.	Media	d.e.
SAC-BA	4,02	0,09	523	16
SAC-BO	3,77	0,39	561	15
SAC-C	3,61	0,02	429	9
SMC-BA	6,03	0,04	17	12
SMC-BO	5,45	0,04	59	28
SMC-C	5,71	0,07	64	14

d.e.: Desviación estándar; ¹) Medido en H₂O; ²) CE: Conductividad eléctrica.

4.2 Propiedades hídricas del suelo

4.2.1 Humedad, contenido total de agua y capacidad de retención hídrica

El contenido en humedad de los suelos SAC y SMC enmendados fue generalmente superior al de los suelos control. El contenido en humedad de los suelos sin enmendar de la parcela medianamente contaminada SMC-C fue notablemente superior al de los suelos de la parcela altamente contaminada SAC-C (Tabla 4). Esto puede ser consecuencia indirecta de la elevada acidez de los suelos SAC, que dificulta el crecimiento vegetal y la actividad microbiana y no permite que el suelo desarrolle una estructura adecuada capaz de retener agua. La enmienda con biochar de estos suelos incrementó de manera clara la humedad de los suelos respecto al control SAC-C, siendo mayor para el biochar de hueso de aceituna (SAC-BO) que para el de cascarilla de arroz (SAC-BA). Para los suelos SMC, el suelo enmendado con biochar de cascarilla de arroz aumentó el porcentaje de humedad (de 11,2 \pm 0,1% a 16,2 \pm 0,9 %), mientras que teniendo en cuenta la desviación estándar de los valores medios no existen diferencias entre SMC-BO y SMC-C.

Respecto a los valores del contenido total de agua, siguen en todos los casos la misma tendencia que el porcentaje de humedad, viéndose incrementado por ambas enmiendas en el suelo SAC (Tabla 4). Por otra parte, en el suelo SMC el biochar de hueso de aceituna (SMC-BO) no produjo diferencias y sólo el biochar de cascarilla de arroz (SMC-BA) parece aumentar ligeramente el contenido total de agua en este tipo de suelo (de 12,4 % a 17,9 %) El aumento del porcentaje de humedad y del contenido total de agua del suelo reflejan un efecto positivo y esperado de la enmienda. Con una mayor

humedad la vida de microorganismos y la disponibilidad de nutrientes para las plantas se incrementan, aportando un soporte vital a las mismas.

Respecto a los valores de CRH, la Tabla 4 muestra que la adición de biochar tiende a aumentar en todos los casos la capacidad de retención hídrica de los suelos (Tabla 4), comparando con el control (no enmendado). El biochar de cascarilla de arroz en SMC parece ser el que logró un mayor aumento (de 75 ± 8 % a 93 ± 13 %) aunque teniendo en cuenta la desviación estándar no se puede confirmar una diferencia clara. La tendencia al aumento de la CRH del suelo se debe a la presencia del biochar, que le aporta su propia CRH al suelo (540 ± 77 % en el caso de BA y 66 ± 6 % en el caso de BO), además de ayudar a darle estructura, permitiéndole retener más cantidad de agua.

Tabla 4. Humedad, contenido total de agua y capacidad de retención hídrica de las muestras de suelo de las parcelas estudiadas.

Muestra	Humedad (40°C)		Contenido total de agua		CRH ¹	
	Media (%)	d.e.	Media (%)	Media (%)	d.e.	
SAC-BA	9,3	0,4	10,5	36	10	
SAC-BO	11,2	0,1	12,2	58	5	
SAC-C	5,6	0,1	6,7	43	4	
SMC-BA	16,2	0,9	17,9	93	13	
SMC-BO	10,6	0,2	11,6	85	10	
SMC-C	11,2	0,5	12,4	75	8	

d.e.: Desviación estándar; ¹) CRH: Capacidad de retención hídrica.

4.3 Caracterización química del suelo

En la Tabla 5 se muestra el contenido de los principales parámetros químicos determinados en las muestras de suelo.

Tabla 5. Determinación del contenido en materia orgánica por calcinación, análisis elemental (C, N) y materia orgánica oxidable.

Muestra	Materia orgánica del suelo					Análisis elemental						
	550°C ¹ (g · kg ⁻¹)		750°C ² (g · kg ⁻¹)		DIF ³ (g · kg ⁻¹)	NT (g · kg ⁻¹)		CT (g · kg ⁻¹)		C/N _{at} ⁴	CFO ⁵ (g · kg ⁻¹)	
	Media	d.e.	Media	d.e.		Media	d.e.	Media	d.e.	Media	Media	d.e.
SAC-BA	61,1	0,8	69,5	1,4	8,3	1,7	0,1	25,3	1,4	17,4	6,5	0,1
SAC-BO	63,0	0,4	71,3	1,3	8,2	1,8	0,1	25,0	2,1	16,7	8,1	0,7
SAC-C	51,4	0,5	61,1	0,7	9,7	2,1	0,2	9,2	0,9	5,2	8,1	0,1
SMC-BA	78,3	1,4	83,7	0,1	5,3	1,7	0,1	34,2	1,9	24,1	12,3	0,6
SMC-BO	61,3	4,8	66,5	6,0	5,1	1,3	0,1	21,0	2,6	19,7	9,3	0,5
SMC-C	45,0	0,6	50,2	0,5	5,1	1,3	0,1	11,0	1,8	10,4	9,8	0,2

d.e.: Desviación estándar; ¹) Materia orgánica por calcinación a 550 °C; ²) Materia orgánica por calcinación a 750 °C; ³) Diferencia entre MO 750°C y MO 550°C; ⁴) Ratio C/N atómico del suelo; ⁵) Carbono orgánico fácilmente oxidable (Walkley-Black).

4.3.1 Materia orgánica total del suelo

En general se ha encontrado que las enmiendas aumentaron considerablemente el contenido en MO del suelo, resultando los valores de los controles SMC-C y SAC-C con 45,0±0,6 g kg⁻¹ y 51,4±0,5 g kg⁻¹ respectivamente, medidos a 550°C, los más bajos. En los suelos SMC el contenido de materia orgánica más elevado se encontró en la parcela enmendada con BA (Tabla 5). En las parcelas SAC en cambio, teniendo en cuenta las desviaciones estándar, ambos biochars causaron un aumento similar de la MO.

La determinación de la materia orgánica por calcinación puede estar afectada de error por la pérdida de elementos fácilmente volátiles como S, As Hg y Se cuando la temperatura alcanza los 500°C y a temperaturas superiores además pueden sumarse pérdidas por volatilización de elementos como Al, B, Cu, K, and Mn (Miller, 1998). En la mayoría de los suelos la pérdida de elementos volátiles a 550°C no son significativas porque representan un porcentaje muy pequeño del total del suelo, sin embargo, en los suelos altamente contaminados de este estudio y cuando la temperatura asciende a 750°C, los resultados parecen indicar que la pérdida de masa puede no deberse

únicamente a materia orgánica al ocurrir mayoritariamente en el suelo no enmendado pudiendo corresponderse con la pérdida de otros componentes del suelo.

En relación a las diferencias en las determinaciones del contenido en materia orgánica realizadas a 750 y 550°C (Tabla 5) en los suelos enmendados (SAC-BA; SAC-BO; SMA-BA y SMA-BO) respecto a los controles (SAC-C y SMC-C, respectivamente) cabe destacar que no se observan cambios entre los dos tratamientos con biochar BA y BO en cada tipo de suelo. Parece que con el tiempo el biochar se ha integrado perfectamente con el resto de componentes del suelo. No se aprecia mayor pérdida de masa por la presencia de biochar en relación al control en SMC. En cambio, en SAC se aprecia que la mayor diferencia (9,7 g kg⁻¹) corresponde a la muestra control del suelo más contaminado (SAC-C). Esto puede deberse a que es el suelo que más iones volatilizables a 750°C contiene debido a estar muy contaminado y a que no tiene biochar que pueda adsorber dichos iones.

4.3.2 Análisis elemental (CT y NT)

El contenido total de C (CT) se ha incrementado sustancialmente en ambos tipos de suelos empleando ambas enmiendas respecto al suelo de las parcelas control, tal y como se esperaba, resultando siempre mayor el aumento con BA (Tabla 5). En el caso de los suelos SAC el aumento de CT fue similar para SAC-BA y SAC-BO (25,3±1,4 g kg⁻¹ y 25,0±2,1 g kg⁻¹ respectivamente) mientras que en los suelos SMC el suelo enmendado con biochar de cascarilla de arroz mostró una mayor subida (34,2±1,9 frente a 21,0±2,6 que presentó SMC-BO).

Este incremento del CT en las parcelas enmendadas se debe a la adición de biochar. El hecho de que este incremento sea medible y significativo es importante ya que las muestras de suelo se han medido tamizadas a 2 mm, mientras que los biochars añadidos tenían un tamaño de partícula superior a 5 mm, lo que implicaría que el biochar está siendo erosionado y fragmentado, facilitando su incorporación al suelo.

Teniendo en principio el biochar de hueso de aceituna un mayor contenido en CT (927,1±1,6 g kg⁻¹) que el de cascarilla de arroz (536,6±1,4 g kg⁻¹), es el biochar de cascarilla de arroz el que presenta el mayor aumento en el CT del suelo SMC. Esto podría indicar que el BA tiene una facilidad mayor para incorporarse al suelo.

En cuanto al contenido total de N (NT) no se han observado variaciones notables. En general son valores bajos, incluso se reducen ligeramente en los SAC enmendados con

biochar, lo que podría deberse al efecto *priming* combinado con la mayor demanda de Nitrógeno por parte de la vegetación que se ha desarrollado en los suelos enmendados. Por otro lado, se ha observado un gran aumento del ratio C/N para los suelos SAC y SMC enmendados con ambos biochar respecto a los controles (Tabla 5). Esto se debe a que los biochars tienen alto contenido en carbono ($536,6 \pm 1,4 \text{ g kg}^{-1}$ en BA y $927,1 \pm 1,6 \text{ g kg}^{-1}$ en BO) y muy bajo contenido en nitrógeno ($5,1 \pm 2,4 \text{ g kg}^{-1}$ en BA y $1,6 \pm 0,9 \text{ g kg}^{-1}$ en BO), al añadirlos se incrementa el ratio C/N y podría producirse la inmovilización del N del suelo si este subiera por encima de 20 (Batjes, 1996; Sterner, 1995).

4.3.3 Materia orgánica oxidable

Se ha observado que sólo el biochar de cascarilla de arroz en suelos SMC aumenta la cantidad de CFO (de $9,8 \pm 0,2$ a $12,3 \pm 0,6 \text{ g/kg}$). Para los suelos SAC no se observó que el contenido aumentara con la enmienda de ninguno de los biochar, e incluso en SAC-BA se redujo la cantidad de CFO respecto al control SAC-C.

Como se ha visto anteriormente ambas enmiendas han aumentado el contenido en las fracciones orgánicas del suelo MO y CT, pero no causaron el mismo efecto en el CFO del suelo, posiblemente debido a su gran estabilidad y recalcitrancia a ser oxidados.

4.3.4 Contenido en azúcares

No fue posible obtener datos válidos resultantes de la determinación colorimétrica de azúcares dado que los valores medidos se encuentran fuera del rango de la recta patrón. Debido a la declaración del estado de alarma por el COVID-19 no fue posible repetir la medida con la dilución adecuada como hubiera sido deseable, no obstante, está previsto repetir esta determinación en Septiembre.

4.3.5 Ácidos húmicos

El porcentaje de ácidos húmicos (AHs) de las muestras está calculado con el peso de extracto seco final obtenido, pero se debe tener en cuenta que este extracto puede contener arcillas y restos minerales que no se pudieron eliminar porque era necesaria una centrífuga con mayor velocidad de rotación. Las arcillas quedan íntimamente ligadas a la materia orgánica.

Se observa que los valores de cantidad de AHs de los suelos SAC tienden a presentar un menor contenido en AHs que los SMC (Tabla 6), lo que era de esperar debido a su menor contenido en materia orgánica y su dificultad para el desarrollo de vegetación. La

tabla 6 muestra como la aplicación de biochar no modificó el contenido en AHs en comparación con los suelos control en ninguno de los dos tipos de suelo. Teniendo en cuenta que los AHs se producen por la descomposición de la materia orgánica, durante el proceso de humificación, este resultado indicaría que en 20 meses no se ha producido la humificación de los biochars, que presuntamente poseen una gran estabilidad frente a la degradación.

Los datos de contenido en C de las muestras de AHs indican el contenido real de húmicos extraído para cada tratamiento, descartando arcillas e impurezas. Por tanto, al observar los valores de CT de los AHs se aprecia que, teniendo en cuenta las desviaciones estándar, en los suelos SAC no se produjo cambio entre los suelos enmendados y el control. Sin embargo, en los suelos SMC parece que el biochar de cascarilla de arroz podría haber aumentado el CT de los AHs, sin llegar a ser en ningún caso concluyente según las desviaciones estándar. Se aprecia también en los valores de la tabla 6 que los suelos SMC tienden a presentar un mayor contenido en CT de los AHs, lo cual es lógico, pues son suelos con mayor cantidad de materia orgánica para degradar. De igual forma ocurre con el carbono contenido en los AHs del suelo.

No se aprecian variaciones notables del contenido en nitrógeno de los AHs, salvo que el suelo control de tipo SAC parece presentar un mayor contenido. Sin embargo, al tener en cuenta las desviaciones estándar, el biochar no parece haber afectado a la cantidad de nitrógeno de los AHs.

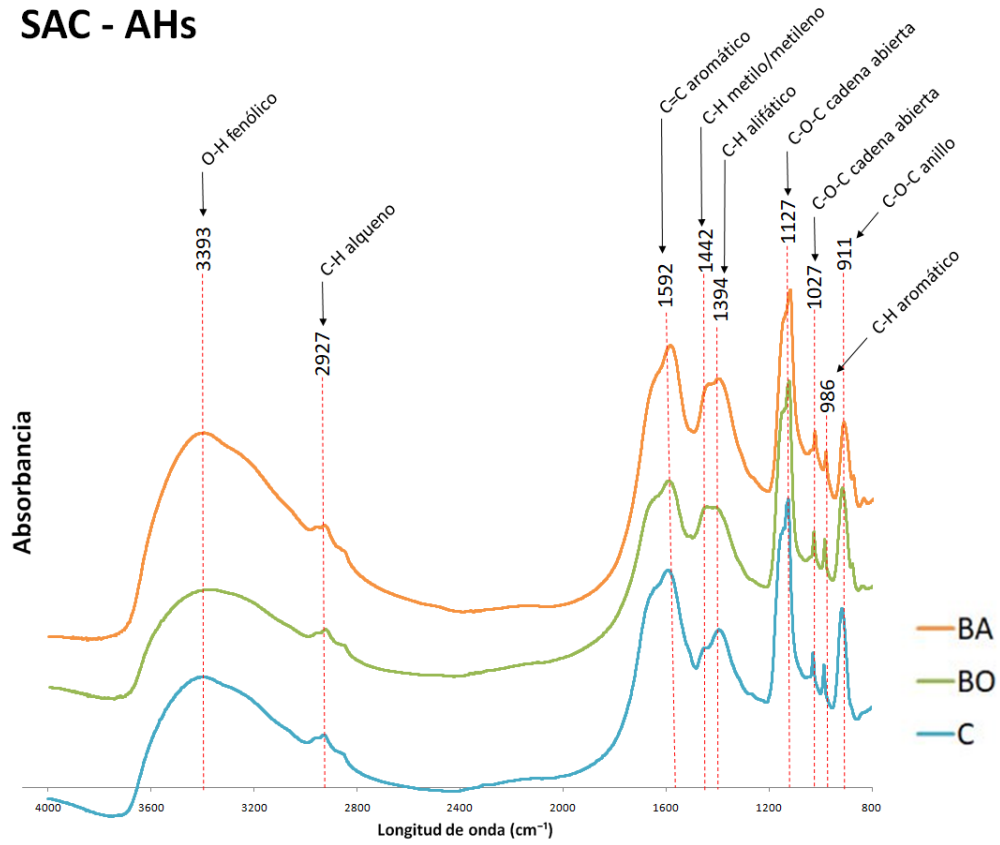
Tabla 6. Datos obtenidos en la extracción de AHs.

Muestra	Ácidos húmicos						Carbono contenido en los AHs del suelo ⁴ (g C-AHs · kg suelo ⁻¹)
	Contenido en AHs ¹ (g · kg ⁻¹)		CT-AHs ² (g C · kg AHs ⁻¹)		NT-AHs ³ (g N · kg AHs ⁻¹)		
	Media	d.e.	Media	d.e.	Media	d.e.	
SAC-BA	8,2	1,3	312,0	29,8	24,0	3,6	2,5
SAC-BO	8,9	2,5	312,7	21,7	23,5	2,7	2,8
SAC-C	8,9	0,5	326,2	47,8	29,0	1,7	2,9
SMC-BA	12,0	3,9	402,4	19,8	27,2	1,8	4,8
SMC-BO	11,1	2,7	379,6	14,8	28,9	1,5	4,2
SMC-C	12,8	1,4	372,6	8,4	25,9	0,8	4,8

d.e.: Desviación estándar; 1) Contenido en ácidos húmicos; 2) CT de los AHs; 3) NT de los AHs; 4) Carbono contenido en los AHs del suelo.

En cuanto a la caracterización de los ácidos húmicos mediante Espectroscopía IR, se observa que los AHs están constituidos por grupos fenólicos, éteres tanto de anillo como de cadena abierta posiblemente derivados de carbohidratos, compuestos aromáticos, cadenas alifáticas y dobles enlaces C=C. No hay un cambio cualitativo en cuanto a la composición de los AHs presentes en el suelo debido a la aplicación del biochar, de lo cual se deduce que no ha producido cambios o bien que hay que esperar un periodo de tiempo mayor para observarlos.

SAC - AHs



SMC - AHs

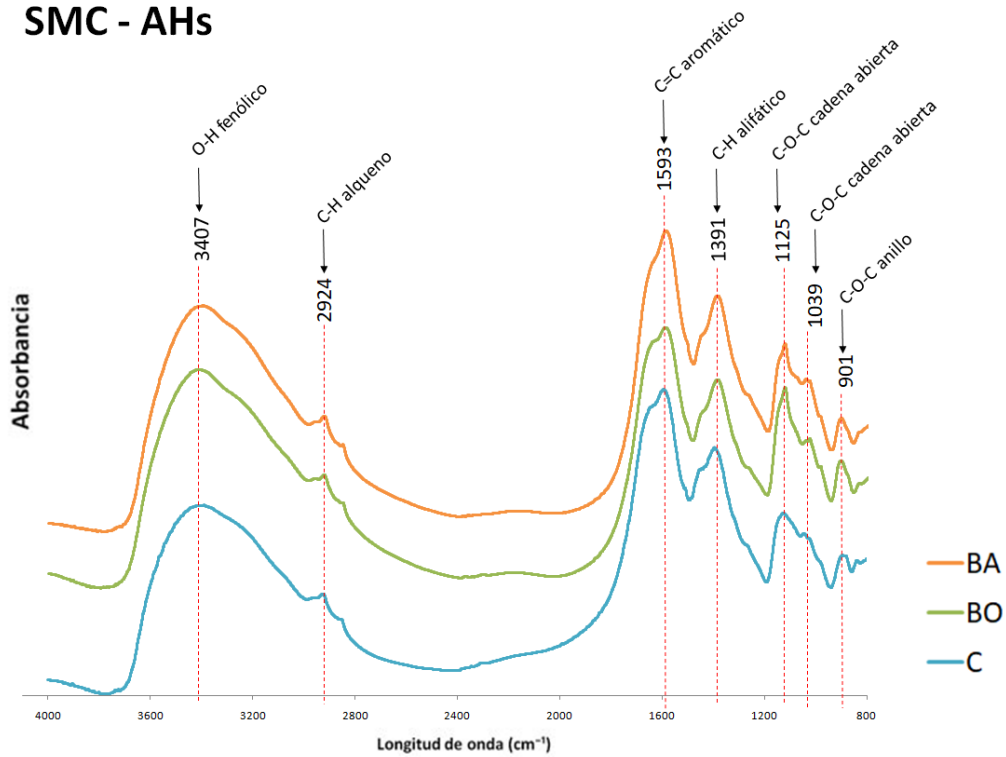


Figura 12. Espectros IR de las muestras de AHs de los suelos SAC y SMC con picos asignados.

5. Conclusions

Results of this study performed on soils contaminated by trace elements and extracted humic acids taken 20 months after the addition of biochars indicate that: rice husk biochar (and in some cases olive pit biochar) addition slightly increased soil pH, soil moisture, water retention, soil carbon and organic matter contents. Oxidizable organic matter contents indicated that the biochars applied are very stable. These results coincide with the analysis of humic acids, which were not altered due to the use of biochar as soil ameliorant. Nevertheless, it will be necessary a periodic analysis of humic acids composition and content to check its biochar possible modification.

Biochar addition increased soil pH at both SAC and SMC. Therefore, biochar could reduce the bioavailability of trace elements, helping to enhance plants development. Similarly, biochar enhanced soil structure allowing more water retaining in soil, leading to more favorable conditions for plant growth and nutrients availability.

Biochar hugely increased Carbon/Nitrogen soil ratio and it also has an effect on vegetation development that eventually leads to a higher immobilization and lack of Nitrogen. Despite of Carbon/Nitrogen soil ratio under 20 means that there is still available Nitrogen, it is recommended to use some additional Nitrogen input coupled with the biochar addition or use biochar with higher nitrogen content. Both biochars, BA and BO improved soil physical properties but further research is needed to achieve confident results concerning the medium and long-term effects of biochar addition.

6. Bibliografía

- Agegnehu, G., Bass, A., Nelson, P., Bird, M., 2016. Benefits of biochar, compost and biochar-compost for soil quality, maize yield and greenhouse gas emissions in a tropical agricultural soil. *Science of the Total Environment*, 543, p. 295-306.
- Aiken, G.R., McKnight, D.M., Wershaw, R.L., 1985. *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*. Wiley, New York.
- Balser, T.C., 2005. Humification. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, Elsevier Ltd., p. 195-207.
- Bardos, P., Chapman, T., Andersson-Sköld, Y., Blom, S., Keuning, S., Polland, M., Track, T., 2008. Biomass production on marginal land. *Biocycle*, 49(12), p. 50-52.

- Batjes, N.H., 1996. Total carbon and nitrogen in the soils of the world. *European Journal of Soil Science*, 47, p. 151-163.
- Beesley, L., Moreno-Jiménez, E., Gomez-Eyles, J., Harris, E., Robinson, B., Sizmur, T., 2011. A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils. *Environmental Pollution*, 159 (12) p. 3269-3282.
- Cabrera, F.; Clemente, L.; Díaz Barrientos, E.; López, R.; Murillo, J.M., 1999. Heavy metal pollution of soils affected by the Guadamar toxic flood. *Science of the Total Environment*, 242, p. 117–129.
- Campos, P., Miller, A., Knicker, H., Costa-Pereira, M., Merino, A., De la Rosa, J.M., 2020. Chemical, physical and morphological properties of biochars produced from agricultural residues: Implications for their use as soil amendment. *Waste Management*, 105, p. 256-267.
- Cao, Y., Gao, Y., Qi, Y., Li, J., 2018. Biochar-enhanced composts reduce the potential leaching of nutrients and heavy metals and suppress plant-parasitic nematodes in excessively fertilized cucumber soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8), p. 7589–7599.
- Chantigny, M.H., Angers, D.A., Kaiser, K., Kalbitz, K., 2006. Soil Sampling and Methods of Analysis. Chapter 48: Extraction and Characterization of Dissolved Organic Matter. Taylor and Francis Group, LLC, p. 617-635.
- Ciadamidaro, L., Madejón, P., Camacho, F., Fernández Boy, E., Madejón, E., 2016. Organic Compost to Improve Contaminated Soil Quality and Plant Fertility. *Soil Science*. 181(11/12), p. 487–493.
- Clemente R and Bernal M., 2006. Fractionation of heavy metals and distribution of organic carbon in two contaminated soils amended with humic acids. *Chemosphere*, 64(8), p. 1264-1273.
- COM, 2006. Commission Communication 231 of 22 September 2006 on the Thematic Strategy for Soil Protection.
- COM, 2006. Commission Proposal 232 of 22 September 2006 for a Directive of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the protection of soil and amending Directive 2004/35/EC.

- De la Rosa, J.M., Paneque, M., Miller, A.Z., Knicker, H., 2014. Relating physical and chemical properties of four different biochars and their application rate to biomass production of *Lolium perenne* on a Calcic Cambisol during a pot experiment of 79 days. *Science of the Total Environment*, 499, p. 175–184.
- De la Rosa, J.M., Rosado, M., Paneque, M., Miller, A.Z., Knicker, H., 2018. Effects of aging under field conditions on biochar structure and composition: Implications for biochar stability in soils. *Science of the Total Environment*, 613–614, p. 969–976.
- De la Rosa, J.M., Sánchez-Martín, A.M., Campos, P., Miller, A.Z., 2019. Effect of pyrolysis conditions on the total contents of polycyclic aromatic hydrocarbons in biochars produced from organic residues: Assessment of their hazard potential. *Science of the Total Environment*, 667, p. 578–585.
- De la Rosa, J.M., Santos, M., Araújo, M.F., 2011. Metal binding by humic acids in recent sediments from the SW Iberian coastal area. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 93, p. 478–485.
- Dias, B.O., Silva, C.A., Higashikawa, F.S., Roig, A., Sánchez-Monedero, M.A., 2010. Use of biochar as bulking agent for the composting of poultry manure: effect on organic matter degradation and humification. *Bioresource Technology*, 101, p. 1239–1246.
- Domínguez, M.T.; Alegre, J.M.; Madejón, P.; Madejón, E.; Burgos, P.; Cabrera, F.; Marañón, T.; Murillo, J.M. 2015. Contaminación de suelos con elementos traza en el accidente de Aznalcóllar tras su limpieza en diferentes escenarios. En: CONDEGRES 2015, 150-151. Bilbao.
- Domínguez, M.T., Alegre, J.M., Madejón, P., Madejón, E., Burgos, P., Cabrera, F., Marañón, T., Murillo, J., 2016. River banks and channels as hotspots of soil pollution after large-scale remediation of a river basin. *Geoderma*, 261, p. 133–140.
- Domínguez, M.T., Marañón, T., Murillo, J.M., Schulin, R., Robinson, B.H., 2008. Trace element accumulation in woody plants of the Guadiamar valley, SW Spain: a large scale phytomanagement case study. *Environmental Pollution*, 152, p. 50–59.

- EEA (European Environmental Agency), 2007. Progress in management of contaminated sites. Report CSI 015, Copenhagen, Denmark: European Environment Agency.
- EuropaPress, El Periódico de Extremadura, 2020. Aznalcóllar pide rebrir la mina en el aniversario del desastre. https://www.elperiodicoextremadura.com/noticias/sociedad/aznalcollar-pide-reabrir-mina-aniversario-desastre_1230419.html. 26/04/2020.
- European Commission, 2012. The State of Soil in Europe: A contribution of the JRC to the European Environment Agency's State and Outlook Report - SOER 2010. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- European Parliament - Policy Department B: Structural and Cohesion Policies - Agriculture and Rural Development., 2009. The challenge of deterioration of agricultural land in the EU and in particular in Southern Europe - The response through EU agricultural policy instruments. Press Release of the European Commission, Brussels.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2008. Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis. FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin, 19, Rome.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2019. Standard operating procedure for soil organic carbon. Walkley-Black method: titration and colorimetric method. 3rd GLOSOLAN Meeting, FAO HQ, Rome, Italy, 28-30 October, 2019, GLOSOLAN-SPO-02.
- Glaser, B., Lehmann, J., Zech, W., 2002. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal—A review. *Biology and Fertility of Soils*, 35(4), p. 219–230.
- Hoogsteen, M. J. J., Lantinga, E. A., Bakker, E. J., Grooty, J. C. J., Tittonell, P. A., 2015. Estimating soil organic carbon through loss on ignition: effects of ignition conditions and structural water loss. *European Journal of Science*, 66(2), p. 320-328.
- Huber and Prokop, 2012. Progress in the management of contaminated sites. EIONET Workshop on Soil, Ispra, 10- 12 December.

- Jindo, K., Sonoki, T., Matsumoto, K., Canellas, L., Roig, A. Sánchez-Monedero, M., 2016. Influence of biochar addition on the humic substances of composting manures. *Waste Management*, 49, p. 545-552.
- Kidd, P., Mench, M., Álvarez-López, V., Bert, V., Dimitriou, I., Friesl-Hanl, W., Neu, S., 2015. Agronomic practices for improving gentle remediation of trace element-contaminated soils. *International Journal of Phytoremediation* 17(11), p. 1005–1037.
- Laird, D., Fleming, P., Wang, B., Horton, R., Karlen, D., 2010. Biochar impact on nutrient leaching from a Midwestern agricultural soil. *Geoderma*, 158, p. 436–442.
- Lehmann, J. (2007). A handful of carbon. *Nature*, 447, p. 143–144.
- Lehmann, J., Joseph, S., 2009. *Biochar for Environmental Management: Science and Technology*. Earthscan, London.
- Lehmann, J., Rillig, M., Thies, J., Masiello, C., Hockaday, W., Crowley, D., 2011. Biochar effects on soil biota – A review. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(9), p.1812-1836.
- Liang, B., Lehmann, L., Sohi, S. P., Thies, J. E., O'Neill, B., Trujillo, L., Gaunt, J., Solomon, D., Grossman, J., Neves, E., Luizao, F. J., 2010. Black carbon affects the cycling of non-black carbon in soil. *Organic Geochemistry*, 41(2), p. 206-213.
- Longobardi, P., Montenegro, A., Beltrami, H., Eby, M., 2016. Deforestation induced climate change: effects of spatial scale. *PLoS One*, 11(4).
- Lu H, Zhang YY, Huang X, Wang S, Qiu R (2012) Relative distribution of Pb²⁺ sorption mechanisms by sludge-derived biochar. *Water Research*, 46(3), p. 854–862.
- Madejón, P., Domínguez, M.T., Murillo, J.M., 2009. Evaluation of pastures for horses grazing on soils polluted by trace elements. *Ecotoxicology*, 18, p. 417-428.
- Madejón, E., Madejón, P., Domínguez, M.T., Marañón, T., Cabrera, F., Murillo, J.M., 2018. Restoration strategies in soils of Guadiamar area (South Spain). Evaluation of the success after twenty years since the Aznalcóllar mine accident. *Global Symposium On Soil Pollution*, FAO HQ, Rome, Italy, 2-4 May 2018, p. 675-677.

- Madejón, P., Domínguez, M.T., Madejón, E., Cabrera, F., Marañón, T., Murillo, J.M., 2018. Soil-plant relationships and contamination by trace elements: A review of twenty years of experimentation and monitoring after the Aznalcóllar (SW Spain) mine accident. *Science of the Total Environment*, 625, p. 50-63.
- Madejón, P., Pérez-de-Mora, A., Burgos, P., Cabrera, F., Lepp, N., Madejón, E., 2010. Do amended, polluted soils require re-treatment for sustainable risk reduction? - Evidence from field experiments. *Geoderma*, 159(1-2), p. 174-181.
- Miller, R.O., 1998. Handbook of reference methods for plant analysis. Chapter 5: High-temperature oxidation: dry ashing, CRC press, p. 53, 55.
- Panagos, P., Liedekerke, M.V., 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*.
- Paz-Ferreiro, J., Lu, H., Fu, S., Méndez, A., Gascó, G., 2014. Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: a review. *Solid Earth*, 5, p. 65– 75.
- Post, W. M. and Kwon, K. C. 2000. Soil Carbon Sequestration and Land-Use Change: Processes and Potential. *Global Change Biology*, 6, p. 317–328.
- Público, 2018. La vida bulle a las puertas de Doñana mientras se prepara la reapertura de la mina de Aznalcóllar. <https://www.publico.es/sociedad/catastrofe-aznalcollar-vida-bulle-puertas-donana-prepara-reapertura-mina-aznalcollar.html>. 24/04/2018.
- Puga, A. P., Abreu, C. A., Melo, L. C. A., Paz-Ferreiro, J., Beesley, L., 2015. Cadmium, lead, and zinc mobility and plant uptake in a mine soil amended with sugarcane straw biochar. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(22), p. 17606-17614.
- Schröder, P., Beckers, B., Daniels, S., Gnädinger, F., Maestri, E., Marmiroli, N., Mench, M., Millan, R., Obermeier, M., Oustriere, N., Persson, T., Poschenreider, C., Rineau, F., Rutkowska, B., Schmid, T., Szulc, W., Witters, N., Sæbø, A., 2018. Intensify production, transform biomass to energy and novel goods and protect soils in Europe – A vision how to mobilize marginal lands. *Science of the Total Environment*, Elsevier B.V., 616-617, p. 1101-1123.

- Science Communication Unit, European Commission, 2013. In-depth Report: Soil Contamination: Impacts on Human Health. Science for Environment Policy, UWE, Bristol, issue 5.
- Spaccini, R., Piccolo, A., Conte, P., Haberhauer, G., Gerzabek, M.H., 2002. Increased soil organic carbon sequestration through hydrophobic protection by humic substances. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, p. 1839–1851.
- Sohi, S.P., Krull, E., Lopez-Capel, E., Bol, R., 2010. Chapter Two: A Review of Biochar and Its Use and Function in Soil. *Advances in Agronomy*, Academic Press Inc., 105(1), p. 47-82.
- Soil Survey Staff, 2014. *Keys to Soil Taxonomy*, 12th ed. United States Department of Agriculture (USDA), Natural Resources Conservation Service (NRCS), Washington, DC.
- Sterner, R.W., 1995. Elemental stoichiometry of species in ecosystems. Linking species and ecosystems. Chapman and Hall, New York, USA, p. 240–252.
- Stevenson, F.J., 1994. *Humus chemistry*. 2nd ed. John Wiley & Sons. New York.
- Tandy, S., Healey, J., Nason, M., Williamson, J., Jones, D., Thain, S., 2010. FT-IR as an alternative method for measuring chemical properties during composting, *Bioresource Technology*, 101(14), p. 5431-5436.
- Tang, J., Zhang, L., Zhang, J., Ren, L., Zhou, Y., Zheng, Y., Luo, L., Yang, Y., Huang, H., Chen, A., 2020. Physicochemical features, metal availability and enzyme activity in heavy metal-polluted soil remediated by biochar and compost. *Science of the Total Environment*, 701, p. 1-8.
- Tripathi, D., Singh, K. Mansoori, M.A., 2019. Recent Trends and Advances in Environmental Health. Chapter 4: Soil Pollution: Health Implications and Management. ICMR-National Institute for Research in Environmental Health, Bhopal, India, p. 41-63.
- Veihmeyer, F.J., Hendrickson, A.H., 1931. The moisture equivalent as a measure of the field capacity of soils. *Soil Sci.* 32, p. 181–193.

- Walkley, A. & Black I.A., 1934. An examination of the Degtjareff Method for Determining Soil Organic Matter, and a proposed Modification of the Chromic Acid Titration Method. *Soil Science*, 37(1), p. 29-38.
- Whitman, T., Enders, A., Lehmann, J., 2014. Pyrogenic carbon additions to soil counteract positive priming of soil carbon mineralization by plants. *Soil Biology and Biochemistry*. 73, p. 33-41.
- Zaccone, C., Coccozza, C., Cheburkin, A.K., Shotyk, W., Miano, T.M., 2008. Distribution of As, Cr, Ni, Rb, Ti and Zr between peat and its humic fraction along an undisturbed ombrotrophic bog profile (NW Switzerland). *Applied Geochemistry*, 23, p. 25-33.
- Zech, W., Senesi, N., Guggenberger, G., Kaiser, K., Lehmann, J., Miano, T.M., Miltner, A., Schroth, G., 1997. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the Tropics. *Geoderma*, 79, p. 117-161.
- Zhang, J., Lü, F., Shao, L., He, P., 2014. The use of biochar-amended composting to improve the humification and degradation of sewage sludge. *Bioresource Technology*, 168, p. 252–258.
- Zhang, X., Wang, H., He, L., Lu, K., Sarmah, A., Li, J., Bolan, N., Pei, J., Huang, H., 2013. Using biochar for remediation of soils contaminated with heavy metals and organic pollutants. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(12), p. 8472-8483.