

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS



**EVALUACIÓN DE CAC (COMPOST  
AGOTADO DE CULTIVO DE CHAMPIÑÓN)  
COMO ENMIENDA RECUPERADORA DE  
SUELOS ÁCIDOS DE MINA  
CONTAMINADOS CON METALES  
PESADOS**

TESIS DOCTORAL

IVÁN FRUTOS VÁZQUEZ  
MADRID, 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DE CAC (COMPOST AGOTADO  
DE CULTIVO DE CHAMPIÑÓN) COMO  
ENMIENDA RECUPERADORA DE SUELOS  
ÁCIDOS DE MINA CONTAMINADOS CON  
METALES PESADOS

TESIS DOCTORAL

Iván Frutos Vázquez

DIRECTORES: Dr. Enrique Eymar Alonso  
Dr. Agustín Gárate Ormaechea

MADRID, 2009

# EVALUACIÓN DE CAC (COMPOST AGOTADO DE CULTIVO DE CHAMPIÑÓN) COMO ENMIENDA RECUPERADORA DE SUELOS ÁCIDOS DE MINA CONTAMINADOS CON METALES PESADOS

Memoria que presenta D. Iván Frutos Vázquez para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias

## LOS DIRECTORES

Dr. D. ENRIQUE EYMAR ALONSO  
Profesor Titular  
Universidad Autónoma de Madrid

Dr. D. AGUSTÍN GÁRATE ORMAECHEA  
Catedrático  
Universidad Autónoma de Madrid

## ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
3. OBJETIVOS GENERALES .....	22
4. CARACTERIZACIÓN DEL CAC Y SUS COMPONENTES.....	25
5. ENSAYO DE ADSORCIÓN DE Cd, Pb Y Cu EN CAC .....	59
6. ENSAYO DE DESORCIÓN DE Cd EN CAC.....	84
7. EVALUACIÓN DE LA DISPONIBILIDAD DE METALES PESADOS EN SUELOS CONTAMINADOS ENMENDADOS CON CAC.....	104
8. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE CAC SOBRE SUELOS ÁCIDOS DE MINA. CULTIVO DE <i>Atriplex halimus</i> .....	126
9. CONCLUSIONES GENERALES.....	161
10. BIBLIOGRAFÍA.....	163

# I. RESUMEN

## I. RESUMEN

La presente memoria trata del estudio del potencial recuperador de suelos de mina contaminados con metales pesados, del compost agotado de cultivo del champiñón (CAC). Este residuo orgánico, proveniente de la industria del champiñón, es generado en gran cuantía (~15 millones de toneladas al año en todo el mundo) especialmente en países como China, Estados Unidos o la Unión Europea. Su acumulación en vertederos localizados, está provocando problemas de contaminación en las zonas colindantes a éstos, ya que es capaz de lixiviar elevadas cantidades de sales y compuestos orgánicos.

Sin embargo, un uso adecuado de este material, puede mejorar las condiciones de fertilidad de suelos erosionados (como los de las minas abandonadas), debido principalmente a que gran parte de dichas sales, son nutrientes para las plantas. Además su composición orgánica puede provocar diversos procesos de adsorción de metales pesados. Por ello, la aplicación de CAC a suelos de minas de metales pesados puede ser una técnica barata de recuperación de estos ecosistemas degradados.

Para evaluar este potencial recuperador, primeramente se realizó una caracterización de los materiales primarios que componen el CAC, y de éste mismo, en distintas etapas de su elaboración. Posteriormente, por medio de diversos ensayos de laboratorio, se estudió el comportamiento del CAC y de sus materiales primarios, frente a Cd, Pb y Cu.

Se caracterizaron dos suelos de mina de la Comunidad de Madrid, para comprobar después, mediante ensayos de agitación, el efecto que sobre ellos ejercían diversas dosis de CAC.

Mediante un ensayo en invernadero con diversas plantas autóctonas se seleccionó la especie *Atriplex halimus* como planta indicadora de la biodisponibilidad de metales pesados en suelo. Esta especie se cultivó en invernadero en los dos suelos caracterizados y sobre éstos mismos enmendados con 40 y 80 t ha<sup>-1</sup> de CAC. Posteriormente se evaluó el efecto que el CAC había provocado sobre el pH de los

suelos, el fraccionamiento de metales, la concentración de metales en lixiviados y en planta, y sobre el desarrollo vegetativo de ésta.

Los resultados mostraron que el CAC es un sustrato básico (pH 8) con notorias concentraciones de K, P y materia orgánica. Esta última está compuesta principalmente por celulosa y derivados (50 % del C total), provenientes de la paja de trigo empleada en la elaboración del CAC. También presenta cierta proporción de ácidos carboxílicos (8 %), grupos aromáticos (9 %) y moléculas del tipo N-alquil (11 %), provenientes principalmente del orujo de uva, y de las gallinazas utilizadas como componentes primarios.

El Cd mostró una capacidad máxima de adsorción sobre CAC (medida en isotermas de adsorción, modelo de Langmuir) de  $40,4 \text{ mg g}^{-1}$ , uniéndose principalmente a los grupos carboxílicos. El Pb se adsorbió preferentemente sobre moléculas de celulosa y derivados, con una capacidad máxima de adsorción sobre CAC de  $15,2 \text{ mg g}^{-1}$ . El Cu no mostró preferencia por ninguna fracción en particular del CAC, observándose una capacidad máxima de adsorción en CAC de  $36,2 \text{ mg g}^{-1}$ .

La adsorción de estos metales en CAC resultó ser lo bastante fuerte como para resistir extracciones con agua,  $\text{CaCl}_2$  o ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Sin embargo, la extracción con DTPA consiguió desorber la mayor parte de los metales retenidos en CAC.

La enmienda con CAC a los suelos de mina estudiados, provocó un aumento significativo de pH, una disminución importante en la concentración de metales en los lixiviados y un mayor desarrollo de la especie *A. halimus* cultivada en ellos. Además, cuanto mayor fue la dosis de CAC, menor concentración de metales pesados absorbió la planta, indicando la disminución de la biodisponibilidad de éstos.

Así pues, el CAC resultó ser un material adecuado para enmendar suelos ácidos de mina contaminados con metales pesados, disminuyendo la lixiviación y biodisponibilidad de los mismos y aumentando los niveles nutricionales del suelo.

## **II. ANTECEDENTES**



# ÍNDICE

<b>1. EL SUELO .....</b>	<b>3</b>
1.1. Definición y funciones.....	3
1.2. Contaminación de suelos .....	6
1.3. Legislación.....	7
<b>2. CONTAMINACIÓN DE ORIGEN MINERO.....</b>	<b>9</b>
<b>3. FITORREMEDIACIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>4. ADICIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS EN SUELOS CONTAMINADOS..</b>	<b>15</b>
4.1. Compost de cultivo de champiñón (CAC).....	17
4.1.1 Producción y problemática del CAC .....	17
4.1.2. Aplicaciones potenciales del CAC .....	19

## I. ANTECEDENTES

Con el objetivo de facilitar la lectura y comprensión de la presente memoria, se ha estructurado por capítulos independientes, aunque relacionados entre sí. Cada capítulo (exceptuando II, III, IX y X, correspondientes a Antecedentes, Objetivos Generales, Conclusiones Generales y Bibliografía) consta de su propia introducción, objetivos, materiales y métodos, resultados y discusión y conclusiones. En este primer capítulo se exponen de forma breve ciertos conceptos y aspectos generales que más adelante se tratarán en detalle.

### 1. EL SUELO

#### 1.1. Definición y funciones

A lo largo de la historia se han elaborado numerosas definiciones del concepto “suelo”, en la mayor parte de ellas se le considera como uno de los recursos naturales más valiosos del planeta. Ya en 1972, en Estrasburgo, se redactó la Carta de los Suelos del Consejo de Europa, donde se describió al suelo de la siguiente manera (Biblioteca virtual de la Comunidad de Madrid, 2009):

*“El suelo es un medio vivo y dinámico que permite la existencia de la vida vegetal y animal. Es esencial para la vida del hombre en tanto que es fuente de alimento y de materias primas. Elemento fundamental de la Biosfera y contribuye con la vegetación y el clima a regular el ciclo hidrológico influyendo en la calidad de las aguas”.*

Incluso en este primer documento a nivel europeo se resaltaba la importancia del equilibrio dinámico propio del suelo y las posibles consecuencias que podía acarrear la actividad humana descontrolada.

*“El suelo es una delgada película que recubre una parte de la superficie de los continentes. La utilización está limitada por el clima y por la topografía. Se forma lentamente por procesos físicos, físico-químicos y biológicos, pero que puede ser*

*destruido rápidamente por culpa de una acción inconsciente. La productividad del suelo puede ser mejorada por una ordenación apropiada en años o en decenios. Su reconstrucción una vez que ha disminuido o destruido puede exigir siglos”.*

Desde el punto de vista de las reacciones que en él ocurren, el suelo se puede ver como un vasto sistema en equilibrio dinámico en el que coexisten líquidos, sólidos y gases, y que a su vez se relacionan con los organismos vivos, que no solo habitan en él, sino que forman parte de él.

La fase sólida comprende, principalmente los minerales formados por compuestos relacionados con la litosfera, como sílice, arcilla, cal, óxidos de Fe y Mn y materia orgánica en diferentes estados de humificación.

La fase líquida se refiere al agua de la hidrosfera que se filtra entre las partículas del suelo y que contiene todo tipo de compuestos orgánicos e inorgánicos disueltos en ella.

Por último, la fase gaseosa la cual tiene una composición similar a la del aire de la atmósfera, aunque con mayor proporción de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Además, presenta un contenido muy alto de vapor de agua y otras sustancias volátiles a temperatura ambiente.

Las reacciones químicas ocurridas en cada una de las fases afectan directamente al resto, por lo que se genera un sistema en equilibrio que está constantemente reponiéndose. Estudiar el suelo significa estudiar las tres fases que lo componen, incluyendo la fracción biológica.

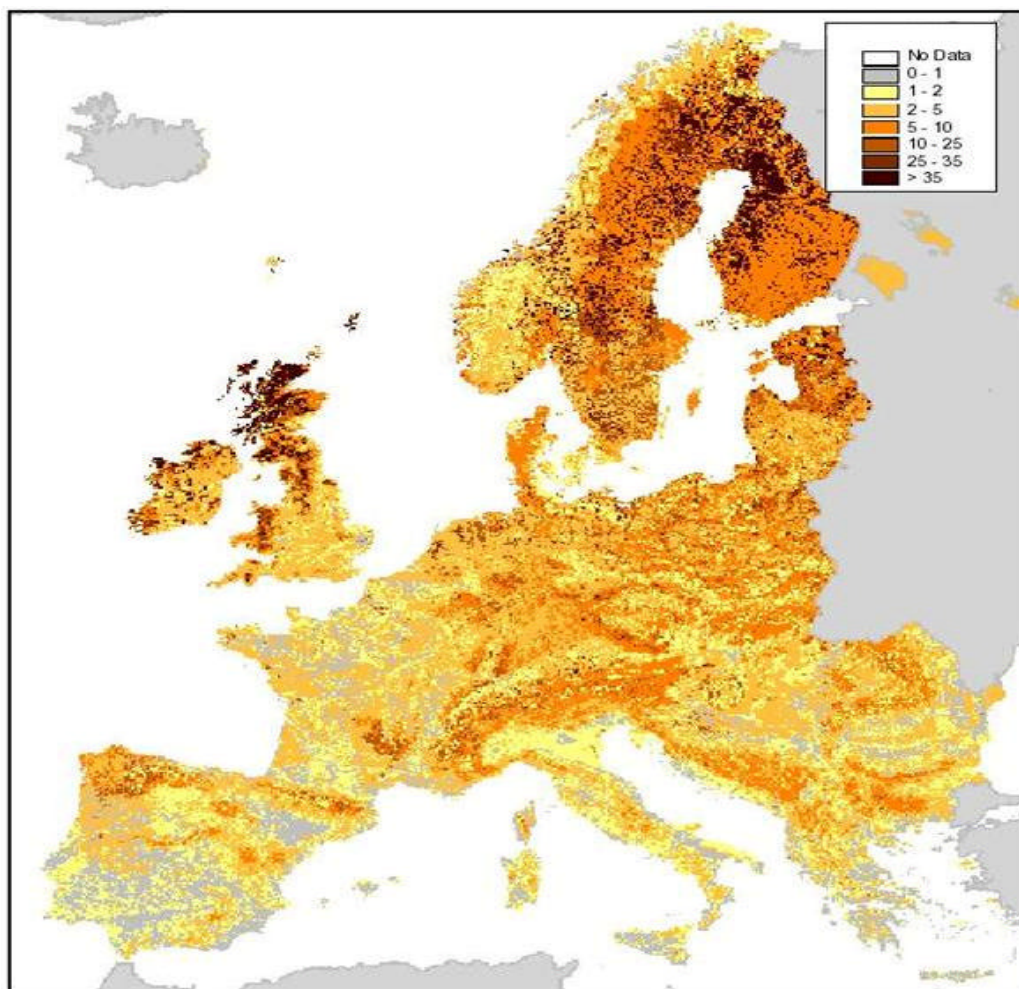
La valorización del suelo producida en los últimos años se debe principalmente a que nos empezamos a dar cuenta que juega un papel muy importante en nuestras vidas. No solo es la mayor fuente de materias primas para las diversas industrias (agrícolas, madereras, metalúrgicas, constructoras, etc.), sino que además nos proporciona un ambiente saludable donde desarrollar actividades sociales (vivienda, jardines, deportes, turismo).

Durante siglos el ser humano ha utilizado el suelo para su subsistencia sin que esto produjera grandes alteraciones en el medioambiente. Las dificultades surgieron a comienzos del siglo pasado, cuando la evolución de la industria creciente comenzó a entrar en conflicto con las propias funciones naturales del suelo. El aumento de asentamientos humanos y de infraestructuras, principalmente para las industrias y el

transporte, el vertido de residuos, la extracción de minerales y la agricultura intensiva, entre otros, han ejercido y siguen ejerciendo una gran presión sobre el ciclo natural del suelo.

Se produce así lo que se ha denominado como degradación de suelos. Ésta se define como el proceso degenerativo que reduce la capacidad actual o futura de los suelos para seguir desempeñando sus funciones naturales o de uso (Jiménez y col., 2005)

Un problema añadido es el bajo nivel de materia orgánica que presenta gran parte de los suelos de Europa, muy acusado en la cuenca del Mediterráneo (Fig.1.). Este hecho no siempre es causa de la actividad humana, pero contribuye sensiblemente a disminuir la fertilidad del suelo.



**Figura 1.** Mapa de contenido de materia orgánica en Europa (%). Fuente: European Soil Bureau (2005).

## 1.2. Contaminación de suelos

Se entiende por suelo contaminado una porción delimitada de terreno (superficial o subterráneo), cuyas cualidades originales han sido modificadas por la acción humana al incorporarse algún factor (Seoánez, M., 1999), que según la clasificación de agentes contaminantes podría ser:

- I. Contaminación física: Con variaciones en parámetros como temperatura y radiactividad.
- II. Contaminación biológica: Al incluir putrefacción de especies o cepos patógenos.
- III. Contaminación química: Por la adición de elementos o compuestos en concentraciones que alteran la composición originaria del suelo.

La variedad y cantidad de productos contaminantes de un suelo es prácticamente inabarcable. Los grupos más característicos y peligrosos de contaminantes químicos son, por un lado de naturaleza inorgánica (metales pesados: Cu, Cd, Pb, contaminantes inorgánicos: As, B,  $\text{NO}_3^-$ ...) y moléculas orgánicas (hidrocarburos alifáticos, aromáticos, dioxinas, plaguicidas, etc.)

A partir de la presencia de un contaminante en el suelo se pueden desencadenar una serie de procesos de movilización del mismo, cuya acción efectiva dependerá de una parte de la composición y características físicas y químicas de la sustancia y por otra, de las características geoquímicas de ese suelo. De forma general, el suelo por sí mismo no es un vector importante de dispersión de contaminantes, pero en combinación con otros factores ambientales se revela como un foco emisor de contaminación de gran importancia en el medio. El agua, y en menor medida el aire, son los agentes dispersantes de la contaminación presente en un suelo.

Hay que tener en cuenta el papel depurador de ciertos componentes del suelo, como son los materiales coloidales, sólidos inorgánicos (arcillas, óxidos metálicos), materia orgánica (ácidos húmicos, humina) y los microorganismos (hongos y bacterias). La retención de los contaminantes en estos coloides se lleva a cabo por medio de fenómenos de adsorción física, interacción química o bien los transforman por medio de reacciones químicas. La degradación de suelos suele afectar a su estructura física, a su nivel de materia orgánica y a su vida bacteriana, por lo que su capacidad tampón frente a ciertos contaminantes puede verse significativamente mermada.

De forma general, la presencia de contaminantes en el suelo se refleja de forma directa sobre la vegetación, induciendo su degradación, la reducción del número de especies presentes en ese suelo, y más frecuentemente, la acumulación de contaminantes en las plantas, sin generar daños notables en éstas. En el hombre, los efectos directos se restringen a la ingestión y contacto dérmico, que en algunos casos ha desembocado en intoxicaciones por metales pesados y más fácilmente, por compuestos orgánicos volátiles o semivolátiles.

Indirectamente, a través de la cadena trófica, la incidencia de un suelo contaminado puede ser más relevante. Absorbidos y acumulados por la vegetación, los contaminantes del suelo pasan a la fauna en dosis muy superiores a las que podrían hacerlo por ingestión de tierra. Cuando estas sustancias son bioacumulables el riesgo se amplifica al incrementarse las concentraciones de contaminantes a medida que ascendemos en la cadena trófica (bioacumulación), en cuya cima se encuentra el hombre.

### **1.3. Legislación**

El suelo constituye uno de los medios receptores de la contaminación más sensibles y vulnerables. Ya en la Cumbre de Río, en 1992, se reconoció la importancia de la protección de los suelos y de sus usos potenciales en el contexto del desarrollo sostenible, en particular contra la contaminación procedente de acciones o actividades de origen antrópico.

La legislación europea y la española han carecido de instrumentos normativos para promover la protección de suelos. En España, hasta la promulgación de la Ley de Residuos (10/1998, de 21 de abril), no se disponía de ninguna norma legal que permitiera proteger eficazmente los suelos contra la contaminación y, en caso de los ya contaminados, identificarlos y caracterizarlos, utilizando una metodología normalizada y técnicamente rigurosa.

La Ley 10/1998, de Residuos, en sus artículos 27 y 28, regula los aspectos ambientales de los suelos contaminados, y dispone que el Gobierno, previa consulta a las comunidades autónomas, determinará los criterios estándares que permitan evaluar los riesgos que pueden afectar a la salud humana y al medio ambiente atendiendo a la naturaleza y a los usos del suelo.

Se establece una relación de actividades susceptibles de causar contaminación en el suelo, así como adoptar criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.

Al año siguiente, en 1999, la Agencia Europea de Medioambiente estimó entre 300.000 y 1.500.000 el número de emplazamientos contaminados en Europa Occidental. Durante los años 1995-2005, en el Plan Nacional de Recuperación de Suelos Contaminados se inventariaron 4532 suelos Españoles como potencialmente contaminados.

Y en el año 2005, en el Real Decreto 9/2005 de 14 de Enero se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo, los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. También se realiza un inventario de sustancias tóxicas y se resalta la necesidad de establecer el nivel genérico de referencia (NGR), la concentración de una sustancia contaminante en el suelo que no conlleva un riesgo superior al máximo aceptable para la salud humana o los ecosistemas.

Se entiende por suelo contaminado “aquel cuyas características han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes químicos de carácter peligroso de origen humano, en concentraciones tales que comporten un riesgo inaceptable para la salud humana o el medio ambiente, y así se haya declarado mediante resolución expresa”.

Las actividades potencialmente contaminantes del suelo son aquellas actividades de tipo industrial o comercial en las que, ya sea por el manejo de sustancias peligrosas ya sea por la generación de residuos, pueden contaminar el suelo.

Concretamente en la Comunidad de Madrid se ha elaborado el Plan Regional de Suelos Contaminados para los años 2006-2016, donde se pretende sentar las bases de las actuaciones en materia de suelos contaminados durante esos 10 años. En el contexto de este plan, encontramos la Orden 2770/2006, de 11 de agosto, de la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, por la que se procede al establecimiento de niveles genéricos de referencia de metales pesados y otros elementos traza en suelos contaminados de la Comunidad de Madrid (Tabla 1).

Estos valores se refieren a la protección de la salud humana, mientras que el valor VR90 se refiere a la protección del ecosistema, considerándose como la

concentración natural en el entorno, por encima de la cual se supone que podría causar daño al medioambiente

**Tabla 1.** Valores límite de metal en suelo, en función de su uso, establecidos por la Comunidad de Madrid 2006, para la protección de la salud humana. VR90 se refiere a los valores límite para la protección de la salud del ecosistema.

	Industrial	Urbano	Otros usos del	VR90
	(mg kg <sup>-1</sup> )	(mg kg <sup>-1</sup> )	Suelo (mg kg <sup>-1</sup> )	(mg kg <sup>-1</sup> )
Antimonio	80	8	0,8	0,48
Arsénico	40	24	24	24
Bario	100.000	15.200	4.200	138
Berilio	13	2	2	2,1
Cadmio	300	30	3	0,22
Cobalto	1.500	150	15	12
Cobre	8.000	800	80	20
Cromo total	2.300	230	90	32
Estaño	100.000	46.730	46.730	4,45
Manganeso	33.900	3.390	690	690
Mercurio	15	7	5	0,065
Molibdeno	1.500	150	15	0,7
Níquel	15.600	1.560	405	21
Plata	500	50	5	0,12
Selenio	3.900	390	85	0,24
Plomo	2.700	270	75	30
Talio	30	3	2	0,39
Vanadio	3.700	370	37	37
Zinc	100.000	11700	1170	73

Actualmente en la Comunidad de Madrid existen caracterizados 135 emplazamientos contaminados. De estas localizaciones, el 61 % se deben a zonas industriales donde no se gestiona adecuadamente las posibles fuentes de contaminación. El 20 % se deben a zonas de vertidos incontrolados y el 19 %, a vertederos e inmeditaciones.

## 2. CONTAMINACIÓN DE ORIGEN MINERO

Las actividades mineras provocan generalmente fuertes impactos ambientales, con destrucción de los suelos naturales y creación de nuevos suelos (Antrosoles), que presentan fuertes limitaciones físicas, químicas y biológicas y que dificultan la reinstalación de vegetación. Labores industriales como lavados ácidos, incorporación de



agentes extractantes de metales (como los quelatos), triturado de rocas, acumulación de residuos (escombreras), son los principales responsables de la degradación.

En la tabla 2 se muestra la evolución del número de emplazamientos mineros en España en los últimos años; se comprueba una tendencia a disminuir las explotaciones de productos energéticos y de minerales metálicos, no así en el caso de rocas y minerales de uso industrial. Observando estos datos se podría pensar que la contaminación por metales pesados en zonas mineras está disminuyendo. Pero este tipo de contaminación no sólo se observa en minas metálicas, sino también en gran parte de minerales de uso industrial. Así pues el número de emplazamientos peligrosos continúa aumentando. Además, el verdadero problema no estriba en el número actual de minas activas, sino en el número total de minas, en uso o no, ya que al abandonar una zona minera, la contaminación sigue presente.

**Tabla 2.** Evolución del número de emplazamientos mineros en España. Fuente: Instituto Geológico Minero de España (IGME).

Año	1996	1997	1998	1999	2000	2005	2006
Productos energéticos	127	122	95	84	84	69	65
Minerales metálicos	14	12	12	12	10	3	3
Rocas y minerales industriales	3.419	3.508	3.572	3.546	3.670	3.933	3.990

Nriagu y col. (1988) calcularon el valor medio de las emisiones mundiales de elementos traza al suelo en el año 1983. Sus estudios mostraron una visión preocupante. El Cd total vertido al suelo se estimó en 22.000 toneladas al año. Otros elementos menos tóxicos fueron aún mucho más abundantes: 796.000 t de Pb, 954.000 t de Cu y 1.372.000 t de Zn. Todos estos metales están destinados a contaminar las zonas cercanas a las explotaciones mineras, provocando situaciones adversas para el ecosistema.

En definitiva, la actividad minera libera al medio ambiente una serie de sustancias potencialmente tóxicas, pero que por lo general han de sufrir una serie de transformaciones físicas, químicas y biológicas para que puedan actuar sobre la biosfera. En este sentido podemos diferenciar dos conceptos básicos, la geodisponibilidad y la biodisponibilidad (Krauskopf y Bird, 1995).

La geodisponibilidad es la consecuencia directa de la actividad minera. Al llevar a cabo la explotación minera de un yacimiento, se ponen a disposición del medio

geológico unos elementos que antes no lo estaban, o b estaban de forma mucho más limitada. Cabe destacar no obstante, que muchos yacimientos minerales, particularmente los de menas sulfuradas, son en sí fuentes naturales de contaminación ambiental. Esto depende en gran medida de si son o no aflorantes, de su profundidad (en especial, si se localizan por encima o por debajo del nivel freático) o de su composición mineralógica.

La biodisponibilidad, por su parte, sería “el grado por el cual un contaminante en una fuente potencial, está disponible para ser tomado por un organismo vivo”. Por ejemplo, muchas plantas tienen la capacidad de absorber determinadas concentraciones de elementos pesados, siempre que se encuentren en el suelo en formas disponibles, o asociados a nutrientes básicos.

Así pues la peligrosidad de un contaminante viene determinada no sólo por su concentración total, sino por todos los procesos que intervienen en su especiación química y solubilidad (Porta y col., 1999).

a) Procesos de precipitación/disolución

Los compuestos que constituyen la contaminación pueden formar compuestos insolubles al ser depositados en el suelo. Por ejemplo, el cadmio soluble precipita en forma de  $\text{CdCO}_3$  en presencia de carbonatos en el suelo. En otros casos, la formación de los compuestos insolubles está controlada por las condiciones de oxidación-reducción del suelo, de forma que, por ejemplo, un metal pesado estable en forma de compuesto soluble en condiciones oxidantes puede pasar a formar compuestos insolubles en condiciones reductoras; el mismo caso se produce con el pH: muchos metales pesados son solubles a pH ácido, y forman compuestos insolubles en condiciones de pH alcalino. Naturalmente, el mismo caso puede darse a la inversa con otras especies mineralógicas.

b) Procesos de sorción/desorción

El proceso de sorción puede definirse como la interacción de una fase líquida con una sólida, y comprende tres mecanismos: adsorción, precipitación superficial y absorción.

- La adsorción consiste en la acumulación de una especie (adsorbato) sobre la superficie de una fase sólida (adsorbente). Es un proceso complejo, en el que se establecen fuerzas de asociación entre ambos

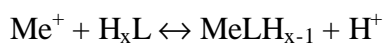
componentes de muy diverso tipo: enlaces (covalentes, iónicos, por fuerzas de van der Waals, por puentes de hidrógeno), intercambio de ligandos, energía de orientación dipolo-dipolo, efecto hidrofóbico).

- La precipitación superficial consiste en la formación de un precipitado cristalino sobre el sólido, que puede tener su misma u otra composición.
- La absorción implica la incorporación de la o las fases dentro del sólido, más allá de la superficie del absorbente, de forma más o menos uniforme.

En cuestión de metales pesados, la predominancia de estos procesos depende fundamentalmente de la carga estructural y del área superficial de los materiales del suelo. A mayor carga negativa, mayor facilidad de adsorción de los cationes metálicos. La mayoría de minerales de arcilla poseen deficiencias de carga positiva debido a fallos estructurales, por lo que suelen estar cargadas negativamente. Los óxidos de Fe y Mn también son minerales cargados que influyen de manera notoria en los procesos de adsorción/desorción. Debido a que los protones tienen carga positiva, en condiciones ácidas éstos minerales pueden quedar saturados de protones dificultando la adsorción de metales. A medida que aumenta el pH la adsorción de metales suele aumentar. La materia orgánica posee a su vez numerosos sitios de adsorción que se ionizan en determinados rangos de pH, por lo que también constituye una fracción muy importante dentro de la retención de cationes metálicos.

#### c) Procesos de complejación de metales

La formación de complejos de metales pesados es un factor que puede variar de forma considerable la solubilidad de éstos, que pueden darse tanto con moléculas orgánicas (naturales o sintéticas) como con inorgánicas. En lo que se refiere a la complejación orgánica, puede resumirse en la reacción:



Donde L indica un ligando orgánico.

La presencia de materia orgánica en el suelo permite el desarrollo de estos mecanismos, debido a que está formada mayormente por polímeros insolubles de compuestos alifáticos y aromáticos que contienen un gran número de grupos

funcionales reactivos (carboxilo, carbonilo, amino, fenol, alcohol, sulfhidrilo), susceptibles de enlazarse por diversos mecanismos con los metales pesados.

Para corregir los problemas de contaminación por metales pesados en zonas mineras existen diversos métodos: técnicas electrocinéticas (separación de metales por diferencia de potencial), enmiendas inorgánicas (como la adición de caliza u otras sustancias alcalinizadoras), retirada física de capas superficiales, técnicas de fitorremediación o incorporación de residuos orgánicos como enmiendas. En esta tesis nos centraremos en los dos últimos métodos por su bajo coste y su capacidad de actuar sobre los metales pesados y sobre el estado general del suelo.

### **3. FITORREMEDIACIÓN**

La fitorremediación de suelos contaminados se basa en el uso conjunto de plantas, enmiendas del suelo y técnicas agronómicas para eliminar, retener, o disminuir la toxicidad de los contaminantes del suelo (Chaney et al., 1997). Sin embargo comúnmente se entiende como el uso de plantas capaces de extraer o inmovilizar contaminantes, ya sean inorgánicos u orgánicos. Este tipo de tecnologías aporta numerosas ventajas, ya que no introduce agentes externos al medio y consigue, cuanto menos, una cobertura vegetal que induce una mejora en la “salud” del suelo. Además, no exige una tecnificación excesiva y aunque lento, es relativamente económico ya que se realiza *in situ*.

Dentro de la fitorremediación se distinguen diversas técnicas (Carpena y Bernal, 2007):

Fitoextracción: Se basa en el uso de plantas con gran capacidad para acumular contaminantes. Esta técnica debe ir acompañada de sucesivas cosechas y posterior tratamiento de la biomasa con los metales contenidos en ésta.

Fitoimmobilización: Esta técnica no pretende retirar el contaminante, solo disminuir su biodisponibilidad. En ella se usan plantas capaces de inmovilizar el contaminante en el suelo por diversos métodos, acumulación en raíces, precipitación en la rizosfera, exudados radiculares capaces de atenuar la toxicidad, etc.

Fitovolatilización: uso de plantas tanto para eliminar los contaminantes del medio mediante su volatilización, como para eliminar contaminantes del aire.

Fitodegradación: Técnica que usa plantas y microorganismos capaces de degradar determinados contaminantes orgánicos.

Rizofiltración: Parecida a la fitoextracción, pero utilizada para el tratamiento de aguas mediante el uso de plantas con una elevada tasa de absorción radicular.

Cuando las condiciones del medio son extremas, es necesario encontrar las especies adecuadas. Así, en medios fuertemente ácidos tenemos géneros resistentes como *Salix*, *Typha*, algunos pinos, eucaliptos y acacias (*Pinus pinaster*, *Pinus sylvestris*, *Acacia malanoxilum*, *Eucalyptus viminalis*) capaces de desarrollarse eficientemente.

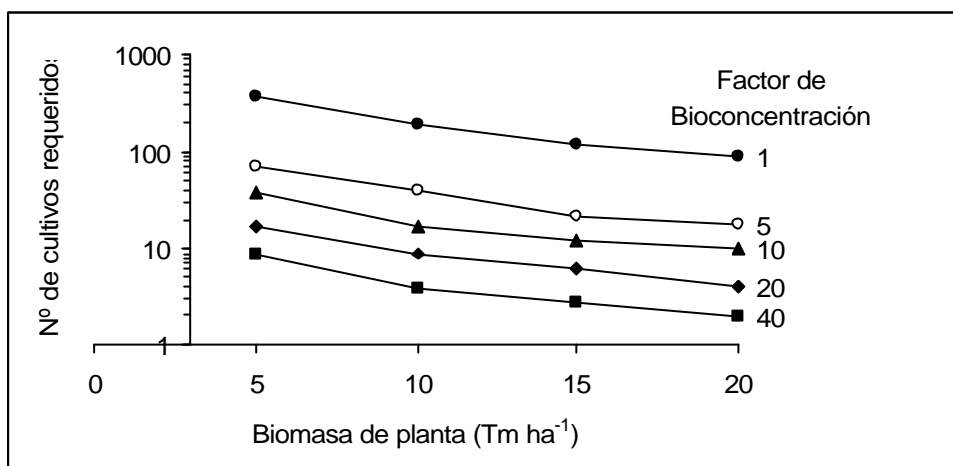
Las denominadas plantas de mina o metalofitas, crecen en suelos mineros acumulando grandes cantidades de metales pesados sin presentar síntomas de toxicidad, y por tanto, se podrían introducir en estos ambientes. Las más raras y escasas entre las tolerantes son las especies que acumulan metales en sus tejidos aéreos, incluso cuando la concentración del metal en suelo es muy baja. Son las especies hiperacumuladoras. Su concentración final en los tejidos aéreos depende del metal y de la especie, llegando a superar el 5% de su peso seco (Brooks, 1998).

Un factor limitante de las técnicas de fitorremediación es encontrar la especie adecuada al medio en cuestión. Generalmente esta especie ha de ser autóctona, ya que la incorporación de plantas foráneas puede dar lugar a otros problemas ecológicos. También han de ser plantas capaces de sobrevivir en ambientes adversos (poca materia orgánica, suelos desestructurados, contaminación continua, etc.). Pero la supervivencia ha de ir acompañada también de una generación de biomasa considerable para que la técnica sea realmente efectiva.

Otro factor importante es el papel que juega dicha especie en el ecosistema en cuestión. Si la planta es fuente de alimento de la fauna de la zona estaremos dispersando la contaminación hacia eslabones superiores de la cadena trófica. Por este motivo, están mejor valoradas las especies perennes que las anuales, ya que los contaminantes acumulados en las hojas sufren una menor dispersión.

En los últimos años se ha puesto en duda la efectividad de algunas técnicas fitoextractivas por la dificultad de encontrar plantas hiperacumuladoras nativas, que generen una gran biomasa en condiciones adversas, que sean perennes y que no sirvan de alimento para la fauna local.

Aún encontrando la especie adecuada, el tiempo requerido para la descontaminación de suelos puede ser elevado (McGrath, y Zhao, 2003). Estos autores construyeron unas curvas teóricas que orientaban sobre el número de cosechas necesarias para reducir a la mitad la concentración de metal en los primeros 20 centímetros de suelo (Fig. 2).



**Figura 2.** Relación entre la biomasa, factor de bioconcentración y número de cosechas necesarias para reducir la concentración de metal del suelo a la mitad (McGrath, y Zhao, 2003).

El factor de bioconcentración se refiere al cociente entre el contenido de metal en planta y el del suelo, siendo un claro indicador del potencial fitoextractor de la especie. La mayoría de las plantas tienen bajos valores, y solo las hiperacumuladoras consiguen subir de 5. Aún así, deben producir una gran biomasa si se pretende descontaminar el suelo en un tiempo razonable. Así, según McGrath y Zhao (2003), una planta con un factor de bioconcentración de 5 y una producción de 20 t ha<sup>-1</sup> de biomasa por cosecha, requeriría aproximadamente 25 cosechas para disminuir el nivel de contaminación del suelo a la mitad. Si nos fijamos en plantas más comunes, con un factor de bioconcentración de 1 y 10 t ha<sup>-1</sup> de biomasa por cosecha, harían falta cerca de 200 cosechas para conseguir el mismo efecto.

#### 4. ADICIÓN DE RESIDUOS ORGÁNICOS EN SUELOS CONTAMINADOS

El interés por reutilizar diversos residuos orgánicos junto con la necesidad de implementar técnicas de fitorremediación económicas y sostenibles, condujo al estudio de la aplicación de distintos materiales orgánicos en suelos contaminados, bien por metales pesados o por tóxicos orgánicos.

El uso de tales residuos está dirigido no sólo a paliar los problemas propios de la contaminación, sino también a establecer unas condiciones favorables para la revegetación. La incorporación de materia orgánica mejora la estructura del suelo disminuyendo la erosión, reteniendo más agua y minimizando los procesos de escorrentía. Además, incorporaría nutrientes a un ritmo lento que ayudarían a establecer una cubierta vegetal. Esta revegetación generaría a su vez más biomasa y poco a poco se iría recolonizando el área.

En cuanto al comportamiento de la materia orgánica frente a los metales pesados, se encuentran una gran diversidad de teorías. Existen tanto estudios que afirman que determinados residuos orgánicos compostados son capaces de retener metales, como otros, en los que los solubilizan. No sólo depende del tipo de residuo en particular, sino también de cómo se haya obtenido.

Los metales pesados suelen tener afinidad por determinados grupos reactivos de la materia orgánica; sin embargo, esta afinidad está muy influenciada por la abundancia de dichos grupos y por otros factores como el pH del medio. Cuando el pH es elevado, la retención suele ser más efectiva. Sin embargo, cuando la enmienda orgánica es ácida pueden ocurrir procesos de lixiviación de metales (Karaca, 2004), o por lo menos, la retención es menor.

El tipo de suelo y el metal en cuestión también parecen ser factores decisivos. Lógicamente, la incorporación de una enmienda orgánica al suelo tenderá a variar su pH y por tanto, también los procesos de adsorción propios del suelo. Además, la especiación química de cada metal es muy diferente. La variación de las condiciones de pH y potenciales redox modifican el estado iónico del metal en diferente forma, pudiendo hacerlo más o menos susceptible a la retención o a la precipitación.

Entre los residuos orgánicos utilizados con el fin planteado, los más ensayados han sido los lodos de depuradora, orujos de uva, gallinazas, cortezas de pino o restos de poda, todos ellos compostados, con resultados muy variados. El compost agotado del cultivo del champiñón (CAC), es el residuo orgánico seleccionado en el presente trabajo

por su abundancia y la relativa poca atención que ha recibido como enmienda recuperadora de suelos contaminados.

#### **4.1. Compost de cultivo de champiñón (CAC)**

El compost agotado del cultivo del champiñón (CAC) se define como el residuo sólido sobrante de los sustratos orgánicos utilizados para el crecimiento del champiñón. Así pues la generación de este residuo viene determinada por la producción y el consumo de setas y champiñones.

En los últimos años se ha producido un gran auge del cultivo de setas comestibles. Esta industria constituye una actividad productiva alternativa de bajo costo. La ventaja que tiene este cultivo es que utiliza desechos de las actividades productivas agropecuarias, generalmente de fácil obtención y de bajo precio, para la producción de un alimento sabroso, nutritivo y beneficioso para la salud.

Actualmente se estima que la producción mundial de champiñón está en torno a tres millones de toneladas al año. Si tenemos en cuenta que cada kilogramo de champiñón ha necesitado aproximadamente (dependiendo del modo de cultivo) cinco kilogramos de sustrato para su crecimiento, podemos estimar la producción mundial de CAC en 15 millones de toneladas al año. Además en los últimos años el consumo *per cápita* se incrementaba anualmente en un 3,8%, por lo que es muy probable que el cultivo de champiñón aún no haya alcanzado techo.

A nivel mundial, EEUU y China son los países que más hongos comestibles producen seguidos de Francia, Países Bajos, España, Inglaterra y ciertas zonas de Latino América. El cultivo de champiñón y setas en España se centra principalmente en las Comunidades de La Rioja y Castilla La Mancha. En estas zonas, desde el año 2001 hasta el 2008 casi se ha duplicado la producción, pasando de 115.000 a 198.000 toneladas anuales, lo que conlleva una generación creciente de residuos orgánicos.

##### **4.1.1 Producción y problemática del CAC**

El CAC es un material muy complejo que posee una gran variedad de sustancias derivadas de los materiales iniciales utilizados. De hecho, posee una elevada



concentración de cationes como  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ , y aniones como  $NO_3^-$ ,  $Cl^-$ , además de una importante fracción orgánica (en el capítulo IV se tratarán las características del CAC y sus componentes). El elevado volumen de CAC generado en diversas y localizadas zonas del mundo, hace que se estén acumulando cantidades difíciles de gestionar. Suelen apilarse en hileras al aire libre, lo que a menudo ocasiona problemas de lixiviación en temporada de lluvias. La concentración de sales en estas pilas es tal que el subsuelo de la zona queda negativamente afectado, incrementando considerablemente su salinidad.

En diversos ensayos realizados en vertederos de CAC, se ha encontrado que en un periodo de dos años, el suelo ha absorbido hasta el 80% de las sales lixiviadas por la acumulación de CAC. Además, se incrementa exageradamente su contenido en materia orgánica disuelta (DOM). Esto provoca una alteración significativa del suelo así como de las aguas subterráneas que propagan la contaminación a lo largo de toda la zona.

Como era de esperar, los lixiviados dependen del volumen de CAC y de la forma en que se acumula. En la tabla 3 se muestran los valores de distintas sustancias lixiviadas por una pila de CAC de 150 cm de altura (Guo y col., 2001).

**Tabla 3** Lixiviados producidos durante 2 años en pilas de CAC (Guo y col. 2001).

	Pila de CAC de 150 cm de altura	
	Cantidad total (*)	Concentración media (**)
Agua	80,0	--
DOC	43,4	5.425
DON	4,3	538
$Cl^-$	32,2	113
$NO_3^-$	2,4	21
$SO_4^{2-}$	23,9	93
$PO_4^{3-}$	0,20	1
$Na^+$	9,9	54
$K^+$	63,8	204
$Ca^{2+}$	7,9	25
$Mg^{2+}$	5,4	28
$NH_4^+$	4,0	36
TDN	10,7	1.338

*DOC, DON: Carbono y Nitrógeno orgánico disuelto; TDN. Nitrógeno total disuelto.*

*(\*) Unidades: para agua (cm) para el resto ( $Tm\ ha^{-1}$ )*

*(\*\*) Unidades: DON, DOC y TDN ( $mg\ L^{-1}$ ), para el resto ( $mmol\ L^{-1}$ ).*

Es obvio pues que la acumulación de CAC es un proceso con un riesgo elevado de contaminar el medio que le rodea.

#### 4.1.2. Aplicaciones potenciales del CAC

Sin embargo, las mismas cualidades que hacen al CAC peligroso para el ecosistema, podrían volverse provechosas si se trata adecuadamente. El CAC constituye una fuente valiosa de materia orgánica y de nutrientes que, en la actualidad, está siendo desaprovechada. La materia orgánica presente en este residuo orgánico puede ayudar a solucionar problemas de erosión y contaminación de suelos, además de suponer una enmienda orgánica rica en elementos fertilizantes (Levanon et al.1994).

Entre las posibles aplicaciones se encuentra la horticultura (como tierra de cobertura), agricultura (vid, cereales, arroz, hortalizas, agricultura ecológica) y en la remediación de suelos (fijación de metales pesados en suelos contaminados y acondicionamiento de los mismos para asumir una vegetación) (López-Cuadrado y col., 2006; Mohseni y col., 1998; Anon, 1997; Stark y col., 1994; Stark y Williams 1994; Shumna, 1998; Celikel y Buyukalaca 1999).

#### Agricultura

El desarrollo de fertilizantes químicos y el encarecimiento de las enmiendas con residuos orgánicos redujeron durante mucho tiempo el empleo de estos últimos, hasta que recientemente, conceptos como los de agricultura sostenible han aumentado de nuevo la demanda de los fertilizantes orgánicos. Los residuos orgánicos compostados constituyen la principal fuente de nutrientes en la agricultura ecológica. También en la agricultura convencional se han desarrollado numerosas experiencias con buenos resultados. En el estado de Pensylvania (EE.UU) la valorización del CAC es ya un hecho. La producción de CAC en el periodo del 1990-91 fue de 551.040. De esta cantidad, el 15% (82.656 t) se recicló para su utilización nuevamente en el cultivo del champiñón. Otro 20 % se utilizó como enmienda orgánica y abonado de cultivos. Un

25% se empleó como sustrato en horticultura y jardinería, previo compostaje, y el 20% restante se usó para recuperar terrenos pantanosos (Kenneth et al.,1995: Maher, 1994).

### Horticultura

El sustrato “artificial” de cultivo normalmente se emplea en horticultura para la producción de vegetales, plantas ornamentales y flores. El principal ingrediente de esta tierra es la turba, mezclada con suelo, materiales sintéticos y, a menudo, materia orgánica compostada. La decreciente disponibilidad de turba, ha propiciado la búsqueda de posibles sustitutos entre los que se encuentran los residuos orgánicos compostados que recientemente están adquiriendo importancia en este campo.

Una de estas alternativas, la constituye el CAC. Éste puede competir en el mercado con el resto de residuos reciclados, tales como el compost de R.S.U (residuos sólidos urbanos) o el proveniente de los lodos de depuradora. Así, el CAC posee una serie de ventajas sobre los anteriores que indudablemente lo hacen más atractivo (Levanon et al.1994):

- Contiene concentraciones inapreciables de metales pesados o compuestos orgánicos tóxicos.
- No posee organismos patógenos provenientes de plantas, animales o humanos.
- La producción de este residuo está muy concentrada lo que facilita su manejo y unos costes de transporte no muy elevados.

### Remediación de suelos contaminados

El CAC posee, en principio, un gran potencial en el tratamiento *in situ* de suelos contaminados y ofrece una atractiva tecnología para la descontaminación de terrenos en los que existan residuos tóxicos y peligrosos. La variedad y cantidad de moléculas orgánicas que posee ofrece un amplio abanico de procesos de retención y degradación de compuestos tóxicos orgánicos e inorgánicos.

El CAC ha probado ser, quizás, el mejor agente para el tratamiento pasivo de las aguas de las industrias mineras del carbón que emplean el sistema de lagunaje. Parece ser superior en resultados a los sistemas que usan turba Sphagnum, virutas de madera o mezcla paja-estiércol. Bajo condiciones de oxidación, el CAC posee una capacidad muy elevada de retención de metales como Fe y Mn. En cambio, bajo condiciones

reductoras, el CAC puede mantener la capacidad retentiva de Fe, elevar el pH y reducir la acidez (Stark y col.,1994).

Chen y col. (2005) comprobaron la gran capacidad de CAC para retener metales pesados, utilizándolo como filtro para purificar aguas contaminadas. En estas condiciones encontraron que un gramo de CAC podía retener hasta 833 mg de Cd, 1000 mg de Pb y 44 mg de Cr. Determinaron que a mayor pH, mayor es la retención de los metales, y propusieron a los grupos carboxilos, fenólicos y fosforilos como los principales responsables del proceso.

No obstante, son relativamente escasos los estudios que investigan la capacidad estabilizadora de metales pesados de este sustrato. Sería conveniente conocer los mecanismos de retención para poder diseñar un CAC más eficiente, o por lo menos, poder aplicarlo en las condiciones más adecuadas.

El desarrollo del potencial de retención de metales pesados del CAC, junto con el estudio del beneficio medioambiental (provisión de nutrientes para las plantas, neutralización de la acidez de los suelos, mejora de la capacidad de retención de agua y de aireación del suelo), debería servir para que la industria del champiñón y la seta valorasen el CAC como una fuente adicional de beneficio (Buswell, J.A.1994).

### **III. OBJETIVOS GENERALES**

### **III. OBJETIVOS**

La gestión de la elevada producción de residuos orgánicos derivados del cultivo de champiñón (CAC) está siendo cada vez más complicada debido al alto volumen generado anualmente. Concretamente, su acumulación ha resultado perjudicial para el ecosistema ya que es capaz de contaminar suelos y aguas colindantes. Por ello es necesario estudiar en profundidad las características del CAC con el objetivo de orientarlo hacia nuevas aplicaciones.

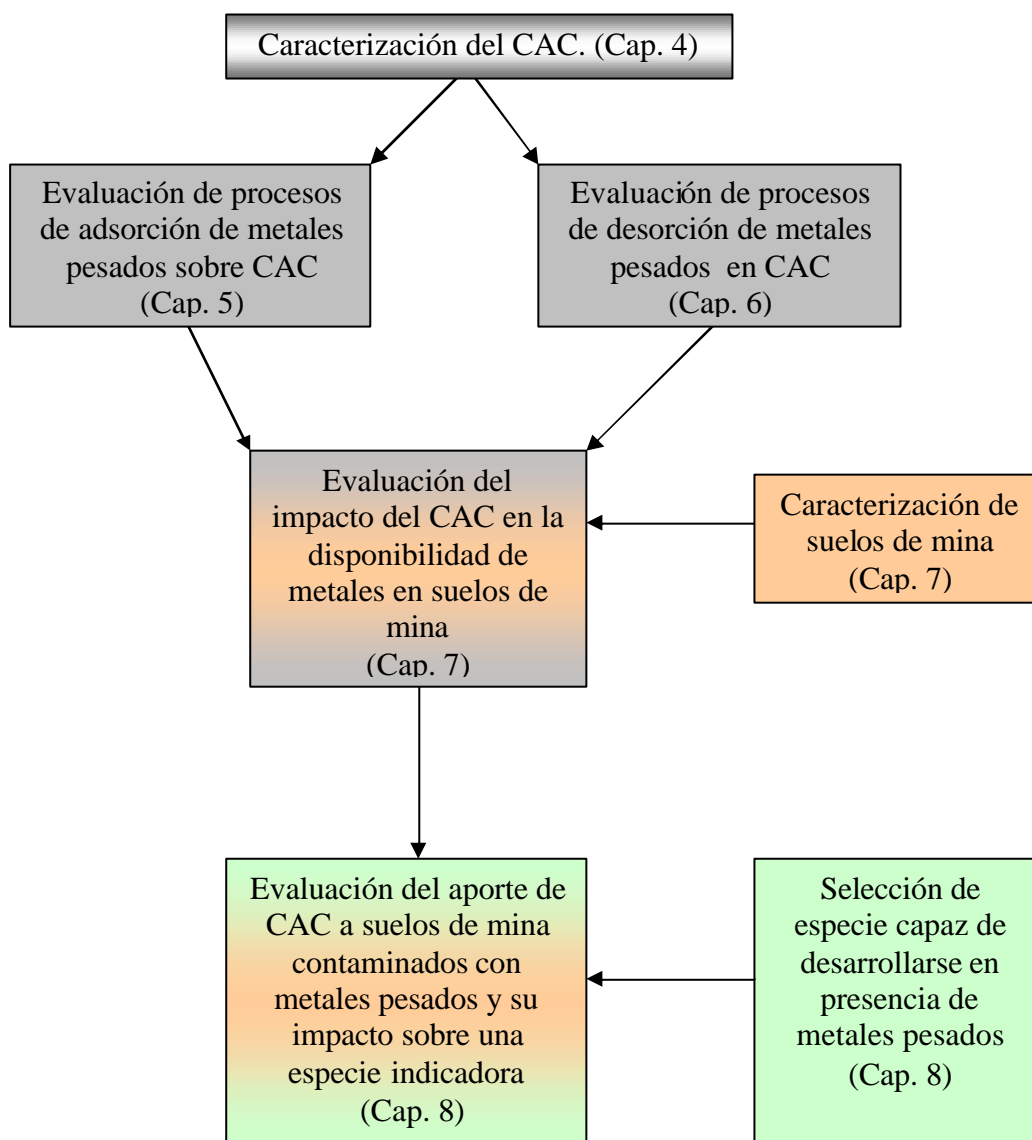
En este trabajo se pretende pues, valorar el potencial del CAC como enmienda orgánica fitoestabilizadora de metales pesados en suelos de mina. Este objetivo se engloba dentro de una estrategia de recuperación de suelos en donde la extracción del contaminante no es tan importante como conseguir regenerar un ecosistema fuertemente dañado.

Los objetivos específicos marcados en el presente trabajo son:

1. Caracterizar las propiedades fisico-químicas del CAC, y la de sus componentes primarios.
2. Comprobar el comportamiento de CAC frente a metales pesados, tanto su capacidad de retenerlos, como las condiciones en las que éstos pueden ser liberados.
3. Evaluar el impacto de la aplicación de CAC en suelos ácidos de mina, poniendo especial interés en la biodisponibilidad de los metales.
4. Seleccionar una especie vegetal, capaz de desarrollarse eficientemente en presencia de metales pesados en el medio de cultivo, para utilizarla como indicadora de la biodisponibilidad de éstos.

5. Analizar el comportamiento de la especie *Atriplex halimus* cultivada en suelos ácidos de mina al enmendar éstos con CAC.

El esquema de la Figura 3, representa la secuencia de trabajo propuesta para conseguir los objetivos mencionados.



**Figura 3.** Esquema del trabajo desarrollado

Esta memoria se compone en su parte inicial, de una caracterización del material CAC. Posteriormente, se estudiarán en condiciones de laboratorio, los procesos de adsorción y desorción de metales pesados en CAC. En el siguiente paso, se

comprobarán los efectos de diferentes dosis de CAC sobre la disponibilidad de metales pesados en suelos de mina. Y por último se realizará un ensayo de invernadero donde se evaluarán los efectos del CAC, en varias dosis de enmienda, sobre dos suelos de mina, y sobre la especie indicadora cultivada en ellos (especie seleccionada mediante ensayo de invernadero).



## **IV. CARACTERIZACIÓN DEL CAC Y SUS COMPONENTES**

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	25
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
3.1 Elaboración de CAC y muestreo .....	29
3.2. Propiedades fisicoquímicas del CAC. ....	33
3.2.1. Humedad.....	33
3.2.2. Densidad aparente seca.....	33
3.2.3. Densidad real (densidad de partículas).....	33
3.2.4. Porosidad total.....	34
3.2.5. pH, CE, Cl y NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	34
3.2.6. Ca, Mg, Na, K y P.....	35
3.2.7. Nitrógeno total.....	35
3.2.8. Materia orgánica .....	36
3.2.9. Carbono orgánico total .....	36
3.2.10. Capacidad de intercambio catiónico efectiva (CIC <sub>E</sub> ).....	36
3.2.11. Extracto húmico total.....	37
3.3. Análisis espectroscópico.....	38
3.3.1. Espectro de infrarrojos.....	38
3.3.2. Resonancia magnética nuclear <sup>13</sup> C de CAC, componentes primarios y CAC en distintos grados de compostaje .....	38
3.4. Análisis de metales pesados en CAC.....	39
3.4.1. Concentración de metales .....	39
3.4.2. Fraccionamiento secuencial de metales pesados, por el método de Tessier	39
3.5. Análisis estadístico y generación de gráficos. ....	40
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.</b> .....	41
4.1. Propiedades físicas.....	41
4.2. Análisis químico .....	41
4.3. Caracterización de CAC mediante espectroscopía de infrarrojo .....	42

4.4. Caracterización de CAC mediante resonancia magnética nuclear (CP/MAS- $^{13}\text{C}$ RMN).....	45
4.5 Caracterización de los materiales utilizados en la elaboración del CAC mediante RMN $^{13}\text{C}$ .....	47
4.6. Caracterización del CAC en sus diferentes estados de fermentación mediante RMN $^{13}\text{C}$ .....	51
4.7. Contenido en metales en CAC .....	55
4.8. Distribución de metales en CAC .....	56
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>58</b>

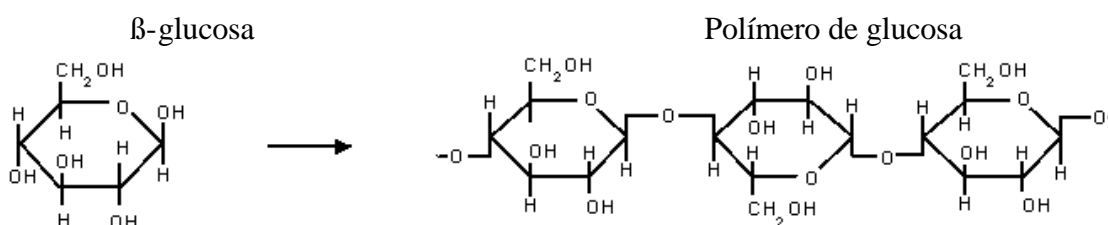
## IV. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL CAC

### 1. INTRODUCCIÓN

Existen muchas técnicas de cultivo de setas comestibles que generalmente se diferencian en los materiales primarios utilizados en la preparación de las balas de cultivo. Los factores más importantes a la hora de escoger la técnica son el tipo de hongo y los materiales primarios de que se disponga. Se trata de un cultivo económico que aprovecha residuos de otras industrias agropecuarias, por lo que cada cultivador se adapta a los materiales que más fácilmente puede obtener. Generalmente estos residuos se compostan y se adecuan para formar un medio de cultivo idóneo para los diversos tipos de setas y champiñones.

Los materiales primarios utilizados para elaborar el compost son muy diversos, algunos de los más utilizados son la paja de trigo y el estiércol de caballo, sin embargo, su disponibilidad es limitada por lo que a veces se usan materiales como orujo de uva, gallinaza o restos orgánicos semejantes.

En el cultivo de champiñón (*Agáricus bisporus*) la paja de trigo o de arroz es el componente mayoritario y está formada fundamentalmente por celulosa y derivados.



**Figura 4.** Esquema de la formación de celulosa a partir de  $\beta$ -glucosa.

La celulosa es una larga cadena polimérica de peso molecular variable, con fórmula empírica  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , con un valor mínimo de  $n = 200$  (Figura 4). Tiene una estructura lineal o fibrosa, en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa, haciéndolas impenetrables al agua, lo que hace que sea insoluble en agua, y originando fibras compactas que constituyen un papel principal en la pared celular de las células vegetales.

La paja es la principal fuente de lignina y carbohidratos (celulosa, hemicelulosa) y determina la textura de la bala de cultivo de champiñón, permitiendo una buena aireación, necesaria para el correcto desarrollo del cultivo. También determina la capacidad de retención del agua. El estiércol provee el nitrógeno y algo de carbohidratos. Se prefiere el estiércol de pollo (pollinaza) al de gallina (gallinaza) debido a que el primero tiene menos humedad y puede repartirse mejor por todo el material (Vedder y Galindo, 1979).

El yeso es otro de los componentes frecuentes de las balas de cultivo de champiñón. Su función es mejorar la estructura del compost al reducir el contenido graso de la paja, gallinaza, o estiércoles, mediante procesos de floculación (Vedder y Galindo 1979). El efecto positivo de esto es un incremento de la capacidad de aireación en la pila del compost. La exclusión del aire resulta en un ambiente reductor que produce situaciones adversas para el cultivo. Al mismo tiempo, el yeso también tiende a ajustar el pH del medio evitando que suba demasiado.

La urea normalmente se agrega a la pila del compost para estimular la actividad microbiana. Es la fuente inicial de nitrógeno para alimentar la población de microorganismos en la mezcla a compostar.

Durante este proceso de compostaje previo al cultivo, se libera calor debido a la oxidación de los carbohidratos que se descomponen rápidamente gracias a la microflora mesófila. A partir de los 40 °C ésta es reemplazada por microflora termofílica capaz de trabajar a temperaturas más altas. Al llegar a los 75 °C el desarrollo de nuevas poblaciones de microorganismos es escaso, y empieza pues un proceso de enfriamiento y maduración. Al final, la concentración de nitrógeno se ha incrementado y se forman complejos de lignoproteínas con la lignina presente. Los carbohidratos de fácil descomposición como la celulosa y la hemicelulosa desaparecen parcialmente. Al mismo tiempo, se observa un oscurecimiento del material debido a un proceso de

humificación. Se liberan algunas sustancias inhibitorias de muchos tipos de microorganismos. El resultado final es un compost cercano a la esterilidad con buenas propiedades fisicoquímicas donde el micelio del champiñón puede ser sembrado y desarrollarse sin competencia (Vedder y Galindo, 1979)

Con cada cosecha de champiñón la estructura física del sustrato de cultivo va apelmazándose, los nutrientes son cada vez más escasos y aumenta la aparición de organismos patógenos. Por ello no se suelen realizar más de tres cosechas sobre el mismo sustrato. Una vez acabado el cultivo, los restos orgánicos se compostan de nuevo formando el CAC, compost agotado de champiñón.

Generalmente es un material con tendencia a la basicidad, con cierto contenido en elementos nutrientes, sobretodo K y P y con una relación C/N ligeramente superior a la mostrada por otros sustratos orgánicos (Tabla 4.).

**Tabla 4.** Análisis químico de interés nutricional de 63 CAC de diversas zonas geográficas. Jordan y col (2008).

	Mínimo	Máximo	Media	SD
pH	6,0	7,9	6,8	0,48
CE *	6,8	15	10	1,8
P disponible **	1,3	25	4,0	3,8
K disponible **	8,0	21	13	2,9
Ca disponible **	0,1	10,1	2,8	4,9
N total**	17	28	21	2,0
C/N	14	24	18	2,0

*pH: extracto 1:5 agua:sustrato*

*Unidades: \*  $dS m^{-1}$  extracto 1:5 agua:sustrato.*

*\*\*  $g kg^{-1}$  disolución extractora de Morgan (Byrne, 1979).*

El principal problema del CAC se encuentra en la salinidad, la cual suele ser muy elevada. Por tanto si se va a utilizar como único sustrato sería conveniente aplicar lavados. De otro modo se hace necesaria la mezcla con otros sustratos o suelos. De hecho uno de los principales efectos de la acumulación de CAC en pilas al aire libre es el aumento de la salinidad del subsuelo debido al continuo lavado de sales (Guo et al., 2001).

La concentración en metales pesados en el CAC no suele ser elevada, destacando el Mn y el Zn como los más abundantes. Generalmente se puede clasificar

dentro del tipo A según el Real Decreto 824/2005 de enmiendas orgánicas (Tabla 5), aunque en ocasiones el Cd supera los niveles permitidos (Jordan y col., 2008).

**Tabla 5.** Límite de concentración de metales en enmiendas orgánicas RD/824/2005 ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).

	Clase A	Clase B	Clase C
Cd	0,7	2,0	3,0
Pb	45	150	200
Ni	25	90	100
Cu	70	300	400
Zn	200	500	1000
Cr	70	250	300

## 2. OBJETIVOS

En este capítulo se pretende realizar una caracterización detallada del CAC. Dado que es un sustrato principalmente orgánico se pondrá especial interés en la fracción orgánica y los diferentes grupos reactivos presentes.

Se hará también un análisis de los componentes originales que constituyen el CAC y un estudio sobre la distribución de los posibles metales que puedan contener.

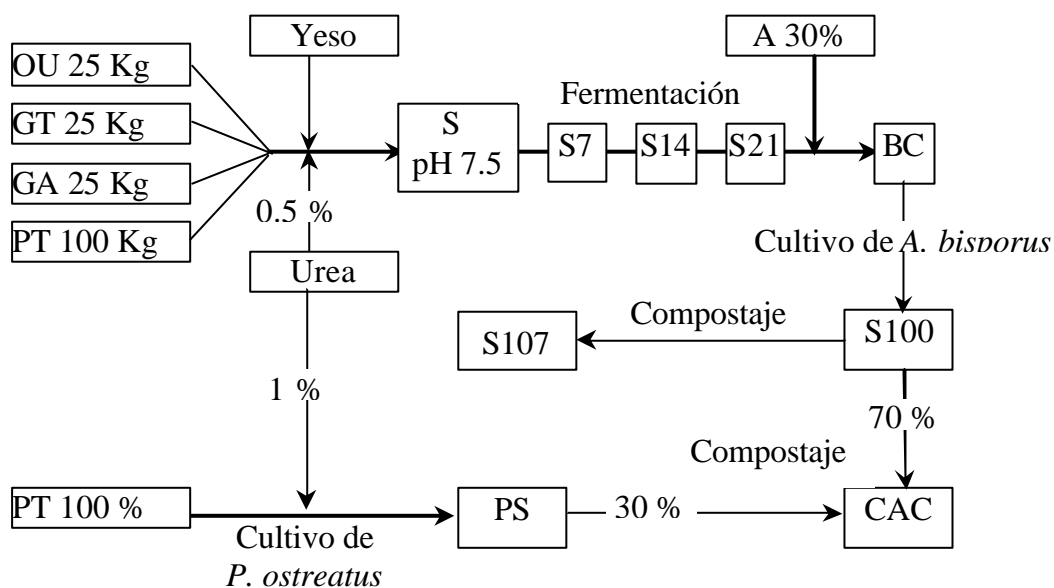
Esta caracterización está dirigida hacia una mayor comprensión de los procesos involucrados en la interacción del CAC con los metales pesados, que se estudiarán en los capítulos sucesivos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Elaboración de CAC y muestreo

El CAC estudiado en este trabajo se recolectó en una fábrica de elaboración de sustratos en la provincia de Cuenca (España). Su elaboración pasa por varias etapas y en el proceso intervienen diferentes empresas así como numerosos cultivadores de champiñón (*Agáricus bisporus*) de la zona.

En la figura 5 se muestra un esquema del proceso de fabricación del CAC a partir de sus componentes iniciales. Este esquema es importante para poder identificar los componentes originales del CAC



**Figura 5.** Esquema de producción de CAC.

Donde las abreviaturas significan lo siguiente:

OU: Orujo de uva.

GT: Gallinaza de trigo. Compuesto por estiércol de gallina y restos de paja de trigo.



GA: Gallinaza de Arroz. Compuesto por estiércol de gallina y restos de cáscara de arroz.

PT: Paja de trigo.

PS: Sustrato procedente del cultivo de setas (*Pleurotus ostreatus*).

A: Arena caliza de cobertera.

S: Sustrato mezcla de componentes iniciales.

S7: Sustrato compostado durante 7 días.

S14: Sustrato compostado durante 14 días.

S21: Sustrato compostado durante 21 días.

BC: Balas preparado para cultivo de Champiñón (*A.bisporus*).

S100: Sustrato después del cultivo de champiñón, aproximadamente equivale a S + 100 días.

CAC. Mezcla compostada durante 7 días de PS y S100.

En primer lugar, en una fábrica de sustrato de cultivo de champiñón se mezclan los diferentes componentes iniciales; OU, PT, GA y GT, en las proporciones indicadas en la figura 5. A esta mezcla se le añade yeso (Y) y urea para ajustar el pH (7,0-7,5) y el nivel de N (1,3-1,8 %) necesario para una correcta fermentación (Vedder y Galindo, 1979).



**Figura 6.** Proceso de compostaje al aire libre de la mezcla de los componentes iniciales.

Se tomó muestra de los componentes iniciales y del sustrato en diferentes estados de fermentación (S7, S14 y S21). Durante los primeros 14 días el compostaje se realiza al aire libre (Figura 6), los siete días siguientes se realiza en túneles de compostaje con aireación forzada (Figura 7).

Una vez que el material sale del proceso de fermentación forzada se le añade arena caliza (A) para adecuar el sustrato a las necesidades del cultivo de champiñón. Esta arena sirve para dar consistencia y mayor retención de agua en las balas destinadas al cultivo (BC).

Estas balas se venden a los diferentes cultivadores, los cuales después de finalizar la cosecha devuelven las balas agotadas (S100) a una empresa colaboradora que comercializa sustratos a base de residuos orgánicos compostados.



**Figura 7.** Túnel de aireación forzada para compostaje de materia orgánica.

Por otro lado se gestionan las balas de paja procedentes del cultivo de otro tipo de setas (*P. ostreatus*). La materia prima de este sustrato es exclusivamente paja de trigo, sin ningún otro tipo de residuo orgánico, por lo que a este residuo se le denominó paja del residuo de cultivo de setas (PS). Para fabricar el CAC final se mezclan las balas de residuo de cultivo de champiñón (S100) con la paja del cultivo de setas (PS), y se compostan conjuntamente durante 7 días al aire libre.



**Figura 8.** Aspecto del sustrato después del cultivo de champiñón (S100). Detalle de los restos de micelio presentes en el sustrato

No obstante, para nuestro trabajo se muestreó también el S100 compostado aisladamente, sin mezcla con PS, durante 7 días. A este material se le denominó S107 por haber pasado aproximadamente 107 días desde que se mezclaron los componentes iniciales. Aunque este material no se utilizaba en la fabricación de CAC, se decidió muestrearlo para comprobar la influencia de material PS en el CAC.



**Figura 9.** Proceso de volteo de CAC una vez finalizada la última fermentación.

## 3.2. Propiedades fisicoquímicas del CAC.

A continuación se recogen los métodos utilizados en la caracterización.

### 3.2.1. Humedad

Para determinar la humedad del CAC, se pesó una porción de la muestra y se llevó a una estufa (Memmert 800) a  $75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante. El proceso se hizo por triplicado. El % de humedad se determinó mediante la fórmula:

$$\% \text{ humedad} = \frac{m_w - m_D}{m_w - m_t} \cdot 100$$

Donde,

$m_w$ : masa en gramos de la muestra húmeda y la bandeja.

$m_D$ : masa en gramos de la muestra seca y la bandeja.

$m_t$ : masa en gramos de la bandeja vacía seca.

### 3.2.2. Densidad aparente seca

La densidad aparente seca se define como la masa seca del material por unidad de volumen aparente del sustrato húmedo, incluyendo el espacio poroso entre las partículas (Benito, 2002). Su expresión matemática es la siguiente:

$$Da = \frac{m_2 - m_1}{V} \cdot 100$$

Donde:

$D_a$ : densidad aparente seca ( $\text{kg m}^{-3}$ ).

$V$ : volumen del anillo de muestra ( $\text{m}^3$ ).

$m_1$ : masa del cilindro del anillo de muestra (kg).

$m_2$ : masa de la muestra seca y la del anillo (kg).

### 3.2.3. Densidad real (densidad de partículas)

La densidad real o de partículas se define como la relación entre la masa de las partículas y el volumen que estas ocupan (Benito, 2002).

La densidad real se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Dr = \frac{1}{\frac{W_{mo}}{100 \cdot 1.550} + \frac{W_{ce}}{100 \cdot 2.650}}$$

Donde:

Dr: densidad real (kg m<sup>-3</sup>).

W<sub>mo</sub>: contenido de materia orgánica (%).

W<sub>ce</sub> : contenido de ceniza (%).

1.550: densidad de la materia orgánica (kg m<sup>-3</sup>).

2.650: densidad de las cenizas (kg m<sup>-3</sup>).

#### 3.2.4. Porosidad total

Para determinar la porosidad del CAC se sometió al material a una presión hidrostática de 10 cm de columna de agua, según el procedimiento descrito por Tapia (2007). Se utilizó la fórmula:

$$\%PT = \left(1 - \frac{Da}{Dr}\right) \cdot 100$$

Donde:

PT: Porosidad total (%).

Da = Densidad aparente seca (kg m<sup>-3</sup>).

Dr = Densidad real o densidad de partículas (kg m<sup>-3</sup>).

#### 3.2.5. pH, CE, Cl<sup>-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

El pH y la conductividad eléctrica se determinaron en un extracto realizado en proporción 1:5 sustrato:agua (v/v), según las normas UNE-EN 13037, (1999), UNE-EN, 13038, (2001) y UNE-EN 13652, (2002). El proceso se realizó por triplicado. Se utilizó un ionómetro Orion 720A para medir el pH y un conductímetro Crison 2200 para medir la conductividad eléctrica. El contenido de Cl<sup>-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se midió con el mismo ionómetro mediante electrodos selectivos de iones.



### 3.2.6. Ca, Mg, Na, K y P

El contenido de Ca, Mg, Na, K y P del CAC se extrajo mediante la disolución extractora de Morgan, la cual permite determinarlos en el mismo extracto. Además al ser más agresiva que el extracto acuoso 1:5, consigue extraer una cantidad mayor de elementos, asemejándose más al contenido disponible de éstos.

A 15 mL de sustrato seco se le añadieron 30 mL de disolución de Morgan ( $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  1 M, DTPA 0,00013 M, ajustada a pH 4,8). Se agitó durante 30 minutos y se filtró con filtro Whatman nº 41 (Jones y Wolf, 1984).

La medida de Ca, Mg, Na y K se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer Analyst 800).

### 3.2.7. Nitrógeno total

El nitrógeno total, se determinó siguiendo la norma UNE-EN 13654 (2002). Se realizaron 3 repeticiones por muestra. Para la digestión de la muestra se colocó 0,2 g de la muestra seca y molida en un matraz de digestión y se añadió 4 mL de ácido salicílico/sulfúrico (25 g de ácido salicílico disueltos en 1 L de ácido sulfúrico concentrado). Se agitó y se dejó la mezcla reposar toda la noche. Posteriormente se añadió 0,5 g de tiosulfato sódico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ). Se calentó la mezcla en el bloque digestor (Block Digest 12, Selecta) hasta que cesó la formación de espuma. Se enfrió el matraz y se añadió 1,1 g de mezcla catalizadora (200g de sulfato potásico + 6 g de sulfato de cobre (II) pentahidrato) finamente molido y se calentó la mezcla durante 5 horas sin que la temperatura excediera los 400 °C.

La cuantificación se realizó mediante la medida del ión  $\text{NH}_4^+$  por colorimetría. En un tubo de ensayo se añadieron 2 mL de muestra digerida, 2,5 mL de tampón (50 g de tartrato sódico potásico tetrahidratado, 14 g de fosfato disódico y 24 g de hidróxido sódico, se disuelven en agua y se enrasan a 1 L), 4 mL de salicilato sódico (150 g de salicilato sódico y 0,30 g de nitroprusiato sódico en 1 L) y, por último, 2,5 mL de hipoclorito sódico al 5,25%. Se taparon los tubos y se agitaron, colocándose a continuación en baño con agitación a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se

agitaron de nuevo y se leyó la absorbancia a 660 nm en un colorímetro (Shimadzu UV 160A).

### 3.2.8. Materia orgánica

La materia orgánica y cenizas se determinaron por combustión según el procedimiento UNE-EN 13039, (2001), con 3 repeticiones por muestra. La muestra se calcinó en un horno mufla a 450 °C hasta peso constante. El porcentaje de materia orgánica (MO) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\%MO = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \cdot 100$$

$m_0$ : peso (g) de la cápsula.

$m_1$ : peso (g) de la cápsula y la muestra tras secar.

$m_2$ : peso (g) de la cápsula y la muestra tras su combustión.

### 3.2.9. Carbono orgánico total

El contenido de carbono orgánico total (COT) se calculó dividiendo el contenido de materia orgánica total por 1,72 (Benito, 2002), debido a que se considera que la materia orgánica tiene un 58% de carbono.

### 3.2.10. Capacidad de intercambio catiónico efectiva (CIC<sub>E</sub>)

La capacidad de intercambio catiónico efectiva se realizó por triplicado según el método descrito por Ansorena (1994). Para ello, se pesaron 2,5 g de muestra, secada al aire y tamizada a 2 mm, y se puso en tubos de centrifuga de polietileno de 50 mL ( $W_1$ ). Se añadieron 30 mL de disolución de cloruro bórico 0,1 M. Se agitaron los tubos por volteo (Heidolph Reax2) durante 1 hora. Luego se centrifugó a 2.300 rpm durante 10 minutos (Sorval® RC-5C) desechando el sobrenadante. Esta operación se repitió 3 veces. Luego al material sólido se añadió 30 mL de cloruro bórico 0,025M y se dejó agitando en agitador de volteo durante 24 h. Posteriormente se centrifugó a 2.300 rpm durante 10 min decantando el sobrenadante. Se pesó el tubo con la muestra ( $W_2$ ). Se añadió 3 mL de solución de sulfato de magnesio 0,02M, se agitó durante 2 h y se centrifugó a 2.300 rpm durante 10 minutos. Se decantó la disolución sobrenadante y se

filtró (papel Whatman 42). Se midió el exceso de Mg por espectrofotometría de absorción atómica (AAS, Perkin Elmer Analyst 800).

Se hizo una corrección por el efecto del volumen de líquido retenido por la muestra centrifugada, después de añadirle BaCl<sub>2</sub> 0,025M:

$$A_2 = \frac{A_1(30 + W_2 - W_1)}{30}$$

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) efectiva se calculó por:

$$\text{CIC (cmol}_k \text{ kg}^{-1}) = (B - A_2)1.200/w$$

Donde:

A<sub>1</sub>: concentración medida de magnesio (mM).

A<sub>2</sub>: concentración de magnesio en la muestra (mM).

B: concentración de magnesio en el blanco (mM).

W<sub>1</sub>: peso (g) de la muestra y el tubo de centrifuga.

W<sub>2</sub>: peso (g) de la muestra y el tubo centrifuga después de lavar.

w: peso(g) de la muestra.

### 3.2.11. Extracto húmico total

El extracto húmico total se determinó por triplicado siguiendo el protocolo descrito en los métodos oficiales de análisis (M.A.P.A, 1994). Para ello la muestra se secó a 50-60 °C durante 24 horas en estufa (Memmert 800). Se pesó 0,5 g de la muestra finamente molida con precisión de 0,1 mg, y fue introducida en un tubo de centrífuga de 200 mL. Se añadieron 100 mL de disolución extractante de pirofosfato recientemente preparada (44,5g de Na<sub>4</sub>P<sub>7</sub>O<sub>7</sub> · 10 H<sub>2</sub>O + 4 g de NaOH enrasado a 1 L). Se agitó 60 minutos en agitador de volteo (Heidolph Reax2) y se centrifugó a 4.500 rpm (Sorval® RC-5C) durante 25 minutos. Se repitió esta operación hasta que el líquido de extracción fue incoloro o ligeramente coloreado. Todos los sobrenadantes de las centrifugaciones se enrasaron en un matraz de un litro con agua destilada.

La valoración del carbono orgánico del extracto húmico se realizó tomando 50 mL del extracto obtenido anteriormente y calentando hasta sequedad en baño de agua. Se añadió 10 mL de disolución 1N de dicromato potásico y 20 mL de de ácido sulfúrico concentrado, con agitación suave durante 1 minuto. Se dejó reposar durante 30 minutos.



Luego se añadió 200 mL de agua destilada y 10 mL de ácido fosfórico concentrado dejándose enfriar. Se añadió 1 mL de difenilamina (0,5 g de + 20 mL de agua + 100 mL de ácido sulfúrico) y se valoró con sal de Mohr 0,5N, comparando con prueba en blanco.

El extracto húmico total (%) se calculó según:

$$\%C = \frac{(V - V_1) \cdot N \cdot f \cdot 0,39}{P}$$

$$\% \text{ extracto húmico total} = \%C \times 1,724$$

Donde:

V: volumen (mL) de sal de Mohr gastados en la prueba en blanco.

V<sub>1</sub>: volumen (mL) de sal de Mohr gastados en el problema.

N: Normalidad de la sal de Mohr.

f: factor de la sal de Mohr.

P: peso, en gramos, de la muestra en la alícuota.

0,39: factor que resulta de considerar que por este método sólo se oxida el 77 % del carbono existente en la muestra.

### **3.3. Análisis espectroscópico**

#### 3.3.1. Espectro de infrarrojos

Para conocer el tipo de moléculas orgánicas que componen el CAC, se realizó sobre éste, un análisis espectroscópico de Infrarrojo por Transformada de Fourier en el Servicio Interdepartamental de Investigación de la UAM (SIDI). Se utilizó un equipo FT-IR Broker IF S60V con detector MCT, abarcando un intervalo de longitudes de onda de 560-7.000 cm<sup>-1</sup>.

#### 3.3.2. Resonancia magnética nuclear <sup>13</sup>C de CAC, componentes primarios y CAC en distintos grados de compostaje

Se realizaron espectros de RMN <sup>13</sup>C del CAC, de sus componentes iniciales y de los diversos estados de fermentación. Los espectros se realizaron en un equipo Broker AV-400-WB en una sonda de triple canal de 4 mm a temperatura ambiente. La

velocidad de giro se estableció en 10 kHz. La secuencia de pulsos empleada fue polarización cruzada (CP-MAS)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ . El desplazamiento químico se estableció en ppm relativas a TMS (trimetilsililo) como referencia primaria. Este análisis fue realizado en los laboratorios del Servicio Interdepartamental de Investigación de la UAM (SIdI).

### **3.4. Análisis de metales pesados en CAC**

#### **3.4.1. Concentración de metales**

La determinación de metales pesados se realizó mediante la digestión en agua regia (UNE-EN 13650, 2002) con 3 repeticiones por muestra. Para ello se pesó 1 g de muestra seca y finamente molida con una precisión de 0,001 g y se puso en un matraz de reacción de 100 mL, se adicionó 1 mL de agua destilada y luego 21 mL de ácido clorhídrico concentrado, seguido por 7 mL de ácido nítrico concentrado. Se dejó 16 horas de reposo. Se añadieron unas bolas de vidrio (para evitar la generación de espumas) y se pusieron en placa calefactora de arena cubiertos con un embudo de vidrio. Se mantuvo hirviendo durante 2 horas. El digerido se enrasó en matraz aforado de 100 mL a la vez que se filtraba con papel de filtro (Whatman 42). Los metales pesados se determinaron en el digerido por espectrofotometría de absorción atómica (AAS, Perkin Elmer Analyst 800).

#### **3.4.2. Fraccionamiento secuencial de metales pesados, por el método de Tessier**

El fraccionamiento secuencial de metales en CAC se realizó según la metodología Tessier (Tessier y col., 1979; Walter y col., 2006). Esta metodología también se utilizó para evaluar la distribución de Cd en CAC contaminado artificialmente (capítulo VI).

Se empleó 1 g de muestra seca y molida (molino IKA, Labortechnik) pasada a través de un tamiz de 0,5 mm (3 repeticiones por muestra), tubos de centrífuga de 50 mL (Herolab) y tubos de teflón para la fracción residual. A cada gramo de muestra se adicionó:

- Fracción soluble (FI): 8 mL de  $\text{MgCl}_2$  1M, pH= 7,0, 20°C, agitación durante 30 minutos.

- Fracción ácido-soluble (FII): 8 mL de  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$  1 M, pH=5,0, 20 °C, agitación durante 5 h.
- Fracción reducible (FIII): 20 mL de  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  (cloruro de hidroxilamonio) 0,04M en  $\text{CH}_3\text{COOH}$  25 %, 6 h a 96 °C, en baño termostático de agua (Bunsen) con agitación esporádica.
- Fracción orgánica (FIV): 6 mL de  $\text{HNO}_3$  0,02M, 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, 2 h a 85 °C en baño de agua con agitación periódica (cada 15 min). Posteriormente se adicionó 6 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%, 3 h a 85 °C. En frío, se adicionó 10 mL de  $\text{CH}_3\text{COO NH}_4$  3,2 M en  $\text{HNO}_3$  20%, con agitación continua durante 30 minutos.
- Fracción residual (FV): 10 mL de HF 45%, 24 h a temperatura ambiente, con digestión en placa calefactora de arena (P-selecta) hasta sequedad. Posteriormente se adicionó 10 mL  $\text{HNO}_3$  65%, 5 mL  $\text{HClO}_4$  70%, calentando hasta sequedad. La adición de  $\text{HClO}_4/\text{HNO}_3$  se repitió dos veces.

En cada fracción, las muestras fueron centrifugadas a 8000 rpm (Sorval® RC-5C) durante 15 minutos, el sobrenadante fue decantado y filtrado (papel Whatman 42). El residuo sólido fue utilizado para el siguiente paso. El contenido de metales en los extractos fue determinado por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer Analyst 800).

### **3.5. Análisis estadístico y generación de gráficos.**

Los datos fueron analizados estadísticamente usando el programa SPSS (Statistical Package Social Science / Statistical Product and Service Solutions) v. 13.0. Las medias fueron comparadas usando ANOVA de un factor con el test de Duncan con una significación  $p = 0,05$ , utilizando el error estándar para determinar la variabilidad de las medias. Los gráficos se elaboraron con el programa Sigmaplot 10.0 o con Microsoft Excel XP.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1. Propiedades físicas

El compost agotado de cultivo de champiñón y setas (CAC) es un material muy heterogéneo que proviene de una gran variedad de residuos de la industria agroalimentaria. El conocimiento de sus propiedades tanto físicas como químicas es imprescindible para poder enfocar su reutilización de manera más efectiva.

**Tabla 6.** Propiedades físicas básicas del CAC estudiado.

	Humedad (%)	Densidad aparente seca (kg m <sup>-3</sup> )	Densidad real (kg m <sup>-3</sup> )	Porosidad total (%)	Partículas menores de 2 mm (%)
CAC	52	240	1435	84	57

Los análisis físicos del CAC estudiado muestran unos valores aceptables para utilizarlo como sustrato de cultivo (Ansorena, 1994; Benito, M. 2002; López-Cuadrado, 2006). Se trata de un material poco denso donde se pueden distinguir fragmentos de paja, orujo de uva y otros materiales gruesos que no han terminado de degradarse. Esto hace que el tamaño de partícula sea relativamente alto y evite posibles encharcamientos. Así pues la porosidad es elevada permitiendo un buen intercambio de gases.

### 4.2. Análisis químico

En la tabla 7 se pueden observar los valores de los análisis químicos realizados sobre el CAC exceptuando el contenido en metales que se discutirá más adelante. De manera general, los valores obtenidos entran dentro de los intervalos encontrados por Jordan, y col. (2008) quienes analizaron más de 60 muestras de CAC distintos (Tabla 4).

En general no se observa ningún parámetro fuera de los intervalos normales encontrados para sustratos orgánicos (Ansorena, 1994). Se puede ver como el pH es elevado para un uso agrícola, aunque no alcanza valores peligrosos. Por lo demás, se trata de un sustrato con una gran base orgánica, con unas concentraciones de K y P considerables a la hora de orientarlo hacia enmiendas como aporte de nutrientes. Su

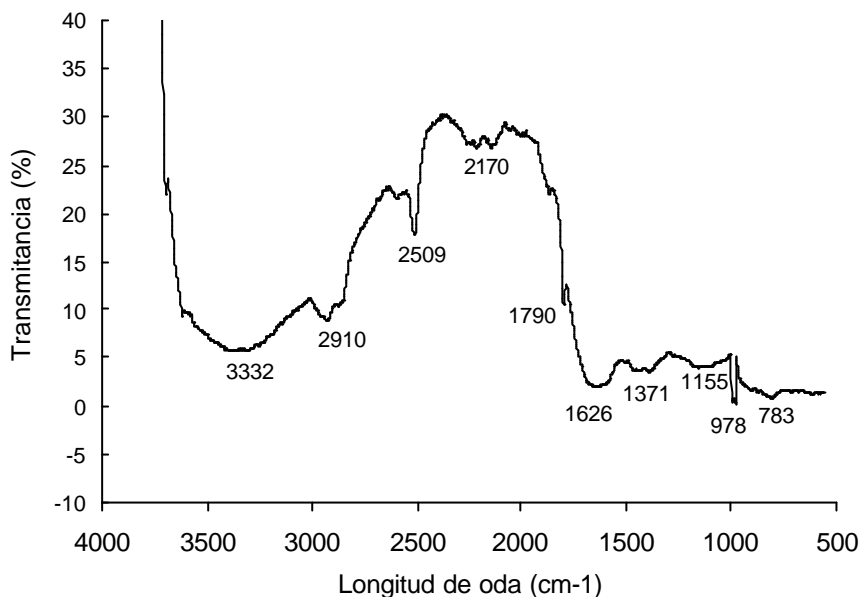
relación C/N de 35 es elevada y podría pensarse que el material no está compostado completamente, sin embargo este valor puede ser engañoso ya que el CAC posee una gran cantidad de paja muy difícil de descomponer. Aún así valores por debajo de 40 se suponen aceptables para utilizarlo como sustrato de cultivo (Lopez-Cuadrado, 2006). Esta misma autora obtuvo también valores muy altos de relación C/N para materiales lignificados como compost de corteza de pino, sin encontrar problema alguno en el cultivo de plantas ornamentales.

**Tabla 7.** Principales análisis químicos realizados en el CAC. n = 4

pH		$8,0 \pm 0,2$
CE (dS m <sup>-1</sup> )	1:5 agua/sustrato v/v	$3,58 \pm 0,2$
Ca		$0,5 \pm 0,1$
Mg	Disolución	$0,12 \pm 0,02$
K	extractora de Morgan	$14,5 \pm 3,1$
Na	(g Kg <sup>-1</sup> )	$1,6 \pm 0,2$
P		$8,5 \pm 1,0$
N – NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1:5 agua/sust (mg L <sup>-1</sup> )	$4,0 \pm 0,4$
Cl		$86 \pm 5$
N Total	Kjeldahl (%)	$1,24 \pm 0,2$
M.O.	(%)	$75 \pm 7$
C/N		$35 \pm 3$
CIC <sub>E</sub>	(cmol c kg <sup>-1</sup> )	$99 \pm 8$
Ex. Humic Total		$14,2 \pm 1,5$
Ácidos Humicos	(%)	$5,0 \pm 0,6$
Ácidos Fulvicos		$9,2 \pm 0,8$

### 4.3. Caracterización de CAC mediante espectroscopía de infrarrojo

El espectro de infrarrojos de un material orgánico nos da información sobre el tipo de grupos funcionales que posee. Generalmente en materiales tan complejos como el que nos ocupa, la información es orientativa ya que normalmente no se consigue una gran resolución de picos. La variedad y cantidad de grupos funcionales obtenidos es tal que los picos detectados quedan enmascarados, y suelen responder a la suma de varios grupos funcionales. No obstante, es posible obtener una información consistente sobre el tipo de grupos funcionales predominantes. En la figura 10 se muestra el espectro de infrarrojos realizado sobre el CAC.



**Figura 10.** Espectro de infrarrojos de CAC.

Se puede observar una banda muy ancha a  $3.332\text{ cm}^{-1}$  propia de la vibración del enlace OH (Yun et al., 2001; Tarley and Arruda, 2004). Los compuestos alcohólicos y fenólicos suelen producir bandas anchas, mientras que para los OH de los grupos carboxílicos suelen ser más estrechas (Pretsch et al., 2005). Esta zona del espectro suele ser decisiva para diferenciar ácidos húmicos y fúlvicos, estos últimos con más proporción de ácidos carboxílicos (Stevenson, 1994). En nuestro caso la banda es demasiado ancha como para asociarla únicamente a grupos alcohólicos, por lo que probablemente se deba a una mezcla de diversos grupos fenólicos e hidroxilos, muy abundantes en la celulosa y derivados, y en menor medida a ácidos carboxilos. Si tenemos en cuenta que una de las principales materias primas del CAC es paja de trigo, podemos atribuir esta banda principalmente a los grupos hidroxilos de la celulosa y hemicelulosa. Lau y col. (2003) encontraron una banda similar en CAC, atribuyéndola a grupos OH de la celulosa y posiblemente también a grupos  $\text{-NH}_2$ .

El pico observado alrededor de  $2.910\text{ cm}^{-1}$  apoya esta identificación ya que comúnmente es asignado a los grupos  $\text{CH}_2$  unidos a los grupos OH, conformando los ya mencionados alcoholes.

Aún así los ácidos carboxílicos parecen estar también presentes, ya que a  $1.626\text{ cm}^{-1}$  encontramos un pico ancho que posiblemente corresponde a  $\nu_{\text{C=O}}$  (tensión de vibración). Los pequeños picos observados a  $1.371\text{ cm}^{-1}$  y  $1.155\text{ cm}^{-1}$  corresponden también a grupos carboxílicos (vibración de flexión  $\delta_{\text{OH}}$  y vibración de tensión  $\nu_{\text{COH}}$  respectivamente) (Pretsch et al., 2005).

La amplitud del pico observado a  $1.626\text{ cm}^{-1}$  puede deberse a una mezcla de varios grupos funcionales. Por un lado, grupos carbonilos como cetonas y aldehídos o ácidos carboxílicos, los cuales pueden estar conjugados o no, con anillos aromáticos. Si lo están, darían lugar a un pico a una longitud de onda ligeramente mayor (en nuestro caso  $1.790\text{ cm}^{-1}$ ). Por otro lado, en esa misma zona del espectro se encuentra también la señal correspondiente al estiramiento del enlace de distintos anillos aromáticos (Chen, et al., 2005).

En la zona de longitudes de onda más bajas se pueden distinguir las señales propias de grupos fosfato (Pagnanelli et al., 2000). A  $978\text{ cm}^{-1}$  se reconoce la señal característica de  $\nu_{\text{P=O}}$ , y el estiramiento del doble enlace  $\nu_{\text{P=O}}$  aparece a  $1.155\text{ cm}^{-1}$  contribuyendo a ensanchar este pico, que como ya se ha comentado antes posiblemente también responda a la  $\nu_{\text{CO}}$  de grupos carbonilo.

Otros autores asignan la banda de  $1.155\text{ cm}^{-1}$  a los grupos  $-\text{NH}-$  (Guibal y col., 1995), aunque la corroboración de si es amida primaria, secundaria o terciaria, cae en una zona que en nuestro espectro es difícil de interpretar ( $1.300\text{-}1.600\text{ cm}^{-1}$ ).

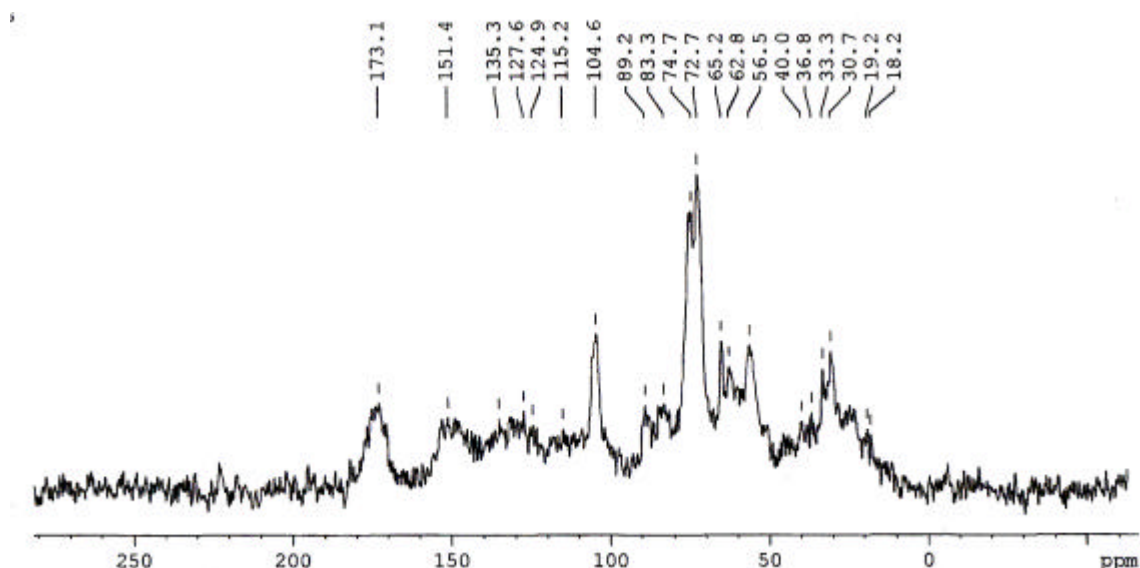
Por último, a  $2.509\text{ cm}^{-1}$  aparece un pico marcado de difícil interpretación. Lau y col., (2003) estudiaron el espectro de infrarrojos de un CAC obtenido a partir del cultivo de *Pleurotus pulmonarius*, observando picos similares a los descritos en nuestro espectro. Sin embargo, no pudo asignar la banda cercana a  $2.500\text{ cm}^{-1}$  a ningún grupo funcional en concreto. Según Pretsch et al. (2005), los grupos S-H muestran una banda característica aguda y de poca intensidad en el intervalo  $2.600\text{-}2.500\text{ cm}^{-1}$ , lo cual describe bastante bien el pico en cuestión. Además, es difícil que otros grupos funcionales muestren esta banda. No obstante la corroboración de éste grupo se hace complicada mediante este tipo de análisis, ya que el resto de bandas aparecen entre  $900$  y  $500\text{ cm}^{-1}$ , zona donde confluyen las bandas de muchos otros grupos funcionales.

En resumen, se observan principalmente grupos funcionales como alcoholes y fenoles, grupos aromáticos, ácidos carboxílicos, compuestos carbonílicos, diversos tipos

de fosfato y posiblemente grupos tioles. Debido a las posibles reacciones de estos grupos funcionales con los metales pesados, la verificación de su presencia nos ayudará a interpretar la capacidad de CAC para retener metales.

#### 4.4. Caracterización de CAC mediante resonancia magnética nuclear (CP/MAS- $^{13}\text{C}$ RMN)

Con el objetivo de corroborar y ampliar los resultados obtenidos mediante análisis de infrarrojos, se realizó un espectro de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  sobre el CAC en estado sólido (Figura 11). Este análisis nos da información sobre el tipo de enlace que mantiene el carbono, y la integración de sus picos nos orienta sobre la proporción relativa de grupos funcionales (figura 12).



**Figura 11.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de CAC.

Al igual que ocurre en el análisis de infrarrojos, cada pico responde a la suma de varios tipos de grupos funcionales, los cuales a su vez, se ven enmascarados por un ruido (línea base) considerablemente alto. Zmora-Nahum y col. (2007) caracterizaron diversos residuos orgánicos obteniendo espectros muy similares al aquí expuesto para el CAC (Figura 11). Identificaron los siguientes picos:

28-30 ppm, cadenas alifáticas, metilenos terminales.



55 ppm, grupos metoxil, o N-alquil.

72 ppm, grupos alcohólicos.

104 ppm, carbono anomérico de la celulosa.

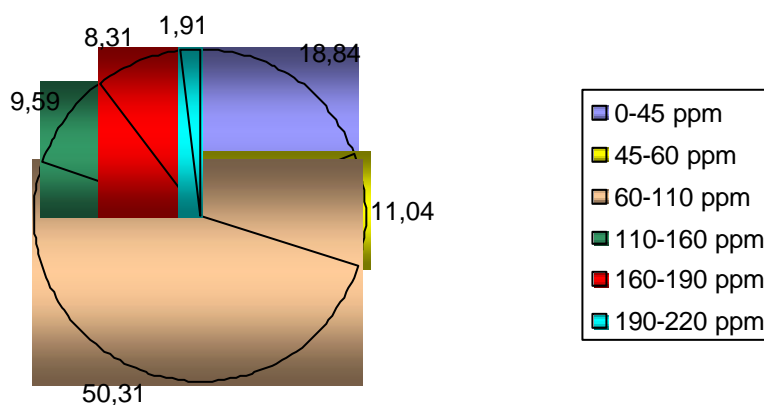
115 y 140 ppm, grupos aromáticos.

140-160 ppm grupos fenólicos.

175 ppm, grupos carboxílicos.

No obstante, en materiales tan complejos resulta efectivo dividir el espectro en varias secciones, separando así los grupos funcionales genéricos mayoritarios. Así pues, el espectro se dividió en seis secciones atendiendo a los desplazamientos químicos teóricos correspondientes a los distintos grupos funcionales (Stevenson, 1994):

- 0 – 45 ppm, asociado a cadenas alifáticas como alcanos o ácidos grasos
- 45 – 60 ppm, asociada a grupos N-alquil como aminas, aminoácidos, péptidos y proteínas
- 60 – 110 ppm, asociado a enlaces C-O, propios de los carbohidratos
- 110-160 ppm, propio de los grupos aromáticos
- 160 – 190 ppm asociado a grupos carboxílicos
- 190 – 220 ppm asociado a cetonas, ésteres y amidas.



**Figura 12.** Porcentaje relativo de C según la integración de las 6 secciones del espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN para el CAC.

Es de destacar el alto porcentaje de carbono asociado a enlaces C-O (60-110 ppm) propio de los alcoholes que conforman los carbohidratos (Stevenson, 1994) (Figura 12). Como ya se comentó anteriormente, la paja es uno de los principales componentes primarios del CAC, y ésta está compuesta en su mayoría por celulosa, hemicelulosa y lignina. Todos estos compuestos presentan una elevada concentración de carbohidratos, por lo que no es de extrañar que más del 50% del carbono del CAC provenga de ellos.

También se observa una concentración importante de cadenas alifáticas o ácidos grasos (0-45 ppm) y proporciones similares de grupos aromáticos, carboxilos y amidas. La fracción más baja corresponde a la asociada con grupos carbonilos como aldehídos y cetonas. Otros autores observaron una distribución similar (aunque con variación en los datos) en compost de diferentes residuos orgánicos: restos de podas (Tapia, 2007), corteza de pino (Preston y Forrester, 2004), lodos de depuradora (Tapia, 2007; Vaca-Paulin et al., 2006).

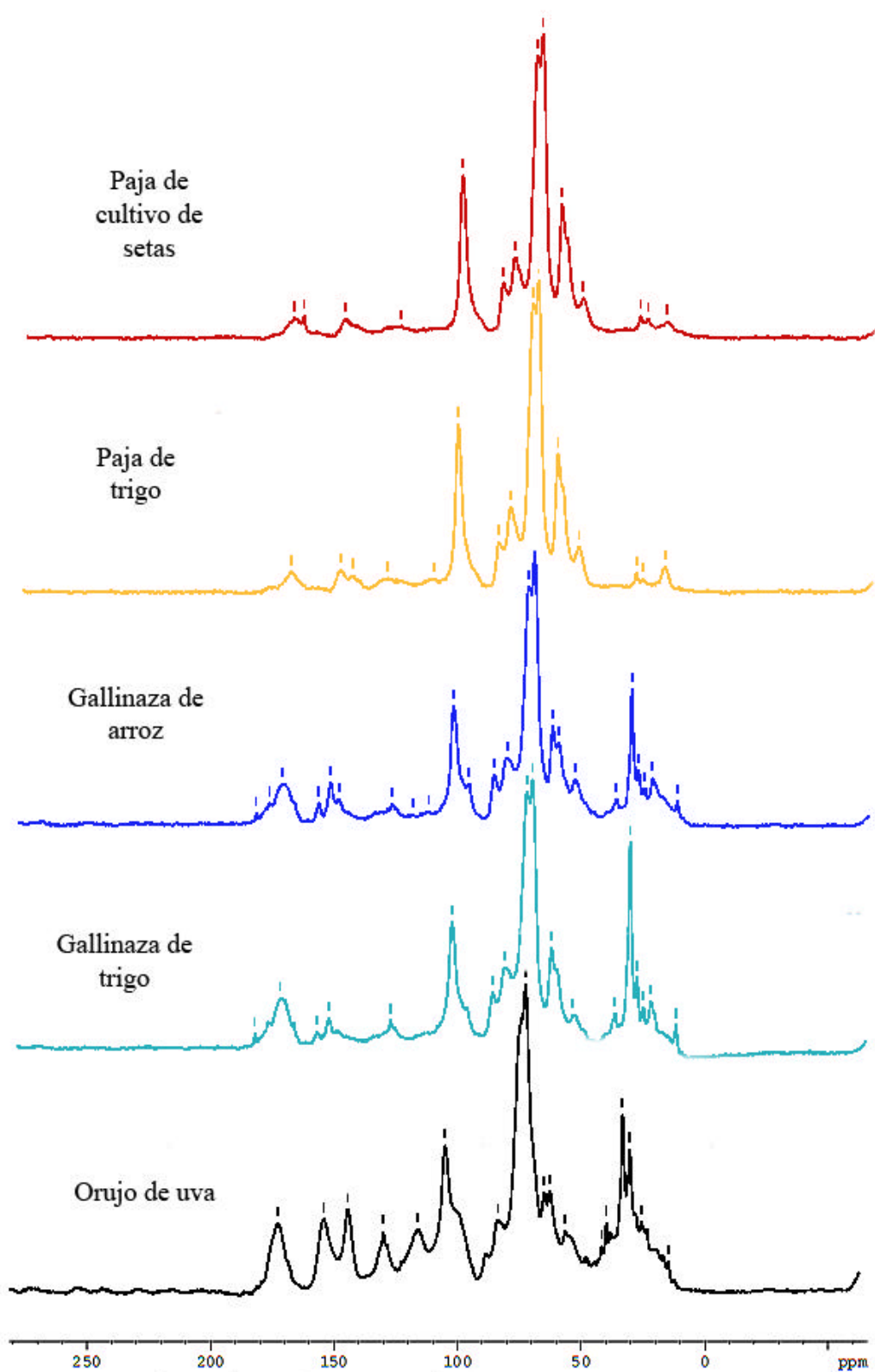
Los resultados obtenidos mediante análisis de infrarrojos del CAC se completan así mediante el análisis de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ , comprobando que el carbono orgánico se distribuye principalmente entre más de un 50 % de hidratos de carbono, cerca de un 19 % de cadenas alifáticas, amidas (11 %), grupos aromáticos (9,6 %) y ácidos carboxílicos (8,3 %) (Figura 12).

#### **4.5 Caracterización de los materiales utilizados en la elaboración del CAC mediante RMN $^{13}\text{C}$**

Dado que la composición del CAC viene determinada por sus productos de partida, se realizaron también espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  para los cinco componentes orgánicos antes de entrar en la cadena de elaboración de CAC: orujo de uva (OU), gallinaza de trigo (GT), gallinaza de arroz (GA), paja de trigo (PT) y paja del cultivo de setas (PS) (Figura 13.).

Se pone de manifiesto que los compuestos orgánicos encontrados en el CAC (Figura 11) mediante RMN  $^{13}\text{C}$ , coinciden con los detectados en sus componentes iniciales (Figura 13). Según este análisis, se observa una similitud evidente entre los dos

tipos de paja, y también entre los dos tipos de gallinazas, independientemente de su procedencia.



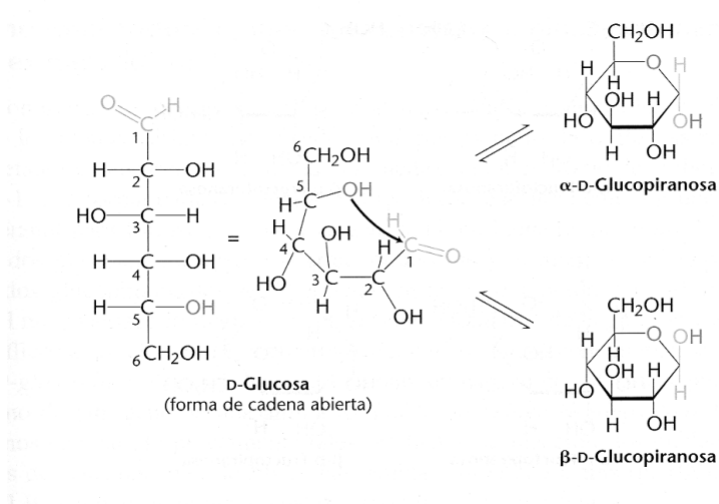
**Figura 13.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN de los componentes orgánicos del CAC.

Por otro lado el orujo de uva presenta una distribución de picos diferente al resto de materiales, sobre todo, en la zona superior a 100 ppm, correspondiente a grupos aromáticos y carbonílicos.

Con respecto a la interpretación de las señales obtenidas, se puede observar un primer pico en torno a 33 ppm en OU, GA y GT, no así, o muy débil, en las dos pajas de trigo. Este pico es propio de los grupos metilenos terminales en cadenas alifáticas (Preston, 1996). En OU, se desdobra señalando la existencia de varios tipos de cadenas alifáticas, no siendo posible su identificación exacta.

En torno a 56 ppm aparece en todos los compuestos un pico ancho y débil debido a la presencia de grupos metoxilos (C-O-) o enlaces N-alquil, aunque debido a su intensidad, se podría decir que no son muy abundantes.

El pico más marcado en todos los espectros es el que aparece en torno a 72 ppm, asociado a la presencia de alcoholes (C-OH), propia de los polisacáridos como la celulosa y derivados. La gran abundancia de estos compuestos también se pone de manifiesto en la existencia de un pico intenso alrededor de 105 ppm. Esta señal se atribuye al carbono anomérico formado en la ciclación de los polisacáridos (Zmora-Nahum y col. (2007).



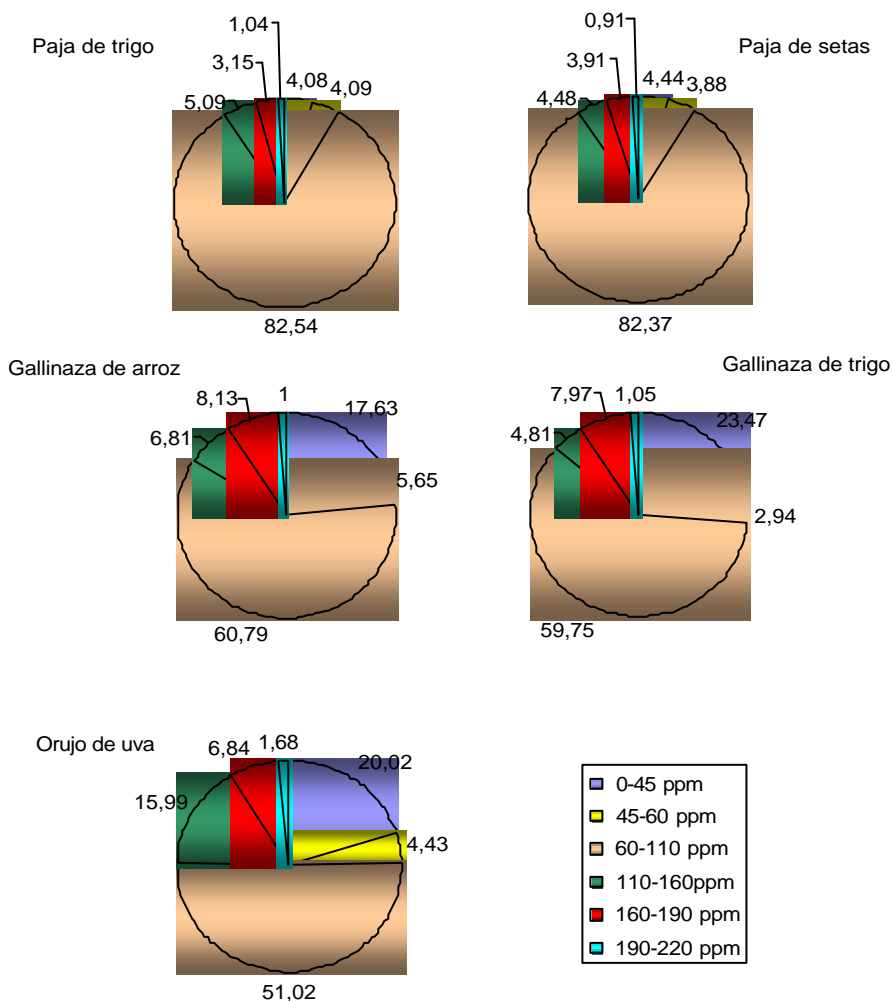
**Figura 14.** Formación de un carbono anomérico en la ciclación de la glucosa.

Un carbono anomérico hace referencia al carbono carbonílico que se transforma en un nuevo centro quiral tras una ciclación hemiacetal (Figura 14). El azúcar

(carbohidrato) en su modo cíclico puede asumir dos orientaciones en el espacio, que se designan con las letras griegas  $\alpha$  y  $\beta$ . Éstos son anómeros, correspondientemente uno del otro.

Por otro lado, sólo el OU muestra variedad en los grupos aromáticos identificables en los picos que aparecen entre 115 y 130 ppm, grupos fenólicos (picos a 145 y 154 ppm) y grupos carboxílicos (pico a 173 ppm). Estos picos aparecen muy débilmente en el resto de materiales, aunque las gallinazas muestran más intensidad que los dos tipos de pajas.

Para interpretar de manera cuantitativa los espectros, se integraron separándolos en las 6 secciones anteriormente estudiadas (Stevenson, 1994). En la Figura 15 se muestran los porcentajes relativos de carbono asociado a cada una de las secciones.



**Figura 15.** Porcentaje de C según la integración de las 6 secciones del espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN para el CAC.

La fracción asociada a carbohidratos (60-110 ppm) es mayoritaria en todos los componentes, siendo superior al 80 % en los dos tipos de paja estudiados. En estos materiales, esta fracción debe provenir principalmente de celulosa y compuestos derivados. Este resultado es lógico ya que todos los materiales presentan en su origen este tipo de compuestos: el OU posee gran parte de semillas, piel de uva y restos de sarmientos propios del proceso del despalillado y prensado de la uva; la cascarilla de arroz del GA posee también alto contenido en carbohidratos; PT, PS y la gallinaza sobre paja de trigo basan su composición en paja compostada, por lo que su contenido en compuestos derivados de la celulosa es elevado. El contenido genérico de carbono asociado a celulosa y derivados en paja de trigo se estima entre el 76% y 89% (Jiménez y col., 2002), dato consistente con los resultados obtenidos.

El resto de compuestos, distintos a carbohidratos, presentes en PT y PS son minoritarios, no superando el 6% en ningún caso. El relativamente alto porcentaje de grupos aromáticos (asociados al intervalo entre 110 y 160 ppm) en OU (16 %) debe provenir en gran medida de su contenido en polifenoles (flavonoles, carotenoides y antocianos) propios de este material en su origen (Negro y col., 2003). Los porcentajes de grupos carboxílicos son similares en OU, GA y GT, siendo mínimos en PT y PS.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de CAC expuesto en la figura 11 muestra una combinación de todos los picos que aparecen en los espectros de sus componentes. Así pues, se puede llegar a la conclusión de que el alto contenido en celulosa y derivados en el CAC proviene principalmente de la paja de trigo, que forma parte de varios de sus componentes. Los grupos aromáticos los aporta principalmente el OU, y los grupos carboxílicos provienen en gran parte de OU y, en menor medida, de las dos gallinazas. Esta información es importante ya que cada grupo funcional tiene un comportamiento distinto frente a los metales pesados. Si conocemos la composición primaria de un CAC podremos interpretar mejor su comportamiento frente a metales pesados, o influir en su elaboración para potenciar la retención de algún metal pesado en concreto.

#### **4.6. Caracterización del CAC en sus diferentes estados de fermentación mediante RMN $^{13}\text{C}$**

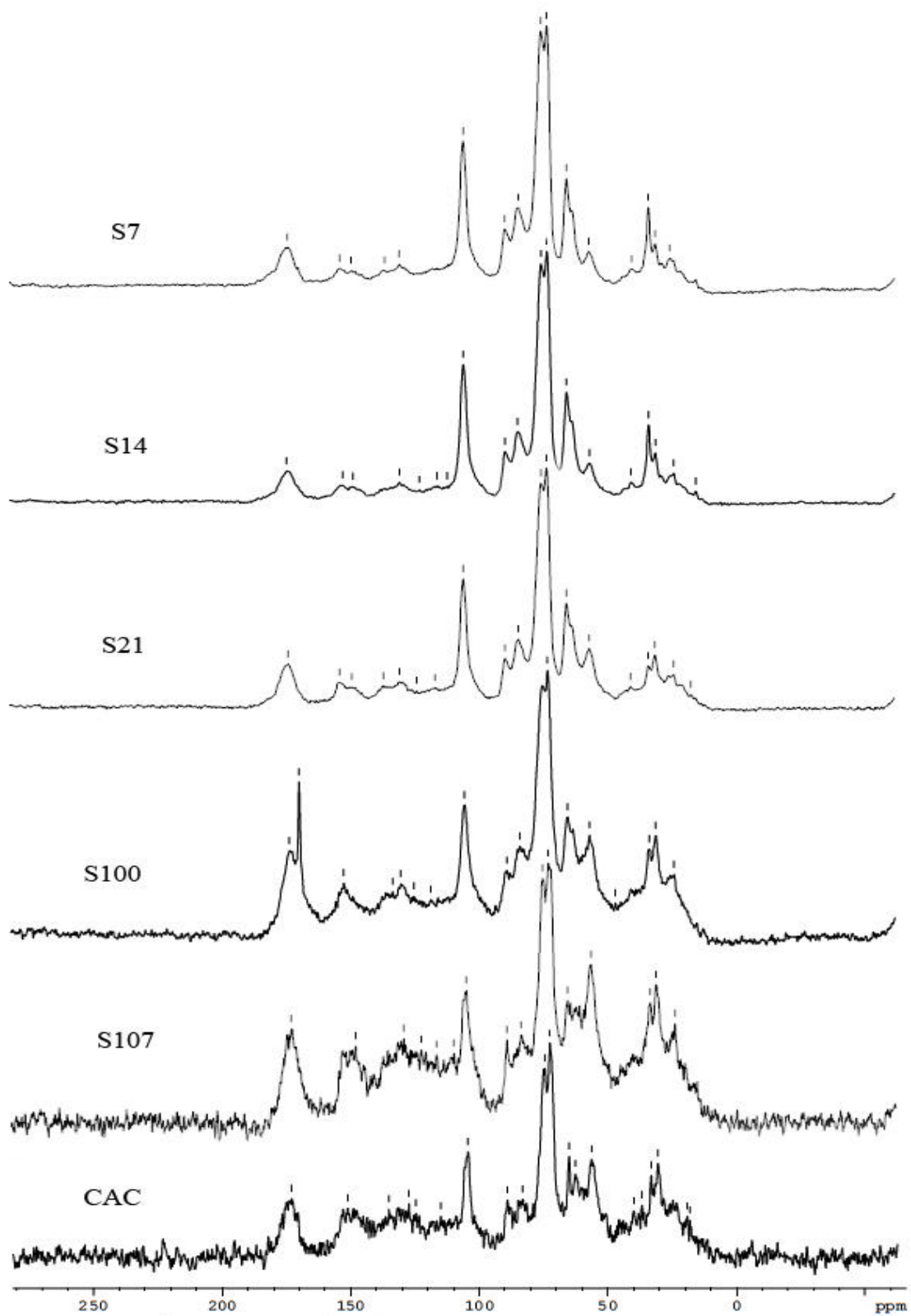
Como se observa en el esquema de la Figura 5, para elaborar el CAC se mezclan inicialmente todos los componentes primarios y se compostan conjuntamente durante 21 días. Después se procede al cultivo de champiñón (*Agáricus bisporus*) sobre dicho

sustrato. Una vez terminado el cultivo se compostan las balas conjuntamente con la paja procedente del cultivo de setas (*Pleurotus ostreatus*), dando como resultado final el CAC. Si asumimos que una vez mezclados los componentes primarios, no hay otro aporte externo de material hasta la formación del CAC, podremos suponer que los cambios en el material se deben casi exclusivamente a los procesos de fermentación. Se decidió pues, tomar muestras en diferentes pasos del proceso y de este modo obtener materiales muy semejantes al CAC pero con distintos grados de fermentación.

Así, tenemos un sustrato con todos los materiales primarios con 7, 14 y 21 días de fermentación forzada (S7, S14 y S21 respectivamente), sustrato después del cultivo de champiñón, el cual dura unos 100 días (S100), y por último el CAC que resulta de una fermentación forzada de 7 días. Es preciso aclarar que el CAC no solo es el S100 compostado de forma forzada, sino que se elabora compostando el S100 junto con un 30% de paja proveniente del cultivo de setas (CAC = S100 + PS fermentado durante 7 días). Por otro lado también se tomó muestra del S100 compostado forzadamente sin paja de setas (S107) evitando así la variable incorporada al añadir PS.

En la Figura 16 se representan los espectros de las muestras analizadas. En general se puede observar que aparecen los mismos picos en todos los espectros, indicando que no hay generación de compuestos nuevos en el proceso. La intensidad del ruido aumenta según aumenta el proceso de fermentación, seguramente porque también aumenta la complejidad del material.

Independientemente de la intensidad de los picos, se pueden destacar dos cambios principales. El primero se observa en los picos entre 55 y 65 ppm correspondientes a grupos metoxil o N-alquil. En el S7 aparece un pico intenso a 65 ppm y un hombro poco intenso a 56 ppm. Sin embargo, a medida que se avanza en la fermentación estos picos intercambian su intensidad, y en el S107 el pico a 56 ppm es más intenso que el de 65 ppm. Es posible que la fermentación haya modificado estos compuestos, aunque la interpretación exacta de estos picos no se ha podido comprobar. Otro cambio observado durante la fermentación ocurre en el intervalo correspondiente a los grupos aromáticos (110-160 ppm), donde se observa una mayor complejidad de los picos a medida que se avanza en el proceso.

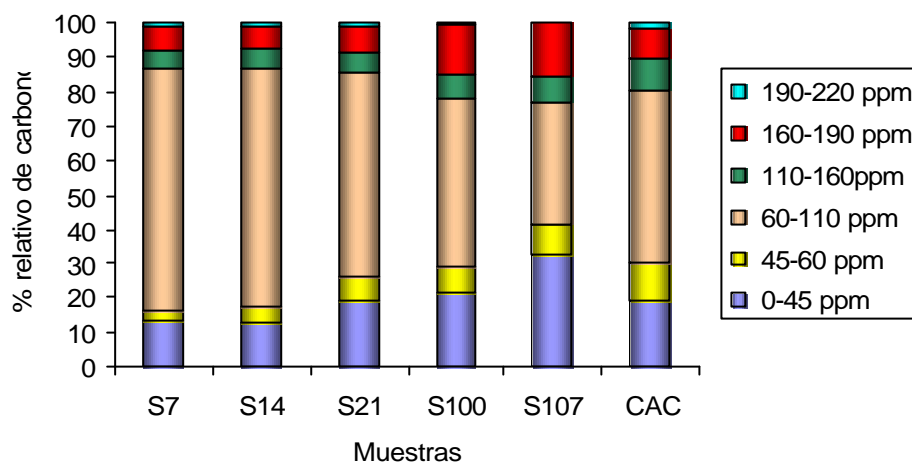


**Figura 16.** Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  del CAC en distintos estados de fermentación.



Para una mayor comprensión de los espectros se procedió a la integración en 6 secciones al igual que se hizo anteriormente con el CAC y sus componentes primarios (Stevenson, 1994; Zmora-Nahum y col. (2007).

En la Figura 17 aparecen los valores de la integración en 6 secciones, estudiadas anteriormente, de los diversos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  realizados.



**Figura 17.** Porcentaje relativo de carbono según la integración en 6 secciones del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de las muestras de CAC en diferentes estados de fermentación.

Se observa como durante la fermentación (paso de S7 a S107) el contenido de carbohidratos va disminuyendo sensiblemente aumentando la fracción asociada a cadenas alifáticas simples y, en menor medida, la de los ácidos carboxílicos. Posiblemente los carbohidratos sean la fuente primaria de energía de los organismos involucrados en la fermentación, la cuál no sólo se produce en la preparación del sustrato de cultivo de champiñón (paso de S7 a S21), sino que continúa durante el propio cultivo (S21 a S100) (Durrant y col. 1991). El resto de fracciones orgánicas provienen de los diferentes componentes primarios anteriormente estudiados, aunque su concentración es variable debida al tipo de material y a los procesos de fermentación.

El aumento de la fracción de carbohidratos del CAC respecto del S107, se debe principalmente a la incorporación de la paja de setas en el último paso de la cadena de producción.

#### 4.7. Contenido en metales en CAC

El análisis de la concentración total de metales (y As, considerado como metaloide) del CAC estudiado se presenta en la Tabla 8 junto con los valores medios de referencia obtenidos por Jordan y col. (2008)

**Tabla 8.** Concentración de metales totales en CAC estudiado y en CAC de referencia (Jordan et al, 2008)

	CAC estudiado (n=3)	CAC de referencia (n=63)
Cd	0,10 ± 0,01	6,2 ± 1,2
Pb	6,2 ± 0,2	10,4 ± 1,7
Cu	30,4 ± 1,1,0	54 ± 21,2
Zn	141 ± 7	143 ± 39,2
Ni	16,8 ± 1,0	5,8 ± 0,2
As	19,6 ± 3,0	---
Cr	18,7 ± 0,4	0,21 ± 0,01
Fe*	8,2 ± 0,4	4,7 ± 0,95
Mn	279 ± 5	164 ± 36,5
Al*	14,9 ± 1	---

*Digestión mediante mezcla HNO<sub>3</sub> / HCl 1:3 seguido de calor.*  
*Unidades, (mg kg<sup>-1</sup>), \*(g kg<sup>-1</sup>).*

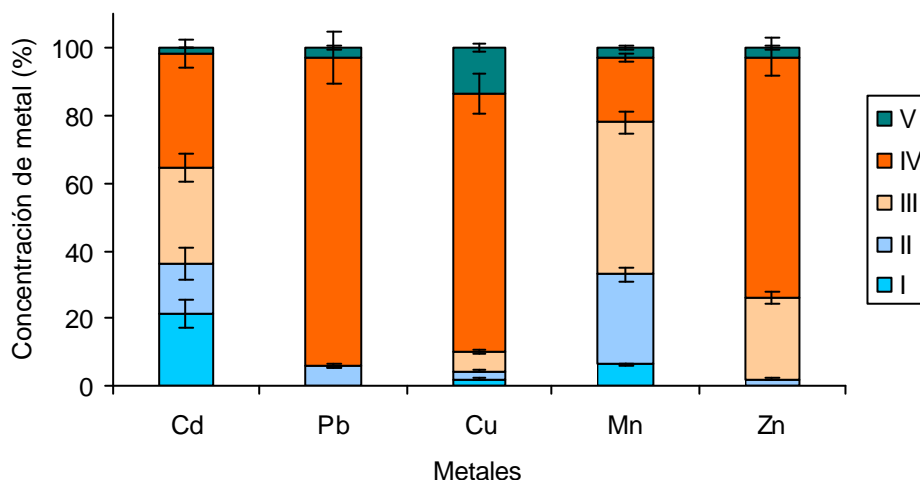
Como se puede observar las muestras de CAC usadas en nuestro trabajo tienen relativamente concentraciones moderadas de los metales analizados. La concentración de Cd, uno de los metales más tóxicos, es prácticamente nula y es probable que venga como impureza en el yeso agregado para la preparación de las balas de cultivo de champiñón (Vedder y Galindo, 1979). El resto de metales tienen concentraciones relativamente bajas. El alto contenido de Al y Fe puede indicar un elevado contenido en óxidos de éstos metales. La arena caliza y arcillosa que se aplica justo antes de implantar el micelio puede ser la responsable de estos altos niveles de Al debido a la presencia de aluminosilicatos.

Si comparamos estos niveles con los establecidos por la legislación de fertilizantes (R.D/824/2005) (Tabla 5) comprobamos que nuestro CAC se podría clasificar dentro de la clase A, siendo apto para ser aplicado como enmienda orgánica. Sin embargo, si consideramos las medias obtenidas por Jordan y col. (2008) (Tabla 8), parece ser que el CAC, en general, tiende a mostrar valores de Cd superiores a los permitidos por la legislación (0,7-3 mg kg<sup>-1</sup> según uso). Otros autores han recogido concentraciones de Cd más cercanos a los obtenidos en nuestro trabajo (0,5 ± 0,1 mg

kg<sup>-1</sup> n = 620), (Gerrits, 1994), (0,43 mg kg<sup>-1</sup> n =3), (Wuest and Fahy, 1991). Esta diversidad de resultados pone de manifiesto que el material CAC depende de donde se produzca y cuales sean sus materias primas y procedimientos de elaboración.

#### 4.8. Distribución de metales en CAC

Para tener un mejor conocimiento de la forma en la que se encontraban los metales en el CAC, se realizó una extracción secuencial siguiendo el método de Tessier (detallado en el apartado 3.4.2. del presente capítulo). Este análisis nos proporciona información sobre el tipo de enlace que mantiene al metal unido al CAC, distinguiendo entre 5 fracciones consecutivas. En la Figura 18 se muestra la concentración de Cd, Pb, Cu, Mn y Zn en cada una de las fracciones analizadas. Se escogieron estos elementos por ser metales pesados muy tóxicos (Cd y Pb), ó por ser metales con interés nutricional (Cu, Mn y Zn). Además, los suelos que se estudiados en los capítulos VII y VIII poseen elevadas concentraciones de Cd, Pb y Cu.



**Figura 18.** Distribución de metales en CAC según el fraccionamiento Tessier. Las barras de error corresponden al error típico, n= 3. Números romanos representan las diferentes fracciones del análisis.

Esta extracción distingue entre 5 fracciones principales:

I: fracción soluble en agua y sometidos a procesos de intercambio catiónico, muy lábil y fácilmente disponible y por tanto también lixiviable.

II: fracción asociada a carbonatos, soluble en medio ácido (pH = 5).

III: fracción asociada a óxidos de hierro y manganeso. Aparecen los metales principalmente adsorbidos a este tipo de superficies.

IV: fracción asociada a la materia orgánica. Metales que de alguna manera están unidos a los diferentes compuestos orgánicos del material.

V: fracción residual. Aquí se engloban al resto de tipos de enlaces que suelen ser más fuertes, ya que pueden estar formando parte de minerales.

Según esta clasificación se puede observar que el Cd está presente de forma considerable en todas las fracciones. Esto quiere decir que el CAC es capaz de lixiviar parte del Cd con relativa facilidad, y retener el resto en muy diversas formas, aunque en nuestro caso esta lixiviación es casi nula debido al bajo Cd total que posee. En la bibliografía hay pocos estudios sobre la distribución de metales pesados en CAC, sin embargo, si hay de otros residuos orgánicos compostados, como lodos de depuradora, o corteza de pino. Éstos revelan que el Cd se encuentra principalmente en las fracciones solubles (I y II). Tapia (2007) observó que el Cd en lodos de depuradora se encontraba hasta en un 80% en estas dos fracciones, y cerca de un 90%, en un material formado principalmente por corteza de pino compostada. Alonso y col. (2002) encontraron resultados similares para compost de lodos de depuradora.

El Mn mantiene una distribución similar a la del Cd pero con un mayor porcentaje asociado a los óxidos de hierro y de manganeso, como era de esperar. No obstante, como el contenido de Mn total es elevado, las fracciones solubles (FI y FII) no son despreciables, pudiendo generar condiciones de riesgo en una posible aplicación agraria.

Es de destacar que el Pb, Cu y Zn se encuentran principalmente asociados a la materia orgánica, con unos porcentajes de 91,5 %, 76,5 % y 71,4 % respectivamente. Las fracciones más solubles son relativamente escasas en estos metales, por lo que es de esperar que su lixiviación también lo sea. Estos resultados se corresponden con los obtenidos por otros autores (Illera, 1998; Walter et al., 2006; Tapia, 2007).

Así pues, el CAC estudiado presenta bajas concentraciones de Cd y Pb, principalmente están retenidos en la fase orgánica, de difícil liberación. El Mn parece ser el metal más soluble (suma de fracción I y II = 33%). Si tenemos en cuenta el contenido total de Mn en CAC ( $279 \text{ mg kg}^{-1}$ ), podríamos concluir que este material aporta cerca de  $90 \text{ mg kg}^{-1}$  de Mn de manera disponible.

## 5. CONCLUSIONES

- El CAC es un material generado en grandes cantidades y su acumulación en vertederos puede producir problemas de contaminación por lixiviados salinos. Sin embargo, según los análisis realizados en éste capítulo, posee ciertos elementos nutrientes, útiles para los cultivos (K y P principalmente) que pueden valorizarlo. Además, puede ser usado como enmienda orgánica ya que sus niveles de metales pesados están por debajo del límite establecido por la legislación.
- El CAC es un material heterogéneo principalmente compuesto por paja de trigo, la cual aporta un alto contenido en hidratos de carbono. También posee una alta proporción de moléculas con grupos aromáticos, carboxílicos y fenólicos, procedentes principalmente del orujo de uva y de las gallinazas usadas como materiales iniciales de elaboración.
- La presencia de estos grupos funcionales detectados en CAC hace pensar que puede haber procesos de interacción con metales pesados ya que éstos, pueden sufrir reacciones de adsorción/desorción con una gran variedad de compuestos orgánicos.
- Durante el proceso de compostaje necesario para elaborar el CAC, el mayor cambio observado en el sustrato ha sido la disminución de la fracción de C asociada a hidratos de carbono. Se encontró también un aumento en el C asociado a cadenas alifáticas simples, y a moléculas con grupos carboxílicos. Por lo que es posible que los hidratos de carbono se transformen en estas últimas moléculas durante la fermentación.

## V. ENSAYOS DE ADSORCIÓN DE Cd, Pb Y Cu EN CAC

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	59
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	62
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	63
3.1. Construcción de curvas isotermas de adsorción.....	63
3.1.1. Construcción de isotermas de adsorción de Cd, Pb y Cu a pH fijo .....	63
3.1.2. Construcción de isotermas de adsorción en varios pH.....	63
3.1.3. Construcción de isotermas de adsorción a varias temperaturas. Estudio termodinámico .....	64
3.2. Valoración potenciométrica de CAC. Estudio de los sitios de adsorción .....	64
3.3. Análisis estadístico y generación de gráficos .....	65
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	66
4.1 Retención de Cd, Pb y Cu por los componentes primarios de CAC .....	66
4.2. Retención de Cd, Pb y Cu en CAC en sus diferentes estados de fermentación. Isotermas de adsorción .....	71
4.3. Efecto del pH en la adsorción de Cd, Pb y Cu en CAC.....	75
4.4. Efecto de la temperatura sobre la adsorción de Cd en CAC .....	77
4.5. Estudio de los sitios de adsorción mediante valoración potenciométrica.....	80
<b>5. ONCLUSIONES</b> .....	83

## V. ENSAYOS DE ADSORCIÓN DE Cd, Pb Y Cu EN CAC

### 1. INTRODUCCIÓN

Como se vio en el capítulo anterior, el CAC contiene una gran variedad de grupos funcionales reactivos de naturaleza orgánica e inorgánica, y cada uno de ellos puede ofrecer una dinámica de retención de metales diferente. Esto complica considerablemente su estudio por lo que se decidió analizar la capacidad del CAC para adsorber metales a partir de sus componentes primarios, utilizando diversas condiciones analíticas: isotermas de adsorción a pH fijo, a pH variable y a diferentes temperaturas. Por otro lado, también se realizó una valoración potenciométrica del CAC con el fin de evaluar grupos funcionales existentes como sitios de enlace o de adsorción.

Las isotermas de adsorción han sido utilizadas durante muchos años para modelizar diversos procesos en superficie, aunque su interpretación física puede ser complicada, mucho más cuando la dinámica de retención obedece a diversos procesos (fisisorción, quimisorción). Los ensayos en agitación forzada son más reproducibles y nos proporcionan los límites máximos teóricos de adsorción, ya que tienden a representar situaciones de equilibrio, por lo que son utilizados en muchos estudios de adsorción de materiales (Zhou y col., 2005; Chen y col., 2005; Bradbury y Baeyens, 2005). Desde un punto de vista de utilidad agronómica sería más real efectuar los estudios de interacción mediante columnas de lixiviación. No obstante, a efectos de comparación de adsorción entre diferentes materiales, los ensayos de agitación aportan las ventajas de controlar más variables y acortar el tiempo de ensayo, aunque la extrapolación de sus resultados a condiciones agronómicas puede ser complicada.

Existen numerosos modelos matemáticos de isotermas de adsorción que proporcionan información sobre el tipo y parámetros de la adsorción. Uno de los más utilizados es el de Langmuir, cuya ecuación para un sitio de adsorción es:

$$q_e = \frac{q_{\max} a_L C_e}{1 + (a_L C_e)}$$



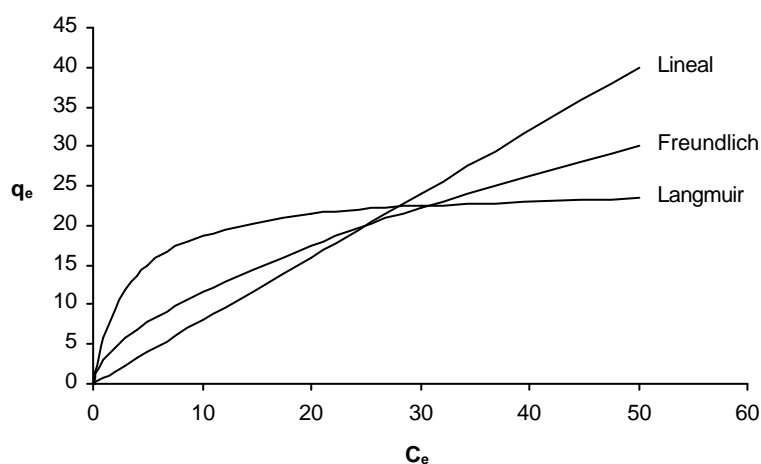
Donde  $q_e$  es la cantidad de adsorbato adsorbido por unidad de peso del adsorbente ( $\text{mg g}^{-1}$ ) en el equilibrio.  $C_e$  es la concentración final del adsorbato en el equilibrio ( $\text{mg L}^{-1}$ ),  $q_{max}$  es el nivel máximo de adsorción ( $\text{mg g}^{-1}$ ) y  $a_L$  es la constante de adsorción en el equilibrio ( $\text{L mg}^{-1}$ ).

Otro modelo frecuentemente utilizado es el de Freundlich cuya ecuación es:

$$q_e = K_F C_e^{1/n}$$

Donde  $q_e$  y  $C_e$  tienen el mismo significado que en el modelo de Langmuir,  $K_F$  es la constante de adsorción de Freundlich ( $\text{mg g}^{-1}$ ) y  $n$  es una constante que depende de la intensidad de adsorción (adimensional).

La interpretación de estos modelos se suele realizar mediante la representación gráfica de  $q_e$  frente a  $C_e$  (Figura 19). Dependiendo del modelo, la dinámica de adsorción se muestra diferente, variando principalmente en el ángulo de curvatura. Así en el modelo de Langmuir éste es más agudo que en el de Freundlich, y aún más que en el modelo lineal donde el ángulo de curvatura es cero. El significado físico de este ángulo es complicado ya que depende de la velocidad de adsorción, interacciones entre moléculas colindantes, vibraciones y movimientos aleatorios.



**Figura 19.** Ejemplo de diferentes modelizaciones de las isoterma de adsorción.

Mientras el modelo de Freundlich asume un sistema de capas difusas de adsorción y numerosas interacciones laterales entre las moléculas, las cuales efectúan movimientos aleatorios, el modelo de Langmuir contiene en su teoría numerosas aproximaciones físicas, suponiendo un sistema mucho más “ideal”, con una sola capa de adsorción bien definida y sin interacciones laterales ni vibraciones (Levine, 1996). Sin embargo, la gran fortaleza de los procesos de quimisorción o atracción electrostática pueden hacer que un sistema real se asemeje lo suficiente a uno ideal como para que pueda ser descrito mediante el modelo de Langmuir. De hecho este modelo ha sido utilizado con muy buenos resultados en la interpretación de procesos de adsorción de metales pesados sobre materiales complejos. Baker y col. (2004) lo utilizaron para describir la adsorción de metales sobre ácidos húmicos. Estudios similares se han realizado con quitina (Benguella y col., 2002), y biomasa procedente de algas verdes (Sart y col., 2008).

Si introducimos la temperatura como variable en las isotermas de adsorción podremos comprobar la influencia de ésta sobre los distintos mecanismos. Esto nos dará información muy valiosa sobre aspectos termodinámicos tales como la espontaneidad del proceso o las energías involucradas en él.

Para ello se pueden construir isotermas iguales a las descritas anteriormente pero fijando el ensayo a varias temperaturas.

Estas técnicas nos dan información sobre la dinámica de la adsorción, pero son poco concluyentes sobre el tipo de grupos reactivos involucrados en ella. Dado que el CAC contiene una gran variedad de moléculas orgánicas parece necesario introducir otra técnica analítica que especifique cuales son los más importantes.

El método de la valoración potenciométrica ha sido a menudo usado para evaluar los grupos funcionales existentes como sitios de enlace o de adsorción (Davis, 2000; Yun, 2001). Se basa en ir neutralizando gradualmente con una base los diferentes grupos orgánicos cargados negativamente. Si se representa la cantidad de base añadida frente al pH final, se obtiene una gráfica con varios puntos de inflexión correspondientes a la neutralización de cada grupo funcional. El dato más relevante obtenido de ésta gráfica es la constante de acidez, por la cuál, se puede identificar cada grupo reactivo. Esto no quiere decir que la adsorción de metales pesados (cargados positivamente) se vaya a producir exclusivamente sobre estos sitios de adsorción, pero

sí nos corrobora la existencia de los distintos grupos funcionales (demostrada anteriormente por métodos espectroscópicos) y los procesos de adsorción observados.

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo principal de este capítulo consiste en comprobar en condiciones de laboratorio, la capacidad del CAC para retener metales pesados (Cd, Pb y Cu). Dado que su composición final proviene en gran medida de sus componentes primarios y de procesos de compostaje, se pretende también estudiar el comportamiento de éstos frente a metales pesados y su variación durante todo el proceso de fabricación del CAC.

Como objetivo secundario se persigue investigar cuáles son los mecanismos responsables de la adsorción de metales sobre CAC.

Se eligieron el Cd, el Pb y el Cu por su toxicidad y por su abundancia en los suelos de mina donde más adelante se iba a probar el CAC como enmienda orgánica.

Cada uno de los ensayos realizados en este capítulo ofrece diferente información, pero una vez contrastada, pueden permitir una mejor interpretación del comportamiento del CAC frente a los metales pesados.

De todo ello se podría obtener información valiosa a la hora de establecer o modificar las propiedades de un CAC, en concreto para orientar mejor su utilización en suelos de mina.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Construcción de curvas isotermas de adsorción

##### 3.1.1. Construcción de isotermas de adsorción de Cd, Pb y Cu a pH fijo

Se construyeron las isotermas de adsorción de Cd, Pb y Cu para el CAC, sus componentes primarios y sus diversos estados de fermentación. Las curvas se realizaron mediante ensayos en baño termostatzado según la metodología descrita por Chen y col. (2005). La relación entre el material y la disolución de metal fue de 1g/L. En tubos de policarbonato se pesó 0.01 g con precisión del 1% de cada material y se puso a interaccionar con 8 concentraciones conocidas de cada uno de los metales, en el rango de 0 a 300 mg L<sup>-1</sup>. El pH de la suspensión se ajustó a 6,5 con NaOH o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se agitó durante 24 horas a una temperatura constante de 25°C en una incubadora termostatzada (Selecta Rotabit), seguido de centrifugación a 3000 rpm y filtrado (Whatman n° 42). La concentración de metal en el filtrado se midió en espectrofotometría de Absorción Atómica. El ensayo se realizó con 3 repeticiones por muestra. Los resultados se expresan en mg de metal adsorbido por g de material frente a la concentración de metal en el equilibrio de la interacción. Las curvas obtenidas se ajustaron a los modelos matemáticos de Langmuir y Freundlich mediante el programa Sigmaplot 10.0.

##### 3.1.2. Construcción de isotermas de adsorción en varios pH

Con el objetivo de estudiar la influencia del pH en la adsorción de Cd, Pb y Cu en CAC, se realizaron isotermas de adsorción sobre el material final a tres valores de pH. Para conseguir los tres niveles de protonación se siguió la metodología descrita por Baker y Khalili (2004).

*CAC<sub>a</sub>*: se realizó un protonación de CAC mediante tres lavados con HCl 1M en una relación 50/50 (p/v) seguidos de 3 lavados con agua ultra pura, hasta conseguir una conductividad eléctrica inferior a 0.25 dS m<sup>-1</sup> y un pH de 4,5.

*CAC<sub>b</sub>*: del mismo modo se realizaron tres lavados con NaOH 1M seguidos de 3 lavados con agua destilada, para formar *CAC<sub>B</sub>*, consiguiendo un pH de 8,3.

*CAC*: material sin alteración, con un pH de 7,3.

Una vez estabilizados los materiales se construyeron curvas isotermas de adsorción y se ajustaron al modelo de Langmuir tal y como se describe en el apartado 3.1.1 del presente capítulo.

### 3.1.3. Construcción de isotermas de adsorción a varias temperaturas. Estudio termodinámico

El estudio de las variables termodinámicas de la adsorción de Cd en CAC se realizó mediante la construcción de isotermas de adsorción a diferentes temperaturas. El método fue igual al descrito en el apartado 3.1.1, salvo que en este caso se fijó la temperatura, a 20, 25, 35, 45 y 50 °C mediante una incubadora termostatizada (Selecta Rotabit). Se realizaron 3 repeticiones por muestra. Las curvas se ajustaron al modelo de Langmuir para obtener la constante de adsorción  $a_L$ , utilizando el programa Sigmaplot 10.0.

## **3.2. Valoración potenciométrica de CAC. Estudio de los sitios de adsorción**

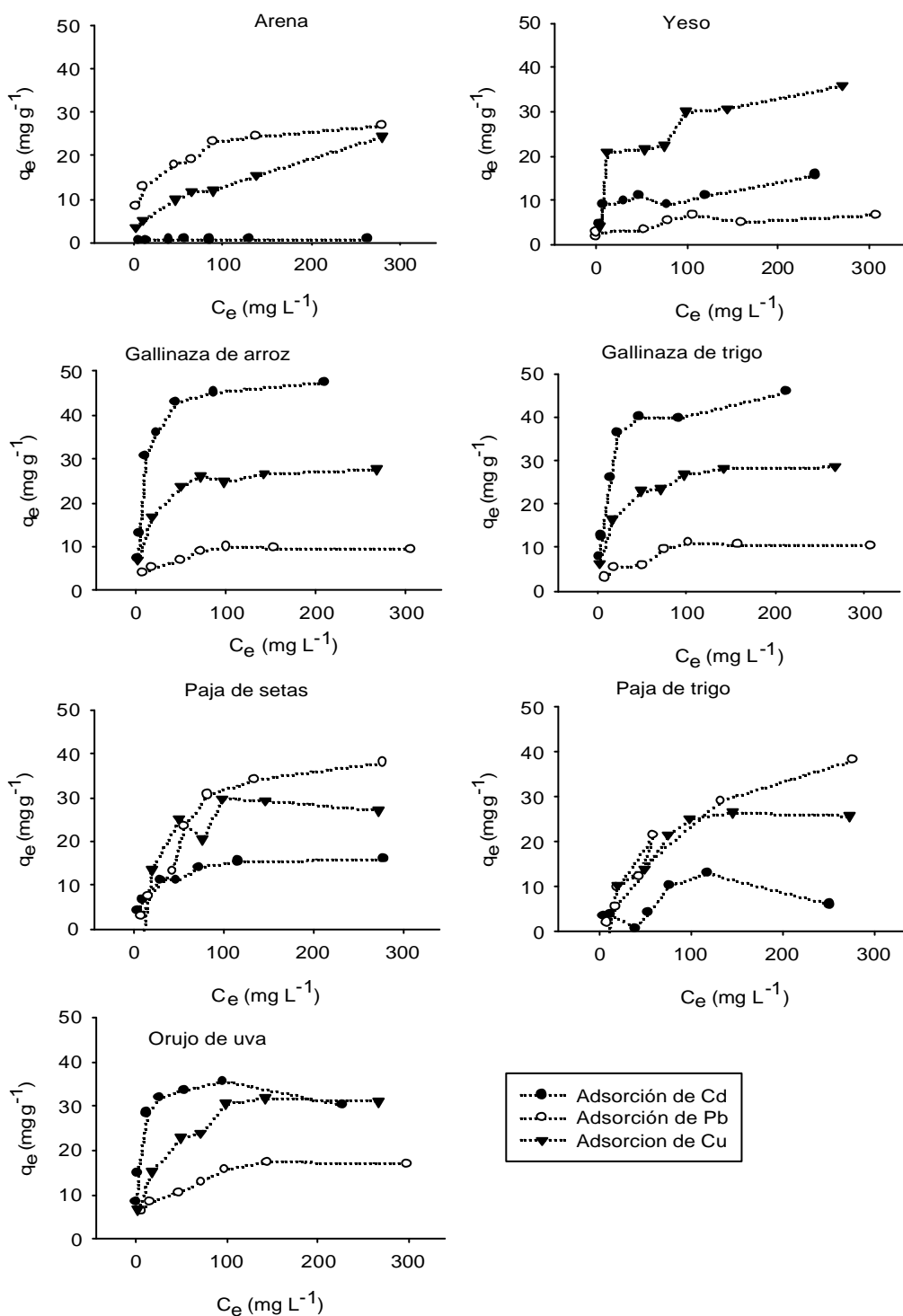
La valoración potenciométrica se llevó a cabo sobre el material CAC<sub>a</sub> estabilizado a pH 4,5, con el fin de mantener protonados los grupos funcionales. Para realizar la valoración potenciométrica se siguió el método descrito por Chen y col. (2005). Se partió de una suspensión del material en agua ultrapura, en relación 20 g L<sup>-1</sup> con un volumen final de 25 mL. Se adicionó diferentes volúmenes de NaOH 1M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M a cada envase y se dejó tapado agitando durante 24 horas a 25°C en incubadora (Selecta Rotabit). El intervalo de volúmenes aplicados de ácido o base dependía de la franja de pH en cuestión, desde 0,025 mL, cercanos a puntos de equivalencia, hasta intervalos de 1 mL en las zonas extremas. Después de 24 horas de agitación se estima que se ha alcanzado el equilibrio. Después de ello se midió el pH de la suspensión en el equilibrio (Orion 720A). El ensayo se realizó con tres repeticiones por punto de valoración. Para el tratamiento gráfico se utilizaron los programas Sigmaplot 10.0 y Excel 2003.

### **3.3. Análisis estadístico y generación de gráficos**

Los datos fueron analizados estadísticamente usando el programa SPSS (Statistical Package Social Science / Statistical Product and Service Solutions) v. 13.0. Las medias fueron comparadas usando ANOVA de un factor con el test de Duncan con una significación  $p = 0,05$ , utilizando el error estándar para determinar la variabilidad de las medias. Los gráficos se elaboraron con el programa Sigmaplot 10.0 o con Microsoft Excel XP.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Retención de Cd, Pb y Cu por los componentes primarios de CAC



**Figura 20.** Isothermas de adsorción de Cd, Pb y Cu en los materiales primarios del CAC: Arena, Yeso, Gallinaza de arroz y de trigo, Paja de trigo y de setas y Orujo de uva.

La capacidad de adsorción de Cd, Pb y Cu por parte de los componentes primarios, inorgánicos y orgánicos, del CAC, se midió mediante la construcción de isothermas de adsorción y posterior ajuste a dos modelos matemáticos (Figura 20).

Se puede observar como cada material se comporta de manera distinta frente a los tres metales estudiados. La heterogeneidad de los materiales se expresa en curvas un tanto erráticas. La modelización de éstas curvas nos dará unos parámetros clave para entender la fortaleza de cada retención. En la Tabla 9 se muestran los índices de correlación de los dos modelos matemáticos para cada una de las curvas.

**Tabla 9.** Índices de correlación del ajuste de dos modelos matemáticos a la adsorción de Cd, Pb y Cu sobre diferentes materiales. Nivel de confianza 0,5. n =4 valores con \* ajuste no significativo. Arena (A), Yeso (Y), Paja de setas (PS), Paja de trigo (PT), Gallinaza de trigo (GT), Gallinaza de arroz (GA) y Orujo de uva (OU)

	Cd		Pb		Cu	
	Langmuir	Freundlich	Langmuir	Freundlich	Langmuir	Freundlich
A	0,826	0,838	0,940	0,988	0,956	0,990
Y	0,780*	0,861	0,641*	0,891	0,898	0,916
PS	0,982	0,980	0,947	0,932	0,897	0,799
PT	0,542*	0,516*	0,97	0,971	0,945	0,876
GT	0,986	0,932	0,935	0,876	0,980	0,956
GA	0,996	0,920	0,956	0,901	0,980	0,949
OU	0,986	0,939	0,923	0,951	0,963	0,949

El modelo de Langmuir describe el proceso de adsorción de Cd, Pb y Cu mejor que el de Freundlich, cuando se trata de los componentes orgánicos estudiados. Si estudiamos los materiales inorgánicos, arena y yeso, observamos que el modelo de Freundlich consigue un mejor ajuste. De hecho el modelo de Langmuir no ofrece un ajuste significativo para la adsorción de Cd y Pb sobre yeso. Estos datos indican que pueden existir mecanismos de adsorción de metales distintos para los componentes orgánicos e inorgánicos del CAC. Mientras que las propiedades de adsorción de los componentes orgánicos se deben principalmente a la diversidad en sus grupos reactivos y la formación de complejos, los componentes minerales pueden provocar procesos de



precipitación y de adsorción superficial sobre redes cristalinas. Diversos autores han obtenido resultados similares a los aquí expuestos al investigar las capacidades de retención de metales del yeso y materiales calcáreos inorgánicos (Elkhatib y col., 1991; Illera y col., 2004; Garrido y col., 2005; Chirenje y col., 2006 y Jalali y col., 2007). La mayoría de ellos sugieren que la precipitación del metal como carbonato o sulfato era, probablemente, el proceso responsable de la inmovilización del metal. Por lo tanto, la aparente retención de metales en estos materiales inorgánicos es más un proceso químico que físico.

En la Tabla 10 se muestran los parámetros del modelo de Langmuir,  $q_{max}$  y  $a_L$ . El primero nos indica la cantidad máxima teórica de metal que podría adsorber ese material ( $mg\ g^{-1}$ ), y el segundo, conocido como la constante de adsorción de Langmuir tiene relación con la fortaleza del enlace.

**Tabla 10.** Parámetros del ajuste de Langmuir en las isotermas de adsorción de Cd, Pb y Cu sobre los componentes del CAC.  $n= 4$ ;  $q_{max}$  es la cantidad máxima adsorbida ( $mg\ g^{-1}$ ).  $a_L$  es la constante de adsorción ( $L\ mg^{-1}$ )

	Cd		Pb		Cu	
	$q_{max}$	$a_L$	$q_{max}$	$a_L$	$q_{max}$	$a_L$
A	0,75 ± 0,03	0,49 ± 0,18	25,5 ± 1,8	0,091 ± 0,034	34,4 ± 7,3	0,008 ± 0,003
Y	12,3 ± 1,3	0,20 ± 0,12	7,5 ± 2,5	0,026 ± 0,033	23,2 ± 3,8	0,06 ± 0,04
PS	16,6 ± 1,0	0,07 ± 0,01	51,5 ± 6,8	0,013 ± 0,004	35,1 ± 6,7	0,029 ± 0,012
PT	10,5 ± 5,4	0,03 ± 0,04	55,0 ± 6,5	0,009 ± 0,002	34,9 ± 6,1	0,017 ± 0,008
GT	46,4 ± 2,2	0,11 ± 0,03	12,0 ± 1,2	0,040 ± 0,015	29,4 ± 1,3	0,085 ± 0,023
GA	49,4 ± 1,2	0,14 ± 0,02	10,4 ± 0,6	0,070 ± 0,019	27,9 ± 1,1	0,12 ± 0,03
OU	33,4 ± 1,3	0,69 ± 0,08	17,6 ± 1,5	0,062 ± 0,024	34,3 ± 2,7	0,048 ± 0,017

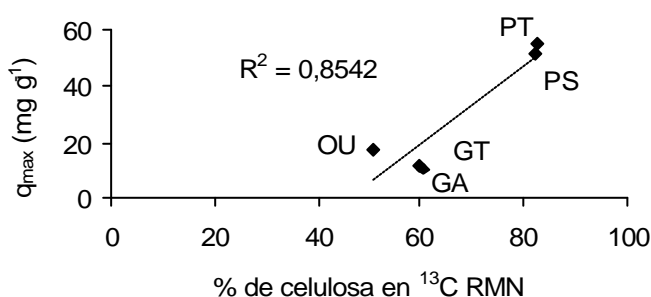
El modelo de Langmuir no consiguió describir la adsorción de Cd y Pb sobre yeso de manera significativa (Tabla 9), por lo tanto los datos expuestos en la Tabla 10 al respecto no ofrecen valor alguno. La adsorción sobre arena si fue descrita bajo este modelo, pero con un índice de correlación bajo. Solo destacar que los procesos de precipitación sobre arenas calizas antes mencionados, se dan con más facilidad en el Cu, luego en el Pb y por último en el Cd. De hecho, según este modelo, la arena del CAC

(la cual constituye la mayor parte mineral del CAC), es la fracción que menos Cd adsorbe. Por el contrario, si consigue retener Pb y Cu en cantidades considerables.

Respecto a los materiales orgánicos, se pueden distinguir dos grupos según su comportamiento. Los materiales PT y PS, ambos formados casi exclusivamente por paja que muestran una gran retención de Pb, menor de Cu y aún menos de Cd, y los materiales GT, GA y OU, cuyas  $q_{\max}$  y  $a_L$  decrecen en el sentido  $Cd > Cu > Pb$ .

La alta afinidad de PT y PS por el Pb puede ser debida a la formación de complejos específicos entre el metal y la celulosa (Zhou y col. 2005). El comportamiento especial del Pb comparado con otros metales divalentes ha sido descrito en la literatura por varios autores. En una revisión bibliográfica, Chuah y col. (2005) comprobaron que el Pb era el metal que más fácilmente se adsorbía sobre cáscara de arroz, material compuesto principalmente por celulosa y derivados. Vinnicius y col. (2008) obtuvieron una  $q_{\max}$  para Pb en celulosa de  $294,1 \text{ mg g}^{-1}$ , considerablemente mayor que la del Cd ( $164 \text{ mg g}^{-1}$ ) y la del Cu ( $123 \text{ mg g}^{-1}$ ).

Para comprobar la relación entre la retención de Pb y el contenido en celulosa se construyó una curva de regresión entre las  $q_{\max}$  obtenidas en los distintos materiales orgánicos, y el porcentaje de celulosa estimado mediante la integración de los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  mostrados en la Figura 15.

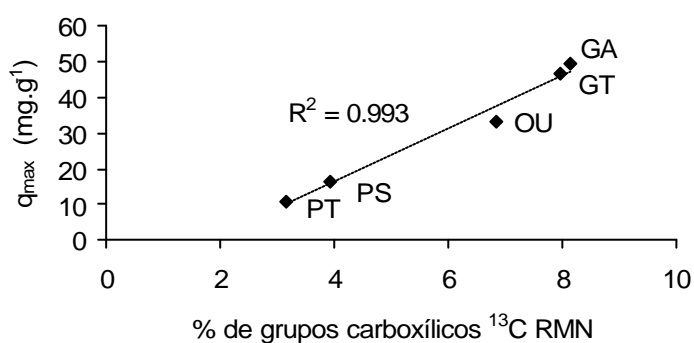


**Figura 21.** Curva de correlación entre el porcentaje de carbono asociado a la celulosa mediante la integración de los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  y la  $q_{\max}$  de Pb obtenida en el modelo de Langmuir ( $P = 0,05$ )

Se observa una alta correlación entre estos dos parámetros, poniendo de manifiesto que la retención de Pb está relacionada con el contenido de celulosa en el material. El hecho de que el índice de correlación no sea mayor probablemente se deba

a que la celulosa no es el único centro de adsorción de Pb. Además, también existe la posibilidad de que los distintos grados de fermentación del material afecten al proceso de retención. Ordieres y Alba (2000) afirman que las propiedades del residuo de cultivo de champiñón como fijador de metales pesados son mayores cuanto más fresco sea el residuo, y que éstas disminuyen al compostarse. Estos autores lo achacan a la modificación de los grupos funcionales de la materia orgánica sufrida durante la fermentación.

Por otro lado, los materiales GT, GA y OU fueron los más eficientes a la hora de adsorber Cd. Los metales pesados, al tener cargas positivas, tienen tendencia a adsorberse en grupos ácidos negativos. De los grupos funcionales observados en los distintos materiales estudiados, los ácidos carboxílicos son los más destacados para la adsorción de Cd. En este sentido se encontró un alto grado de correlación entre el % de grupos carboxílicos obtenidos mediante RMN  $^{13}\text{C}$  de los distintos componentes del CAC y el  $q_{\text{max}}$  del Cd en el modelo de Langmuir (Figura 22).



**Figura 22.** Curva de correlación entre el porcentaje de carbono asociado a grupos carboxílicos (mediante la integración de los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ ) y la  $q_{\text{max}}$  de Cd obtenida en el modelo de Langmuir. ( $P = 0,05$ )

Los resultados de la Figura 22 parecen indicar que los ácidos carboxílicos contenidos en los componentes primarios del CAC, son los principales responsables de la adsorción de Cd, si bien también pueden influir otros grupos funcionales como grupos sulfóxidos o tioles, los cuales no se han llegado a detectar con las técnicas utilizadas. Este hecho concuerda con la literatura existente al respecto, que afirma que

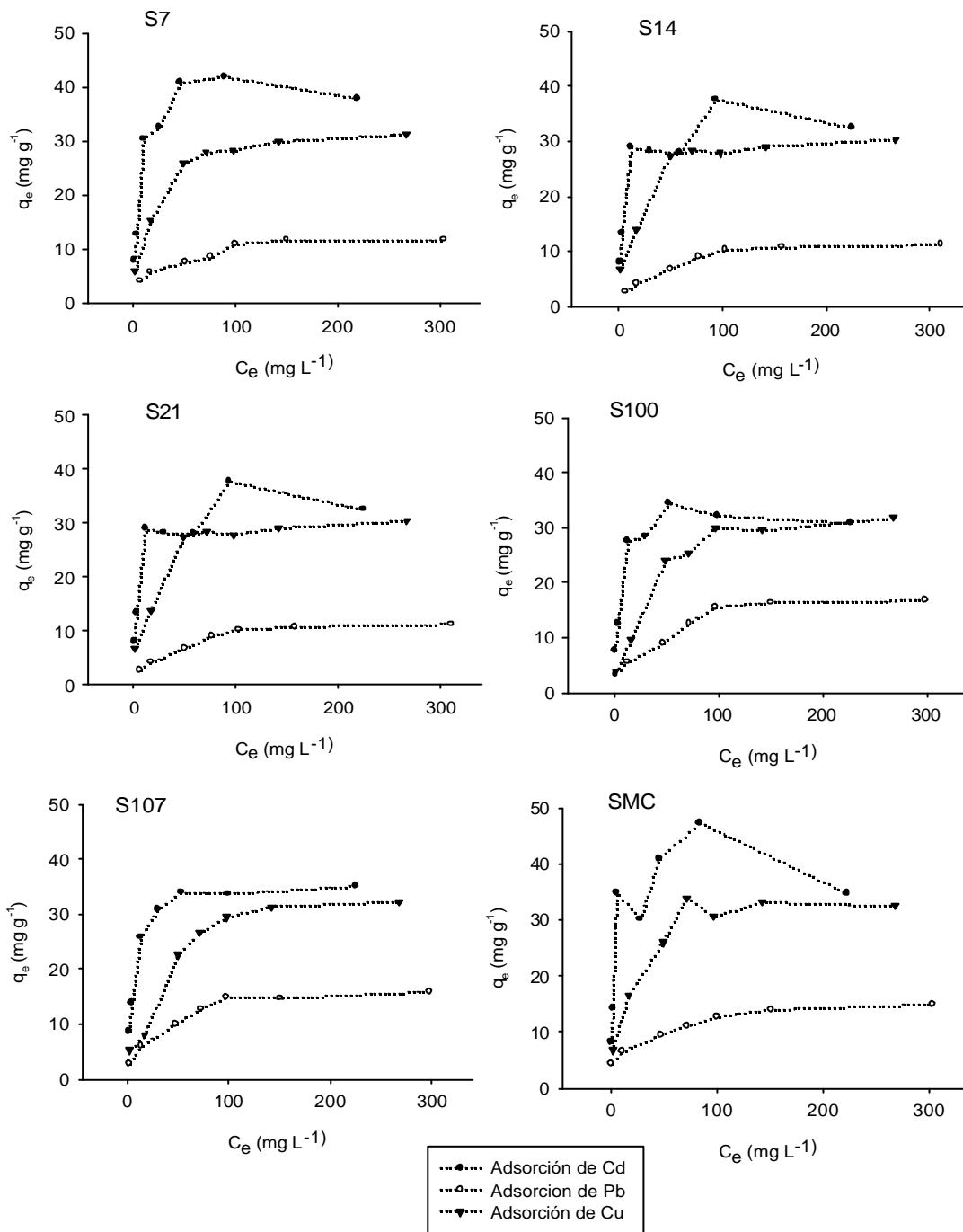
los grupos carboxílicos y tioles constituyen los principales sitios de adsorción en estos materiales (Fourest y Volesky, 1996; Davis y col., 2003).

Con respecto a la adsorción de Cu no se ha observado ningún parámetro que pudiera diferenciar el comportamiento de los diferentes materiales. Todos ellos, incluidos los componentes inorgánicos muestran una considerable capacidad de retención de Cu independientemente de su composición. Esto hace pensar que este metal es capaz de adsorberse en distintos grupos funcionales con relativa facilidad (De La Torre, 1993). Gaballah y Kibertus (1998) sugirieron que la adsorción de Cu en materiales orgánicos heterogéneos tiene lugar bajo varios mecanismos: reacciones superficiales entre las distintas especies de Cu y los ácidos carboxílicos, puentes de hidrógeno entre las especies hidratadas de Cu y la celulosa y la formación de complejos con los grupos hidroxilos de la lignina. Es explicable pues, que todos los materiales orgánicos estudiados aquí ofrezcan isotermas de adsorción de Cu similares, ya que todos ellos contienen una gran variedad de grupos funcionales donde el metal es capaz de adsorberse.

#### **4.2. Retención de Cd, Pb y Cu en CAC en sus diferentes estados de fermentación. Isotermas de adsorción**

En la Figura 23 se muestran las curvas de adsorción de Cd, Pb y Cu sobre el CAC y también, de las muestras tomadas en varios estados de fermentación. Se puede observar cierta variabilidad que dificulta la interpretación de los datos. Aunque el diseño experimental incluía una molienda y un tamizado de las muestras a 0.2 mm, se podía distinguir a simple vista diferentes fracciones como paja no descompuesta y pepitas de uva. Esto puede conducir a ciertos errores en la obtención de datos experimentales. Aún así, los resultados se ajustaron a los dos modelos matemáticos anteriormente expuestos, Langmuir y Freundlich, para observar su tendencia.

En la Tabla 11 se muestran los coeficientes de correlación de los ajustes a los modelos de Langmuir y de Freundlich.



**Figura 23.** Isotermas de adsorción de Cd, Pb y Cu sobre CAC y sobre sus diferentes estados de fermentación.

**Tabla 11.** Índices de correlación del ajuste de dos modelos matemáticos a la adsorción de Cd, Pb y Cu sobre CAC en diferentes estados de fermentación. Nivel de confianza 0,5. n = 4.

	Cd		Pb		Cu	
	Langmuir	Freundlich	Langmuir	Freundlich	Langmuir	Freundlich
S 7	0,971	0,871	0,950	0,953	0,986	0,952
S14	0,949	0,882	0,987	0,951	0,966	0,926
S21	0,988	0,888	0,996	0,965	0,984	0,941
S100	0,973	0,955	0,960	0,954	0,985	0,943
S107	0,990	0,919	0,977	0,963	0,975	0,939
CAC	0,903	0,799	0,882	0,983	0,966	0,922

Aunque ambos modelos describen aceptablemente la adsorción de Cd, Pb y Cu sobre los materiales estudiados, se puede observar que el modelo de Langmuir ofrece siempre un coeficiente de correlación más elevado que el de Freundlich. Anteriormente se había comprobado que el modelo de Langmuir se ajustaba mejor a los procesos de adsorción de metales en los componentes orgánicos del CAC mientras que el de Freundlich lo hacía en los componentes inorgánicos. El hecho de que el proceso de adsorción de metales del CAC en sus diferentes estados de fermentación se describa mejor con el modelo de Langmuir hace pensar que tal proceso está gobernado principalmente por la fracción orgánica. Esto concuerda con los datos obtenidos en la Tabla 10, donde el Cd es mucho más retenido por los componentes orgánicos que por los inorgánicos. En dicha tabla también se observa que la arena tiene alta capacidad de retener Pb y Cu, sin embargo debido a que la fracción mineral del CAC es minoritaria, cabe pensar que la retención de metales debida a ella sea también mínima.

Según los valores de la Tabla 12, aunque la composición del CAC a lo largo de la fermentación varía sensiblemente (Figuras 16 y 17), los parámetros del modelo de Langmuir no lo hacen en la misma medida. Así, en cada metal, se observan diferencias entre las diversas muestras, en general, relativamente pequeñas y no indican una tendencia evolutiva clara.

**Tabla 12.** Parámetros del ajuste de Langmuir en las isotermas de adsorción de Cd, Pb y Cu sobre CAC y sus estados de fermentación. n= 4; Letras diferentes representan diferencias significativas entre muestras, P= 0,05 referente a test de Duncan.  $q_{max}$  es la cantidad máxima adsorbida ( $mg\ g^{-1}$ ),  $a_L$  es la constante de adsorción ( $L\ mg^{-1}$ )

	Cd		Pb		Cu	
	$q_{max}$	$a_L$	$q_{max}$	$a_L$	$q_{max}$	$a_L$
S7	42,4 <sup>a</sup>	0,18 <sup>b</sup>	12,4 <sup>cb</sup>	0,049 <sup>a</sup>	33,4 <sup>a</sup>	0,063 <sup>a</sup>
S14	33,7 <sup>c</sup>	0,30 <sup>a</sup>	12,8 <sup>cb</sup>	0,030 <sup>a</sup>	32,9 <sup>a</sup>	0,065 <sup>a</sup>
S21	34,9 <sup>bc</sup>	0,32 <sup>a</sup>	20,6 <sup>a</sup>	0,019 <sup>b</sup>	35,6 <sup>a</sup>	0,044 <sup>ab</sup>
S100	33,9 <sup>c</sup>	0,23 <sup>ab</sup>	19,7 <sup>ab</sup>	0,026 <sup>ab</sup>	37,0 <sup>a</sup>	0,031 <sup>ab</sup>
S107	36,0 <sup>b</sup>	0,38 <sup>a</sup>	17,4 <sup>b</sup>	0,032 <sup>a</sup>	39,3 <sup>a</sup>	0,026 <sup>b</sup>
CAC	40,4 <sup>a</sup>	0,47 <sup>a</sup>	15,2 <sup>bc</sup>	0,052 <sup>a</sup>	36,2 <sup>a</sup>	0,065 <sup>a</sup>

El valor de  $q_{max}$  y  $a_L$  teórico para la absorción de Cd por CAC, calculado a partir de la suma proporcional de las variables de los componentes primarios (según las cantidades expresadas en el esquema de la Figura 5 y los valores de la Tabla 10), es  $18.9\ mg\ L^{-1}$  y  $0,16\ L\ mg^{-1}$ . Sin embargo, los valores experimentales obtenidos son mucho más elevados (Tabla 12.), dentro del intervalo mostrado por OU, GA y GT. Esto sugiere que la adsorción de Cd en CAC está fuertemente influenciada por estos componentes. Además, la proporción de grupos carboxílicos en OU, GA, GT, es semejante a la mostrada por CAC, hecho que corrobora la gran importancia de estos grupos en la retención de Cd.

Aunque la fracción de carbohidratos es mayoritaria en el CAC, la adsorción de Pb (anteriormente asociada al gran contenido en celulosa de la paja) ha resultado ser bastante más baja que la mostrada por PT. En un principio se podría esperar que el proceso de fermentación alterara gradualmente las propiedades de la celulosa para retener Pb, sin embargo, se puede deducir que dicha alteración ha sido drástica. El material S7, con solo una semana de fermentación y compuesto básicamente por carbohidratos, muestra una capacidad máxima de retención mucho más baja que la PT, material inicial ( $12\ mg\ g^{-1}$  para el S7 frente a  $55\ mg\ g^{-1}$  para PT). Esto sugiere que la fermentación afecta de manera decisiva a la formación de complejos entre la celulosa

y el Pb, y que en los primeros días de compostaje ocurren la mayoría de las reacciones que rebajan dicha retención (Ordieres y Alba, 2000).

Con respecto al Cu, no se observaron diferencias significativas entre la mayoría de los materiales estudiados. Con anterioridad se mencionó la alta afinidad de Cu para formar diversos tipos de enlace con una gran variedad de grupos orgánicos, tales como la celulosa, ácidos carboxílicos, alcoholes, fenoles y tioles. La capacidad de retención de Cu por materiales compostados con alta cantidad de celulosa y derivados está descrita por Wong y col. (2003), quienes encontraron una  $q_{\max}$  para Cu sobre cascarilla de arroz de  $29 \text{ mg g}^{-1}$  (Tabla 10), dato muy parecido al mostrado por el PT y no muy alejado al mostrado por el CAC en sus diferentes estados de fermentación (Tabla 12).

Por otro lado, la afinidad del Cu por grupos carboxílicos y fenólicos en materiales orgánicos fue descrita por Town y col. (1993). Aunque el CAC contiene concentraciones significativas de estos grupos, provenientes principalmente de OU, GT y GA, la literatura muestra casos en los que la aplicación de estos componentes moviliza Cu (Kingery y col., 1994; Nachtigall y col., 2007) y otros, en los que el Cu es retenido (Codling y col., 2008; Hanc y col., 2008). Estos autores indican que el tipo de suelo donde se aplique la enmienda es crucial para que se produzca un proceso u otro. También apuntan a la importancia de la concentración de carbono orgánico soluble, ya que el Cu es capaz de formar complejos solubles con ácidos fúlvicos (Stevenson, 1994).

### **4.3. Efecto del pH en la adsorción de Cd, Pb y Cu en CAC**

El pH tiene una gran importancia en los procesos de retención y movilización de metales pesados. Los cambios de pH suponen toda una serie de reacciones fisicoquímicas que están ocurriendo en el sistema. Por tanto, es una de las variables que más se han usado para caracterizar los suelos. Por ello, en este ensayo se planteó la variación del pH del CAC, simulando condiciones ácidas, neutras y básicas, para investigar su efecto en la retención de Cd, Pb y Cu.

Se construyeron isotermas de adsorción de Cd, Pb y Cu sobre el CAC en tres estados diferentes de protonación.

- CAC ácido ( $\text{CAC}_a$ ), lavado con ácido clorhídrico seguido de agua destilada, consiguiendo así que la mayor parte de los grupos reactivos se encuentren protonados. El resultado es un CAC con un pH en agua (relación 1:5 v/v) de 4,5.



- CAC neutro (CAC), se trata del CAC ya estudiado sin ninguna alteración, con un pH de 7,3.
- CAC básico (CAC<sub>b</sub>), lavado con NaOH y agua destilada, consiguiendo que los grupos reactivos se encontraran ionizados negativamente. El resultado fue un CAC con pH de 8,3.

Las isotermas se ajustaron al modelo de Langmuir ya que era el que mejor describía su comportamiento. En la Tabla 13 se muestran los parámetros del ajuste.

**Tabla 13.** Valores de los parámetros del ajuste de Langmuir a las isotermas de adsorción de Cd, Pb y Cu sobre CAC en diferentes pH. Letras diferentes representan diferencias significativas entre pH, P = 0,05, n = 4. Test de Duncan.

pH	Cd		Pb		Cu	
	$q_{max}$	$a_L$	$q_{max}$	$a_L$	$q_{max}$	$a_L$
4.5	32.8 <sup>c</sup>	0.16 <sup>b</sup>	11.4 <sup>c</sup>	0.087 <sup>a</sup>	27.7 <sup>b</sup>	0.051 <sup>b</sup>
7.3	40.4 <sup>b</sup>	0.47 <sup>b</sup>	15.2 <sup>b</sup>	0.052 <sup>a</sup>	36.2 <sup>a</sup>	0.065 <sup>ab</sup>
8.3	49.8 <sup>a</sup>	2.38 <sup>a</sup>	20.0 <sup>a</sup>	0.093 <sup>a</sup>	41.4 <sup>a</sup>	0.099 <sup>a</sup>

Se observa que un aumento del pH aumenta de forma marcada la capacidad de retención de los tres metales. No sólo aumenta la capacidad máxima de adsorción ( $q_{max}$ ), sino que también lo hace la constante de adsorción, lo que indica que la retención se hace también más fuerte a medida que se aumenta el pH.

En los procesos de adsorción, el pH afecta tanto a la estructura iónica del CAC como a la especiación química de los metales. A valores bajos de pH la superficie de adsorción está mayoritariamente rodeada por iones hidronio. Éstos generan una fuerza electrostática que tiende a repeler el acercamiento de cationes o metales (Baker y col., 2005). Al aumentar el pH, los iones OH<sup>-</sup> van neutralizando gradualmente la acidez formando agua y dejando la superficie con una red cargada negativamente que puede adsorber metales. Los grupos como ácidos carboxílicos (COOH), fenoles (Ar-OH), alcoholes (C-OH) o aminas (C-NH<sub>2</sub>) se ionizarían formando COO<sup>-</sup>, Ar-O<sup>-</sup>, C-O<sup>-</sup> y C-NH<sup>-</sup> respectivamente, creando condiciones favorables para la adsorción (Aiguo y col., 1999; Tatiana y col., 2002).

Por otro lado, al incrementar el pH, los metales cargados positivamente tienden a hidroxilarse, es decir a rodearse de iones OH<sup>-</sup>, incluso llegando a formar complejos a veces insolubles. Esto, generalmente dificulta la adsorción, ya que aumentaría el impedimento estérico debido al mayor volumen de los complejos hidroxilados (Stevenson, 1994). Así se pasaría de Cd<sup>2+</sup> a Cd(OH)<sup>+</sup>, de Pb<sup>2+</sup> a Pb(OH)<sup>+</sup> y de Cu<sup>2+</sup> a Cu(OH)<sup>+</sup>. Estos complejos empiezan a ser mayoritarios a partir de pH 10.1, 7.7 y 7.7 respectivamente (Lindsay, 1979). En las condiciones de este ensayo, el Cd estaría mayoritariamente en forma de ión libre, mientras que el Pb y el Cu formarían complejos o precipitados en el CAC<sub>b</sub>. Esto podría ser una explicación de por qué el Cd presenta un mayor incremento en su constante de adsorción en comparación con los otros dos metales.

En determinadas condiciones básicas también se podrían formar complejos hidroxilados insolubles que, de alguna forma, aumentarían la retención del metal, aunque no por procesos de adsorción sino por precipitación.

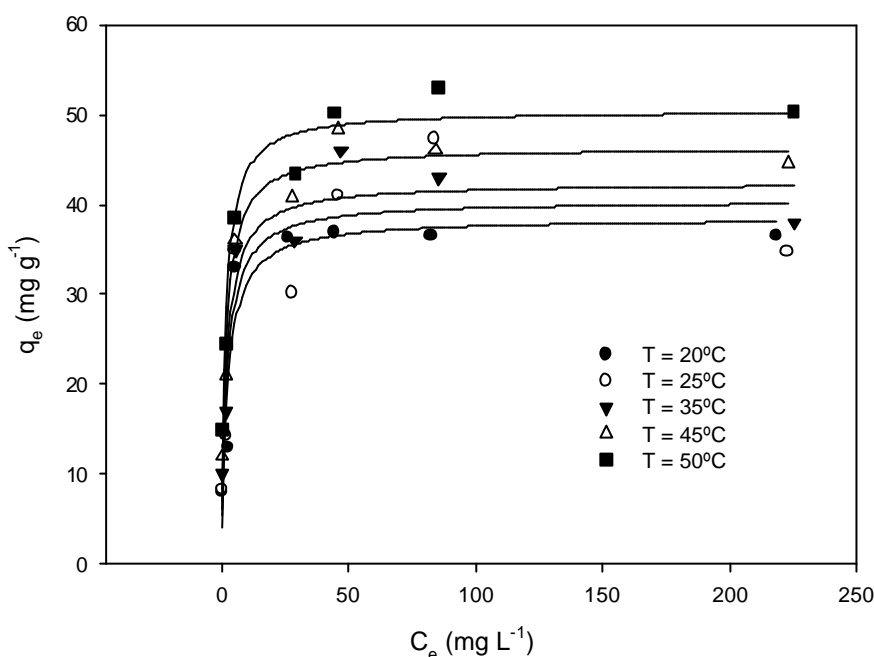
Así pues el resultado final del aumento de pH es consecuencia de al menos dos efectos que generalmente dirigen la adsorción en sentidos contrarios, uno respecto a la superficie de adsorción y el otro, respecto a la especiación química del metal. El hecho de que la adsorción aumente con el pH nos indica que probablemente el primero de ellos sea el predominante.

#### **4.4. Efecto de la temperatura sobre la adsorción de Cd en CAC**

Para observar el efecto de la temperatura en la adsorción de metales sobre CAC, se escogió el Cd como metal indicador. De los tres estudiados en este capítulo, se le considera el más tóxico y el más móvil. Además, la literatura muestra que generalmente el comportamiento termodinámico de la adsorción de metales sigue la misma tendencia para todos ellos (Sart y Tuzen, 2008; Benguella y Benaissa, 2002).

Dentro de los procesos de adsorción se engloban varios mecanismos tanto físicos como químicos. El estudio termodinámico nos da información sobre el carácter químico o físico de la adsorción, aspecto muy importante ya que nos permite aclarar el tipo de procesos envueltos, tales como formación de complejos o la existencia de atracciones electroestáticas.

Para ello se realizaron isotermas de adsorción de Cd sobre CAC a 5 temperaturas distintas. Se ajustaron al modelo de Langmuir (Figura 24) ya que hasta ahora es el que mejor describe el proceso, y se calcularon los parámetros termodinámicos a partir de los valores del ajuste (Tabla 14).



**Figura 24.** Isotermas de adsorción de Cd sobre CAC a diferentes temperaturas. Ajuste al modelo de Langmuir.

**Tabla 14.** Parámetros del modelo de Langmuir ajustado a la adsorción de Cd sobre CAC a diferentes temperaturas. Letras diferentes representan diferencias significativas entre temperaturas,  $P = 0,05$ ,  $n = 4$ . Test de Duncan.

	T = 20°C	T = 25°C	T = 35°C	T = 45°C	T = 50°C
$q_{\max}$ (mg g <sup>-1</sup> )	38.5 <sup>d</sup>	40.4 <sup>cd</sup>	42.4 <sup>bc</sup>	46.4 <sup>ab</sup>	50.5 <sup>a</sup>
$a_L$ (L mg <sup>-1</sup> )	0.42 <sup>b</sup>	0.47 <sup>b</sup>	0.51 <sup>ab</sup>	0.56 <sup>a</sup>	0.64 <sup>a</sup>

Aunque la diferencia en la adsorción máxima entre dos temperaturas consecutivas no es significativa, se puede observar una tendencia a incrementar la adsorción según se aumenta la temperatura.

Normalmente, si la adsorción decrece con el aumento de la temperatura, se asume que se está ante un proceso de fisorción, mientras que si es al contrario, es la quimisorción la que gobierna el proceso (Levine, 1996). No obstante hay autores que opinan que esto sólo es cierto en sistemas ideales, y que en condiciones reales puede o no coincidir (Celik y col., 1991).

En cualquier caso, el estudio de la entalpía de adsorción ( $\Delta H_{ads}$ ), la entropía de adsorción ( $\Delta S_{ads}$ ) y la energía libre de Gibbs del proceso ( $\Delta G_{ads}$ ), puede ayudar a diferenciar el tipo de adsorción (Kara y col., 2003).

Para calcular estos parámetros termodinámicos podemos usar la constante de adsorción obtenida mediante el ajuste de Langmuir y las ecuaciones básicas de la termodinámica (Kayode et al., 2008).

$$\Delta G_{ads} = -RT \ln K$$

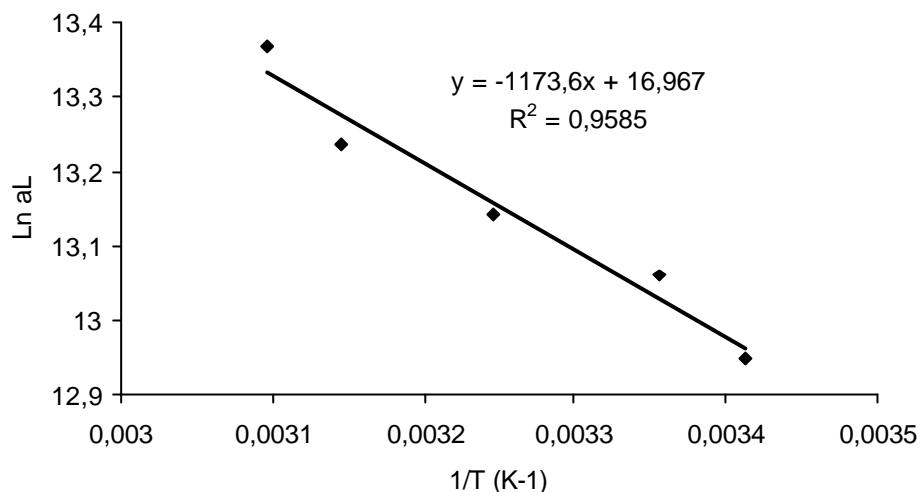
$$\Delta G_{ads} = \Delta H_{ads} - T\Delta S_{ads}$$

De la combinación de ambas se establece que:

$$\ln K = \frac{\Delta S_{ads}}{R} - \frac{\Delta H_{ads}}{RT}$$

Donde  $R$  es la constante universal de los gases ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  es la temperatura (K) y  $K$  es la constante de adsorción (adimensional), la cual está relacionada con la constante de adsorción de Langmuir.  $a_L \cdot 10^6 \text{ (L mg}^{-1}) = K$  (adimensional) (Slobodan, 2007). Si representamos  $\ln K$  frente a  $1/T$  obtendremos una recta con pendiente  $-\Delta H_{ads}/R$  y con intersección en  $\Delta S_{ads}/R$  (Figura 25).

Para la adsorción de Cd sobre CAC  $\Delta H_{ads} = 9,75 \text{ KJ mol}^{-1}$  y  $\Delta S_{ads} = 0,14 \text{ KJ mol}^{-1}$ . Se trata pues de un proceso endotérmico. Hay varias referencias bibliográficas que asocian los procesos de fisorción a valores de entalpía bajos, y de quimisorción a valores altos. Sin embargo, los límites no están claros. Smith (1981) establece la fisorción entre  $2,1$  y  $20,9 \text{ KJ mol}^{-1}$ , y la quimisorción entre  $20,9$  y  $418,4 \text{ KJ mol}^{-1}$ . Levine (1996) los fija entre  $4-40 \text{ KJ mol}^{-1}$  y  $40-400 \text{ KJ mol}^{-1}$ , respectivamente. Baker y Khalili (2004) fijan el límite máximo para la fisorción en  $42 \text{ KJ mol}^{-1}$ . Es obvio pues, que nos encontramos ante un proceso gobernado mayoritariamente por la adsorción física, controlado seguramente por atracciones electrostáticas entre los diferentes grupos funcionales del CAC y la carga positiva del metal.



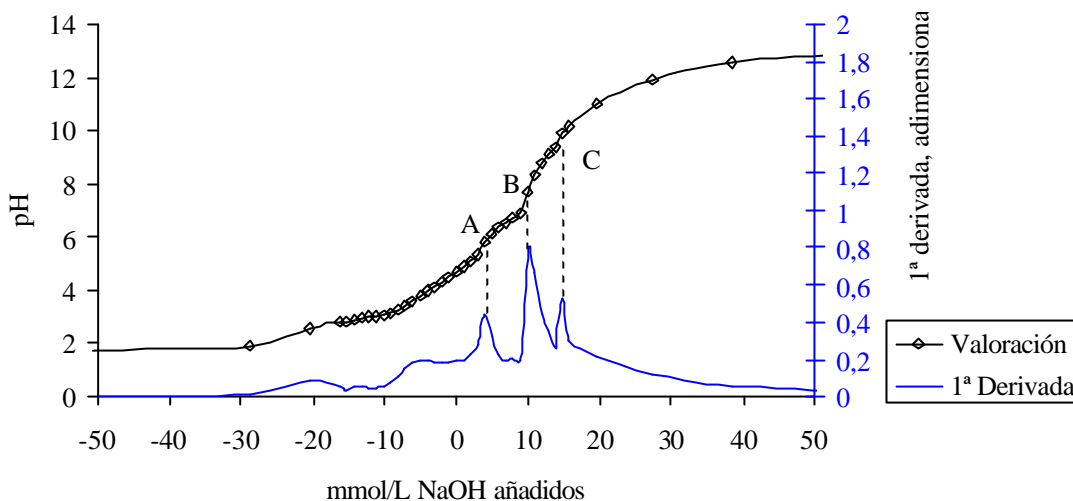
**Figura 25.** Representación gráfica y ajuste de la ecuación termodinámica para obtener los valores de  $\Delta H_{ads}$  y  $\Delta S_{ads}$  en el proceso de adsorción de Cd sobre CAC.

El valor de  $\Delta G_{ads}$  calculado a 20 °C, 25 °C, 35 °C, 45 °C y 50 °C es -31,6; -32,3; -33,7; -35,1 y -35,8 KJ mol<sup>-1</sup>. El carácter negativo de la energía libre de Gibbs indica que es un proceso espontáneo tendiendo a darse con mayor facilidad cuanto mayor es la temperatura. *A priori* puede parecer una contradicción que un proceso endotérmico sea al mismo tiempo espontáneo. Sin embargo, en la naturaleza existen numerosos casos en los que se dan estas dos condiciones simultáneamente (por ejemplo la evaporación del agua). Esto quiere decir que la condición de espontaneidad no solo depende de la entalpía, sino también de la entropía (medida del desorden del sistema) (Xiong y Yao, 2009). De alguna forma, los procesos de adsorción estudiados, aumentan el desorden del sistema, compensando el hecho de ser procesos endotérmicos.

#### 4.5. Estudio de los sitios de adsorción del CAC mediante valoración potenciométrica

En la Figura 26 se muestra la curva de valoración potenciométrica del CAC en estado protonado, es decir el CAC lavado con ácido (apartado V.3.1.2), para conseguir que todos sus grupos funcionales estén neutralizados por los iones hidronio. El pH de este CAC es 4,5. De este modo evitamos interferencias con la adsorción de otro tipo de iones que no sean ni protones ni hidroxilos. Al ir añadiendo iones hidroxilos, vamos

neutralizando los iones hidronio y el pH va cambiando. La forma en que cambia está muy relacionada con el tipo de grupo funcional que retiene el ión hidronio.



**Figura 26.** Curva de valoración potenciométrica del CAC y su primera derivada. Las letras A, B y C representan los principales puntos de inflexión.

Se puede observar tres puntos donde la pendiente de la curva cambia apreciablemente (puntos A, B y C), que corresponden a tres grupos funcionales que se están ionizando. Para determinar esos puntos de inflexión con exactitud se construyó la primera derivada. Se encontró que el punto A tenía un  $pK_H$  de  $5,3 \pm 0,5$ ; el punto B,  $7,7 \pm 0,3$  y el punto C de  $9,9 \pm 0,6$  ( $a = 0,5$ ).

La correspondencia entre los valores obtenidos y los diferentes grupos funcionales del CAC no es fácil, ya que cada grupo reactivo está rodeado de un entorno electrostático muy complejo, lo que hace que sus propiedades ácido/base varíen significativamente de la ideal. Aún así, el punto A parece corresponderse bastante bien con los grupos carboxílicos, ya que la mayoría de éstos presentan un  $pK_a$  entre 3,5 y 5 (Yun y col., 2001). El espectro de RMN  $^{13}C$  realizado anteriormente también nos indicaba la presencia de éstos grupos en el CAC y en alguno de sus componentes. Y también se había comprobado su papel crucial en la adsorción de Cd. La correspondencia del punto B no está tan clara. Existen numerosos grupos funcionales con un  $pK_a$  en ese rango. Según Chen y col., (2005) podría deberse a los grupos fosfato; desgraciadamente los espectros de RMN e infrarrojos son demasiado complejos como

para poder identificar con exactitud estos grupos. El punto C cae dentro del intervalo de los fenoles y tioles, los cuales se encuentran entre valores de  $pK_a$  de 9,5-10,5. Los fenoles han sido identificados mediante RMN anteriormente tanto en el CAC como en varios de sus componentes (capítulo IV).

## 5. CONCLUSIONES

- El CAC muestra una elevada capacidad de retención de Cd, Cu y Pb (en este orden de preferencia). Generalmente, la fracción orgánica del CAC muestra mejores propiedades de adsorción que la fracción inorgánica.
- El Pb parece adsorberse preferentemente sobre las moléculas de hidratos de carbono contenidas en la celulosa y derivados. Debido a que la paja de trigo (material mayoritario en la elaboración de CAC) está formada principalmente por celulosa, presenta una elevada capacidad de retención de Pb. Sin embargo, durante los procesos de fermentación propios de la elaboración del CAC, esta capacidad disminuye, posiblemente debido a la degradación de las moléculas de celulosa. Por lo que el material final, CAC, presenta menor capacidad de retención de Pb que la paja de trigo utilizada como material inicial.
- Las moléculas con grupos carboxílicos presentes en el CAC (provenientes mayoritariamente del orujo de uva y de las gallinazas), son las principales responsables de la adsorción de Cd. De hecho se encontró un alto grado de correlación ( $R^2 = 0,993$ ) entre la capacidad máxima de adsorción de Cd y el contenido de C asociado a grupos carboxílicos de los diferentes materiales iniciales que componen el CAC.
- El Cu es adsorbido de manera similar en casi todos los materiales iniciales del CAC, siendo capaz de inmovilizarse en presencia de una gran variedad de grupos funcionales.
- El incremento de pH y temperatura favorecen significativamente el proceso de adsorción de los tres metales estudiados, siendo éste endotérmico y espontáneo.
- Aunque los ensayos discutidos en este capítulo han sido llevados a cabo en condiciones de laboratorio, nos indican que el CAC presenta un potencial para ser utilizado en la fijación de Cd, Pb y Cu al aplicarlo como enmienda orgánica a un suelo contaminado con metales pesados.





## **VI. ENSAYOS DE DESORCIÓN DE Cd EN CAC**

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	84
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	86
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	87
3.1. Extracción secuencial de metales. Método Tessier .....	87
3.2. Curvas de desorción de Cd en CAC extraído con agua. Ensayos de agitación... 87	
3.3. Evaluación de la disponibilidad de Cd en CAC contaminado artificialmente mediante la utilización de ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Ensayo de agitación.....	88
3.4. Ensayo de columnas de lixiviación.....	89
3.5. Análisis estadístico y generación de gráficos .....	91
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	92
4.1. Fraccionamiento Tessier de Cd en CAC contaminado artificialmente .....	92
4.2. Curvas de desorción de Cd en CAC extraído con agua. Ensayo de agitación.....	93
4.3. Evaluación de la disponibilidad de Cd en CAC contaminado artificialmente mediante la utilización de ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Ensayo de agitación.....	95
4.4. Evaluación de los lixiviados de Cd en CAC contaminado artificialmente. Uso de columnas de lixiviación.....	96
4.4.1. pH de los lixiviados .....	96
4.4.2. Conductividad eléctrica y cationes en lixiviados.....	98
4.4.3. Evaluación de la lixiviación de Cd .....	100
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	103

## VI. ENSAYOS DE DESORCIÓN DE Cd EN CAC

### 1. INTRODUCCIÓN

Hasta ahora se han estudiado las propiedades fisicoquímicas del CAC, y su potencial inmovilizador de metales pesados. Este es un aspecto importante si queremos dirigir su reutilización hacia la adsorción de los metales que contaminan un suelo o sus lixiviados. Pero también es importante conocer de qué manera el CAC podría liberar esos metales. Por ello en este capítulo se muestran los resultados de una serie de ensayos dirigidos hacia este fin (ensayos que simulan situaciones agronómicas que podrían forzar la liberación de los metales retenidos). Así, en primer lugar se contaminó artificialmente el CAC con Cd (80 y 200 mg kg<sup>-1</sup>, dependiendo del ensayo) y se le puso en contacto con disoluciones nutritivas, agentes quelantes y ácidos orgánicos. Se ha escogido el Cd como metal pesado ya que está considerado como uno de los más tóxicos y más móviles en suelo y planta (McLaughlin y Singh, 1999).

La liberación de los metales retenidos en un sustrato depende principalmente del tipo de enlace que mantengan. Si el enlace es débil, debido a intercambios catiónicos, o formando parte de sales solubles, la liberación será rápida. Sin embargo, el metal también puede estar adsorbido sobre superficies inorgánicas, unido a diferentes grupos orgánicos o formando parte de minerales. En estos casos la liberación se dificulta considerablemente. Los métodos de extracción secuencial consiguen separar el metal dependiendo de la fortaleza de enlace. Estos datos nos pueden dar información valiosa sobre el tipo de condiciones necesarias para liberar cierta cantidad de metal.

Entre los métodos extractivos secuenciales de metales pesados, el desarrollado por Tessier en 1979 es uno de los más usados. Consigue separar el metal en 5 fracciones dependiendo del agente extractante utilizado: I, fracción intercambiable, II, fracción soluble asociada a carbonatos, III, asociada a óxidos de Fe y Mn, IV, asociada a materia

orgánica y V, fracción residual. Generalmente se presupone que la fracción biodisponible corresponde a la primera o en algunos casos a la suma de la primera y la segunda.

Sin embargo esta extracción tiende a generalizar y no siempre es capaz de explicar los diferentes enlaces que pueden formar los metales en el suelo. Por ejemplo no tiene en cuenta la interacción con determinados ácidos orgánicos, compuestos casi siempre presentes en los suelos.

Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular (LMWOA) presentes en suelos y sustratos, juegan un papel fundamental en la nutrición de las plantas, así como en los procesos de detoxificación de metales pesados. Frecuentemente forman complejos menos tóxicos que los metales en forma libre (Hall, 2002). Se sabe que los exudados de las raíces de determinadas especies segregan éste tipo de ácidos en respuesta a la presencia de Cd (Chiang y col. 2006; Cieslinski y col. 1998). Y también, que en el suelo y en la rizosfera existen microorganismos que son capaces de alterar la biodisponibilidad de metales pesados, exudando diferentes LMWOA (Gadd, 2000). Así pues, parece obvio que la biodisponibilidad de un metal en suelos y sustratos no depende únicamente del agua. En la rizosfera existen varios ácidos orgánicos y sales que pueden solubilizar el metal de fracciones, en un principio más estables, que el agua no puede extraer.

Por ello en este capítulo se someterá al CAC contaminado con Cd a un análisis secuencial Tessier, a interacción con diferentes volúmenes de agua y con diversos ácidos orgánicos. También se comprobará el efecto de una disolución nutritiva estándar sobre la liberación de Cd para simular una fertilización externa.

Uno de los principales problemas de los suelos contaminados con metales pesados es la dispersión de la contaminación mediante procesos de escorrentía y lixiviación. Los metales pueden llegar de este modo a acuíferos y a ríos, provocando desequilibrios en el ecosistema de zonas muy alejadas. Además esos lixiviados aportan una fracción biodisponible importante de metales pesados, los cuales serán tomados por plantas y microorganismos, entrando así en la cadena trófica.

Para apoyar y ampliar la información obtenida en estos estudios se planteó también un ensayo de columnas de lixiviación. Este tipo de diseños experimentales consiguen representar más fielmente las condiciones agrarias que los ensayos de agitación, tanto en cuanto a volúmenes de riego, tiempos de contacto y fortaleza de la

interacción. En este tipo de ensayos no se realiza una extracción, sino que se recogen los lixiviados producidos, al igual que podría producirse en una situación real. No debemos olvidar que la reducción de la contaminación en los lixiviados es uno de los principales objetivos en las técnicas de recuperación de suelos contaminados.

## **2. OBJETIVOS**

Uno de los objetivos de esta tesis es utilizar el CAC como material capaz de retener metales pesados. Pero esta retención no siempre es permanente, ya que en determinadas condiciones, los metales pueden volver a ser liberados. Este hecho es de gran importancia en una posible aplicación agronómica. Así pues, en este capítulo se pretende investigar los procesos de desorción de metales en CAC.

Para los ensayos se escogió el Cd como metal pesado por su elevada movilidad y toxicidad.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

Para evaluar la dinámica de desorción de Cd en CAC, primeramente se contaminó éste con dos dosis de Cd, 80 y 200 mg kg<sup>-1</sup>, dependiendo del ensayo. En una bandeja se colocó todo el CAC necesario para los ensayos. Se midió el porcentaje de humedad secando una alícuota a 80 °C hasta peso constante. Después se añadió CdSO<sub>4</sub> sólido en dosis de 80 y 200 mg de Cd por kg<sup>-1</sup> de materia seca. Después se humedeció hasta conseguir un 80 % de la capacidad de campo. Se mantuvo en ese grado de humedad y a 18 °C durante cuatro semanas. (Tapia, 2007).

Posteriormente se realizó un análisis por triplicado de Cd total mediante una digestión en agua regia según el procedimiento UNE-EN 13650, (2002). Se obtuvieron unos valores de 0,3 ± 0,1 mg kg<sup>-1</sup> para el sustrato sin contaminar, 71,5 ± 5,6 mg kg<sup>-1</sup> para el tratamiento de 80 mg kg<sup>-1</sup> y 185 ± 12 mg kg<sup>-1</sup> para el tratamiento de 200 mg kg<sup>-1</sup>. Estos valores no concuerdan con los de metal añadido, ya que esta metodología analítica no siempre consigue extraer el 100% del metal.

#### **3.1. Extracción secuencial de metales. Método Tessier**

La metodología de esta extracción está descrita con detalle en el apartado IV.3.4.2, donde se realizó para el CAC sin contaminación artificial.

#### **3.2. Curvas de desorción de Cd en CAC extraído con agua. Ensayos de agitación**

La curva de desorción de cadmio se realizó con el CAC contaminado con 200 mg Cd kg<sup>-1</sup> de materia seca. La metodología empleada fue la descrita por Wu y col., (2004), modificada aplicando la relación volumen/volumen en lugar de peso/peso para preparar los extractos. Para ello se realizaron cinco extractos con agua ultrapura (miliQ): 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 y 1:20.

Se tomó un peso equivalente de 10 mL de muestra seca (según densidad compactada de laboratorio), se pusieron en envases de plástico de 250 mL y se añadió

un volumen de agua desde 10 mL a 200 mL, de acuerdo a cada extracto (se realizaron cuatro repeticiones por muestra y extracto).

Posteriormente, los extractos fueron agitados inicialmente durante 30 minutos y equilibrados durante 24 horas a temperatura ambiente (~ 20°C). Se realizaron dos agitaciones de 30 minutos, una a las 12 horas y otra, inmediatamente antes de la centrifugación. Los extractos fueron centrifugados durante 15 minutos a 3000 rpm (BHG 602) y filtrados a través de un microfiltro de 0,45 µm (Millex®-HA). El cadmio en los filtrados fue determinado por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer Analyst 800).

### **3.3. Evaluación de la disponibilidad de Cd en CAC contaminado artificialmente mediante la utilización de ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Ensayo de agitación**

Para investigar el efecto de los ácidos orgánicos (habitualmente presentes en el entorno radicular) sobre la biodisponibilidad de Cd, en este ensayo se propuso la interacción del CAC contaminado con 200 mg kg<sup>-1</sup> de Cd, con diversos ácidos orgánicos de bajo peso molecular (LMWOA) mezclados con una disolución nutritiva estándar (Hoagland y Arnon) (Barceló y col. 1987). El ensayo de agitación se llevó a cabo en relación 1:5 muestra: disolución extractante, hasta un volumen final de 50 mL (4 repeticiones por muestra). La suspensión se agitó durante 1 hora (agitación de volteo Heidolph Reax 2) y posteriormente se filtró con papel de filtro (Whatman nº 42). La concentración de Cd en el filtrado se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer Analyst 800). La concentración de los ácidos orgánicos utilizados y de ZnCl<sub>2</sub> fue fijada en 0,002 M, basándonos en la concentración que establece el método de extracción oficial de elemento soluble con DTPA para mejoradores de suelo y sustratos de cultivo (UNE-EN 13651, 2002).

Las disoluciones extractantes fueron las siguientes:

1. A: Agua destilada pH 6,0 y conductividad eléctrica (CE) 0,0116 dS m<sup>-1</sup>
2. H: Hoagland (H), solución nutritiva, pH 5,0 y CE 2,08 dS m<sup>-1</sup>
3. H+ácido cítrico, pH 3,1 y CE 1,85 dS m<sup>-1</sup>
4. H+ácido gálico, pH 3,7 y CE 1,55 dS m<sup>-1</sup>



5. H+ácido málico, pH 2,9 y CE 2,16 dS m<sup>-1</sup>
6. H+ácido tártrico, pH 2,9 y CE 1,73 dS m<sup>-1</sup>
7. H+ácido ZnCl<sub>2</sub>, pH 4,9 y CE 2,07 dS m<sup>-1</sup>
8. DTPA-CaCl<sub>2</sub>, pH 2,6 y CE 4,33 dS m<sup>-1</sup>

La introducción del Zn en el tratamiento 7 se realizó para investigar el posible intercambio entre el Zn y el Cd en los sitios de adsorción (Alloway, 1995). El tratamiento 8 se planteó como referencia ya que es un método normalizado para extracción de metales (UNE-EN 13651, 2002).

La composición de la disolución de Hoagland utilizada se expone en la Tabla 15 (aunque la disolución Hoagland original también contiene microelementos y ácido tártrico, en este ensayo sólo se aplicaron las sales de macronutrientes).

**Tabla 15.** Composición de la disolución nutritiva Hoagland.

Disolución Hoagland y Arnon (macronutrientes)	g L <sup>-1</sup>	mM
KNO <sub>3</sub>	1,02	10,0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,49	3,0
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,23	2,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,49	2,0

*Fuente: Barceló y col, (1987)*

### 3.4. Ensayo de columnas de lixiviación

Se realizó un estudio de lixiviación de Cd en CAC contaminado con 80 y 200 mg kg<sup>-1</sup> de materia seca. Para ello se diseñó un ensayo de columnas de lixiviación con tres tratamientos, 0, 80 y 200 mg kg<sup>-1</sup> de Cd.

Cada columna llevaba en su parte inferior 7 cm de arena sobre la cuál se situaban 750 mL de CAC (según tratamiento) y encima, otros 7 cm de arena. De este modo se intentaba evitar canales preferentes de drenaje. En la parte inferior de la columna se colocaba una malla acoplada a un papel de filtro (Whatman n° 42), colocados sobre un embudo de porcelana y un erlenmeyer para recoger los lixiviados (Figura 27).

Las columnas se regaron inicialmente con 400 mL de agua destilada para humectar y homogeneizar el material. Posteriormente se regaron con 100 mL diarios de las diferentes disoluciones extractantes:

- Agua destilada: durante 30 días, pH 6, CE 0,001 dS m<sup>-1</sup>
- Disolución Hoagland y Arnon. Durante 5 días, pH 5, CE 2,8 dS m<sup>-1</sup>
- Disolución Hoagland y Arnon + ácido cítrico 0,4 %. durante 5 días pH 2.5 y CE 3,01 dS m<sup>-1</sup>
- Disolución Hoagland + ácido cítrico 0,4 % + ZnCl<sub>2</sub> 0,4 %. Durante 5 días. pH 2,4, CE, 3,01 dS m<sup>-1</sup>
- DTPA/CaCl<sub>2</sub> 0,002 M. Durante 5 días. pH 2,6, CE 4,33 dS m<sup>-1</sup>.

Los riegos fueron añadidos de forma consecutiva sobre la misma columna. Así cada disolución extractante fue aplicada durante el tiempo especificado, a continuación de la disolución extractante precedente.

La disolución Hoagland es la expuesta en la Tabla 15, la concentración de ácido cítrico se fijó en 0,4 % para equipararla al ácido tartárico incorporado en la disolución Hoagland original (Barceló y col. 1987). La disolución de DTPA se fijó según la norma UNE-EN 13651, (2002).



**Figura 27.** Aspecto de las columnas de lixiviación

El pH fue medido diariamente en los lixiviados con ionómetro (Orion 720A). La concentración de Cd también se midió en espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer Analyst 800). En gran parte de las muestras hizo falta utilizar la cámara de grafito del espectrofotómetro para aumentar el nivel de detección de Cd.

La concentración de cationes y la conductividad eléctrica se midió una vez cada 4 días, determinándose por espectrofotometría de absorción atómica y con conductivímetro (Crison 2200), respectivamente.

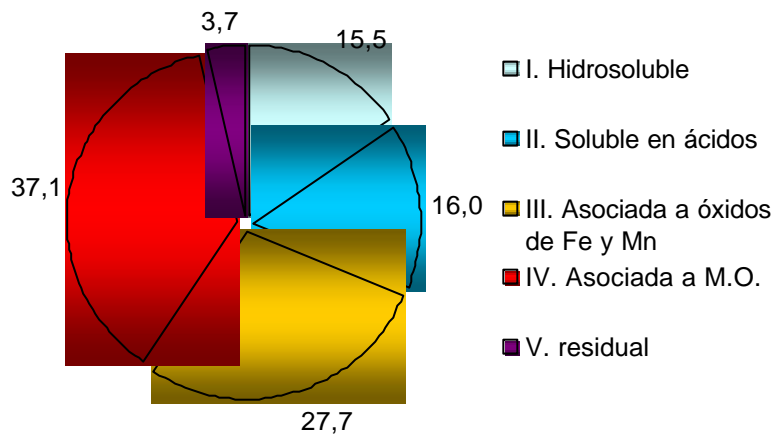
### **3.5. Análisis estadístico y generación de gráficos**

Los datos fueron analizados estadísticamente usando el programa SPSS (Statistical Package Social Science / Statistical Product and Service Solutions) v. 13.0. Las medias fueron comparadas usando ANOVA de un factor con el test de Duncan con una significación  $p = 0,05$ , utilizando el error estándar para determinar la variabilidad de las medias. Los gráficos se elaboraron con el programa Sigmaplot 10.0 o con Microsoft Excel XP.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Fraccionamiento Tessier de Cd en CAC contaminado artificialmente

En la Figura 18 se mostraba el fraccionamiento Tessier de metales contenidos en CAC original. Ahora se estudia el fraccionamiento de Cd en un CAC contaminado artificialmente. Se ha hecho así para estudiar en qué fracciones se adsorbe el metal cuando el CAC se pone en contacto con un agente contaminador. En este caso se agregó al CAC  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd, en forma de  $\text{CdSO}_4$ . La Figura 28 muestra el contenido de Cd en los distintos extractos de CAC contaminado artificialmente, obtenidos por el método Tessier.



**Figura 28.** Porcentajes de Cd encontrados tras el fraccionamiento Tessier de Cd en CAC contaminado artificialmente con  $200 \text{ mg kg}^{-1}$ . Los números de la leyenda indican las diferentes fracciones del método Tessier.

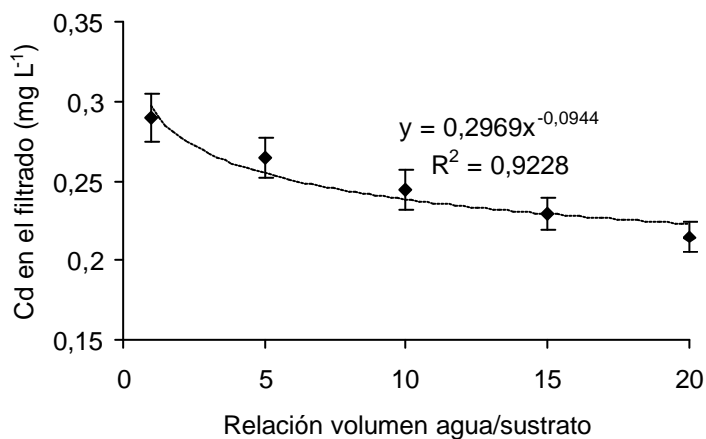
Si comparamos éste análisis con el expuesto en el capítulo IV, referente al Cd en CAC no contaminado artificialmente, comprobamos que la distribución de fracciones es similar. Aquí la fracción I, soluble en agua e intercambiable está en 15,5 % y la fracción II, soluble en ácido o asociada a carbonatos, es del 16 %. Entre ambas constituyen la fracción que se suele considerar biodisponible, es decir, el Cd que puede ser movilizado hacia las plantas y resto de organismos del suelo en condiciones naturales. En el CAC contaminado esta suma es de 31,5 % mientras que en el no contaminado es de 36,3 %. El resto de las fracciones también son similares en ambos casos, siendo la mayoritaria la fracción orgánica (fracción IV), seguida de la fracción

reducible (fracción III), y resultando casi testimonial la fracción residual (fracción V). Estos datos sugieren que si el CAC se usa para inmovilizar Cd, aproximadamente dos terceras partes de éste quedarían retenidas de forma más o menos estable, dejando el resto más accesible para las plantas y microorganismos del suelo. Como se ha visto anteriormente en el capítulo V, la gran retención de Cd de la fracción orgánica está debida principalmente a los grupos carboxílicos y diversos alcoholes, que con su carga negativa consiguen atraer a los metales cargados positivamente.

#### 4.2. Curvas de desorción de Cd en CAC extraído con agua. Ensayo de agitación

La fracción más lábil de la extracción secuencial Tessier (fracción I) utiliza una sal para forzar el intercambio cationico, por lo que representa una cantidad mayor de metal que la estrictamente soluble en agua. Para evaluar la influencia de diferentes volúmenes de riego y comprobar los efectos sobre la desorción de Cd en CAC contaminado artificialmente se procedió a la construcción de la curva de desorción a diferentes volúmenes de agua, según la metodología de Wu y col. (2004) modificada.

Se contaminó el CAC con 200 mg kg<sup>-1</sup> de Cd y se sometió a interacción por agitación con agua destilada en cinco relaciones v/v: 1:1; 1:5; 1:10; 1:15; 1:20 (Figura 29.).



**Figura 29.** Curva de desorción de Cd en CAC a diferentes relaciones agua/sustrato. Las barras de error representan el error estándar. Se ha ajustado al modelo matemático  $Y = a x^{-b}$ .

Los datos presentes en la curva muestran un descenso leve en la concentración de Cd del filtrado a medida que se aumenta la relación agua/sustrato. Además, los valores obtenidos son relativamente bajos si los comparamos con otros sustratos como corteza de pino, el cual ofrecía una concentración de Cd en relación 1:1 de  $2,1 \text{ mg L}^{-1}$ , y similares a los mostrados por lodos de depuradora compostados ( $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  en relación 1:1) (ambos materiales también contaminado artificialmente con  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd) (Tapia, 2007)

La curva se ajustó al modelo  $Y = a x^{-b}$ , donde “a” es la concentración del filtrado cuando  $x = 1$ , es decir en la relación 1:1; y “b” es la pendiente de la regresión, que representa la tendencia a disminuir la concentración de Cd en el filtrado. Cuanto mayor sea b más tendencia tendrá el material a desorber el metal. En nuestro caso, la “b” calculada es de  $0.094 \pm 0.008$ . Wu y col. (2004) estudiaron la desorción de Cd en varios suelos de diferentes características fisicoquímicas, encontrando valores de “b” entre 0,6 y 0,9, considerablemente más elevados que el del CAC estudiado. Los sustratos estudiados por Tapia (2007), corteza de pino y lodos de depuradora compostados, mostraron también unos valores de b ligeramente superiores al de CAC (0,76 y 0,11 respectivamente). Esto indica que el CAC retiene más el Cd que la mayoría de los suelos y materiales mencionados, de tal modo que un CAC que haya sido utilizado como enmienda orgánica en un suelo contaminado, desorberá menos metal que el propio suelo. La incorporación de CAC a suelos contaminados con Cd sería así, una práctica beneficiosa para el medio ambiente.

Un dato a destacar es que la concentración de Cd en el filtrado nunca es superior de  $0,3 \text{ mg L}^{-1}$  y es aún menor cuando se aumenta el volumen de agua de extracción. Si tenemos en cuenta que proviene de un material muy contaminado ( $200 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd) y extraído con agitación se podría decir que es una concentración considerablemente baja. Esto hace pensar que en condiciones agrarias reales las concentraciones de metal lixiviado de un CAC sean mínimas.

En cuanto a la cantidad neta de Cd extraído, cabe destacar que en condiciones de encharcamiento máximo y agitación (relación 1:20), sólo se ha conseguido extraer el 5,3 % del Cd total contenido en el CAC. Se podría decir pues que ésta es la fracción de Cd que queda soluble en agua. Esta fracción representaría a los lixiviados en condiciones de máxima humedad y escorrentía. En su aplicación práctica significaría que sólo alrededor del 5 % del total del Cd retenido podría volver a lixiviarse.

### 4.3. Evaluación de la disponibilidad de Cd en CAC contaminado artificialmente mediante la utilización de ácidos orgánicos de bajo peso molecular. Ensayo de agitación

En la Tabla 16 se muestran los porcentajes de Cd extraído con cada disolución. En general, exceptuando el DTPA, el resto de tratamientos no consiguen extraer una cantidad superior al 1,5 % del Cd total. Esto pone de manifiesto, una vez más, el alto potencial inmovilizador de Cd que posee el CAC.

**Tabla 16.** pH y porcentaje de Cd extraído con las diferentes disoluciones extractoras en un CAC contaminado artificialmente con 200 mg kg<sup>-1</sup> de Cd. Letras diferentes muestran diferencias significativas P = 0,05, test de Duncan

Tratamiento	pH del extractante	pH extracto 1/5 (v/v)	% Cd extraído
DTPA-CaCl <sub>2</sub>	2,6	5,6	83,4 <sup>a</sup>
H+ZnCl <sub>2</sub>	4,9	6,5	1,30 <sup>b</sup>
H+ácido cítrico	3,1	6,2	1,07 <sup>c</sup>
H+ácido gálico	3,7	6,3	1,05 <sup>cd</sup>
H+ácido tartárico	2,9	6,4	0,90 <sup>d</sup>
H+ácido málico	2,9	6,3	0,84 <sup>d</sup>
Hoagland (H))	5,0	6,8	0,65 <sup>e</sup>
Agua destilada	6,0	7,9	0,41 <sup>f</sup>

El agua destilada, como era de esperar, es el extractante que menos Cd consigue extraer. Observamos una diferencia significativa entre el agua destilada y la disolución Hoagland. El tratamiento Hoagland no solo extrae la fracción soluble sino también la intercambiable, y gracias a su menor pH puede movilizar más Cd. Entre los diferentes ácidos orgánicos hay pocas diferencias, siendo el cítrico el extractor más potente. Este poder extractante de los ácidos se puede deber a dos factores: a su bajo pH y a la formación de complejos con el Cd. La formación de complejos solubles entre estos ácidos y los metales está bien documentada en la literatura (Kavita y col., 2008; Meharg, 2005; Jones y col., 2003; Kochian y col., 2005; Ma 2000; Ryan y col., 2001).

Se ha comprobado que éstos ácidos movilizan Cd y otros metales, ya sea mediante exudados de raíces, exudados microbianos, o aportes externos.

El Zn parece ejercer algún tipo de competencia con el Cd por los sitios de adsorción, desplazándolo y dejándolo libre para su extracción. Resulta más eficaz que los LMWOA utilizados. Sin embargo la dosis de Zn empleada ( $2 \text{ mmol L}^{-1}$ ) en el ensayo dista mucho de representar una situación agronómica. Aunque tampoco es muy frecuente encontrarse un CAC con  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd en condiciones agronómicas. Los resultados concuerdan con los obtenidos por McLaughlin y Singh (1999), quienes comprobaron el efecto competidor del Zn y el Cd.

Como era de esperar, el agente quelante DTPA es el extractor más potente. Su poder quelante extrae la gran mayoría del Cd contenido en el CAC (83.4%).

Estos datos sugieren que la fuerza de retención de Cd por el CAC es mayor que la de los ácidos orgánicos y menor que la del agente quelante DTPA. En principio, en condiciones agrarias el CAC retendría cerca del 98 % del Cd que consiguiera captar de suelos contaminados. Los lixiviados serían mínimos. Las disoluciones fertilizantes, y los ácidos orgánicos exudados por las plantas provocarían una ligera desorción del Cd aunque también sería mínima. Si se utilizaran agentes quelantes en alguna práctica agronómica, como la incorporación de quelatos de micronutrientes, o la fitoextracción asistida, se produciría una liberación muy importante del Cd retenido.

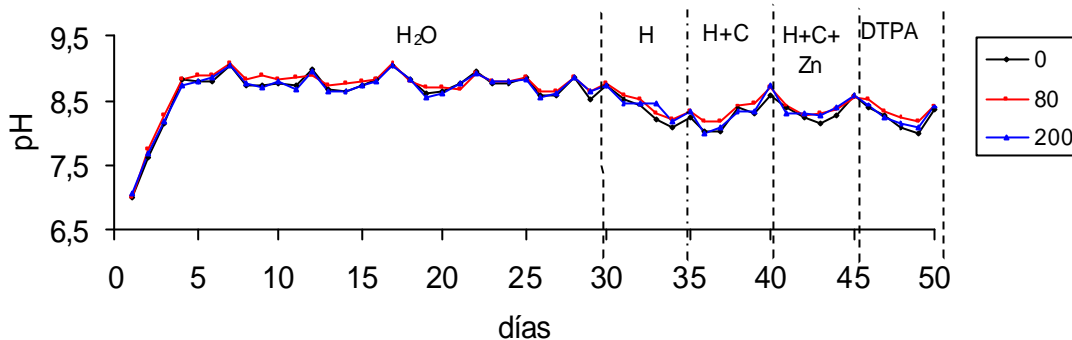
#### **4.4. Evaluación de los lixiviados de Cd en CAC contaminado artificialmente.**

##### **Uso de columnas de lixiviación**

En este ensayo se intentó reproducir en cierta medida las condiciones agronómicas, para comprobar el comportamiento de los lixiviados del CAC contaminado con Cd a tres niveles (0, 80 y  $200 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Se colocó el CAC en columnas de lixiviación y se efectuaron riegos sucesivos con las diferentes disoluciones, las cuales han sido probadas en ensayos anteriores.

##### 4.4.1. pH de los lixiviados





**Figura 30.** Evolución del pH de los lixiviados de CAC en columnas de lixiviación. 0, 80 y 200  $\text{mg kg}^{-1}$ , son las concentraciones de Cd con que fue contaminado el CAC.

H: Disolución Hoagland, pH =5

H+C: Disolución Hoagland + ácido cítrico (0,4 %), pH= 2,5

H +C+Zn: Disolución Hoagland + ácido cítrico (0,4 %) + $\text{ZnCl}_2$  ( $2\text{mmol L}^{-1}$ ), pH =2,4

DTPA: Disolución DTPA/ $\text{CaCl}_2$  ( $2\text{mmol L}^{-1}$ ), pH = 2,6

En la Figura 30 se muestra la evolución del pH en los lixiviados de los tres tratamientos y con diferentes disoluciones de riego. Lo primero que destaca es que no hay diferencia en el pH del CAC, esté contaminados o no. El  $\text{CdSO}_4$  utilizado para contaminar el CAC artificialmente no afectó al equilibrio de pH.

Se observa que al inicio el pH sube hasta estabilizarse a un intervalo muy elevado, entre 8,5 y 9. Esta subida inicial se debe seguramente a que el material necesita un tiempo para humectarse y reaccionar. Pasado este tiempo mantiene una basicidad relativamente elevada. En la caracterización inicial se había comprobado el alto valor de pH del CAC (pH =8 extracto 1:5); sin embargo, en este ensayo de larga duración se comprueba que los lixiviados alcanzan pH mayores según se va regando. Esto indica que conforme el CAC va reaccionando con el agua, tiende a mostrar valores de pH superiores a los obtenidos por el método normalizado (en el extracto 1:5). Otros autores han encontrado intervalos de pH en agua, similares a los expuestos en la Figura 30, para diferentes CAC (Szmids y Chong, 1995; Kaplan y col., 1995). Zibilske, (1998) atribuye el elevado pH a la presencia de amoníaco derivado de aminoácidos descompuestos en la fermentación ocurrida durante la elaboración del CAC. También es posible que la basicidad provenga, en parte, de los carbonatos procedentes de la arena caliza utilizada como componente primario en el CAC. A medida que se suceden los riegos se puede apreciar una ligera tendencia de disminución del pH, seguramente porque tanto las sales

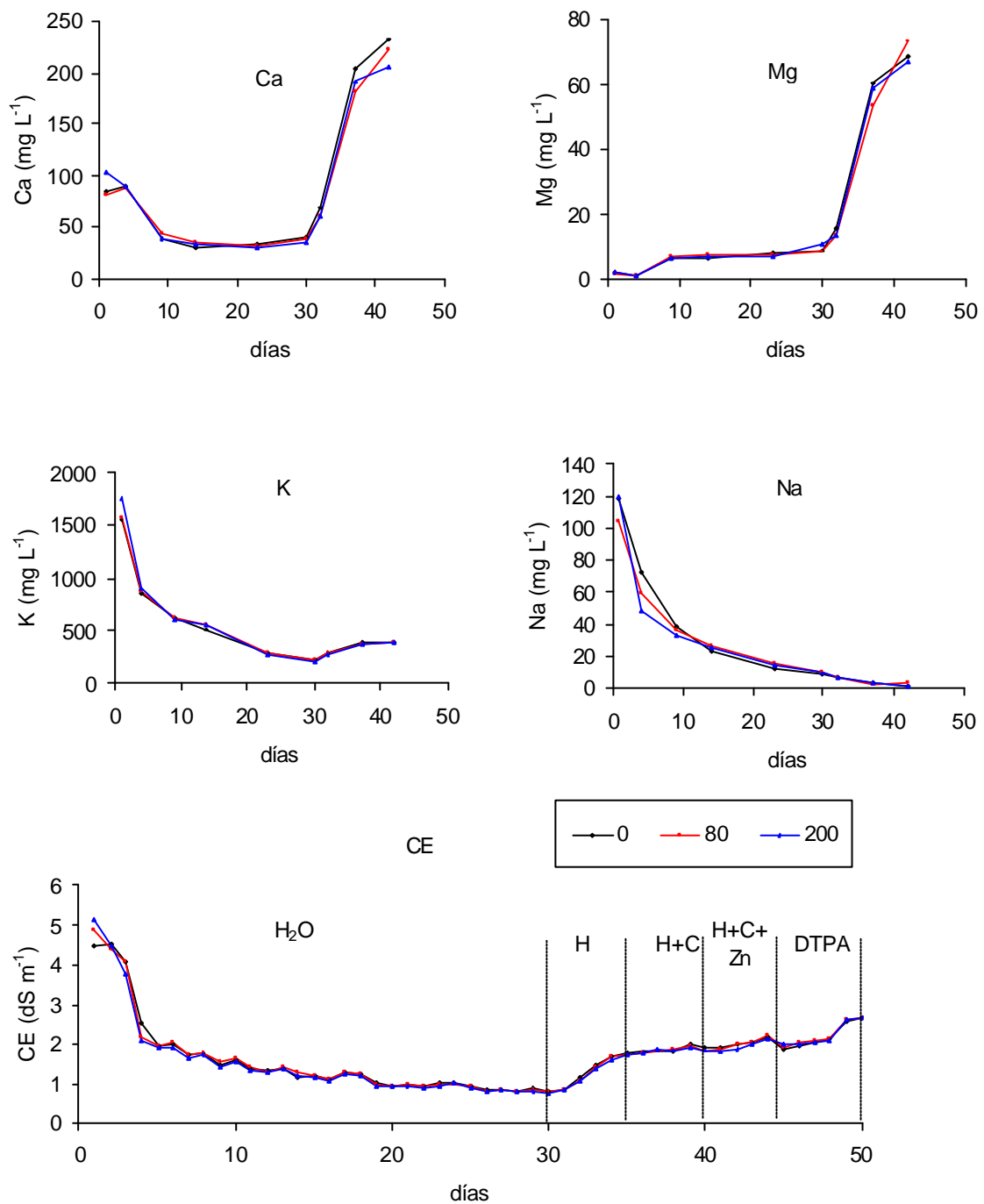
como el amoníaco se han ido liberando. Mingsing y col., (2001) muestran también la influencia de los aniones orgánicos en relación a la basicidad del CAC. Sostienen que la variedad de sitios de reacción de los diferentes aniones orgánicos del CAC, es la principal fuente de adsorción de protones, configurando un efecto tamponador muy fuerte.

La capacidad tamponadora se pone de manifiesto al añadir, tras el agua, disoluciones más ácidas. Desde el día 30 hasta el final se comprueba como el CAC tiende a disminuir el pH de sus lixiviados, aunque nunca por debajo de 8. Cabe destacar el hecho de que aún aplicando disoluciones tan ácidas como el ácido cítrico (pH 2,5) el pH no disminuye más que con la disolución Hoagland (pH = 5).

#### 4.4.2. Conductividad eléctrica y cationes en lixiviados

En la Figura 31 se muestran los valores de CE (conductividad eléctrica) y concentraciones de cationes en los lixiviados del CAC. Al igual que ocurría con el pH, los diferentes niveles de contaminación de Cd no afectaron en modo alguno a los contenidos de cationes (ni tampoco a la CE) lixiviados de CAC. La conductividad eléctrica se manifiesta con una relación directa con la suma de los cationes. De hecho se obtuvo un índice de correlación entre dicha suma y la CE de 0,955 para el tratamiento control, 0,963 para el de 80 mg kg<sup>-1</sup> y 0,949 para el de 200 mg kg<sup>-1</sup>. Así pues la CE depende mayoritariamente de las sales inorgánicas presentes y se puede tomar como variable resumen de la concentración de los cationes estudiados.

Al inicio del ensayo se observa que la CE es elevada, pero en aproximadamente 10 días de riego con agua, disminuye hasta valores inferiores a 1,5 dS m<sup>-1</sup>. Al mismo tiempo, el K y el Na, que al principio mostraban valores elevados, disminuyen sensiblemente. De los cuatro cationes medidos, el K es el más abundante, seguido del Na, Ca y Mg. El aumento de CE al iniciar los riegos con disolución Hoagland (a partir de 30 días) se ve también reflejado en el resto de cationes, menos en el caso del Na que no está incluido en dicha disolución. Los niveles de K en el CAC son tan elevados, que después de 30 días de lavado con agua, la concentración de K en los lixiviados es similar a la mostrada por la disolución nutritiva.

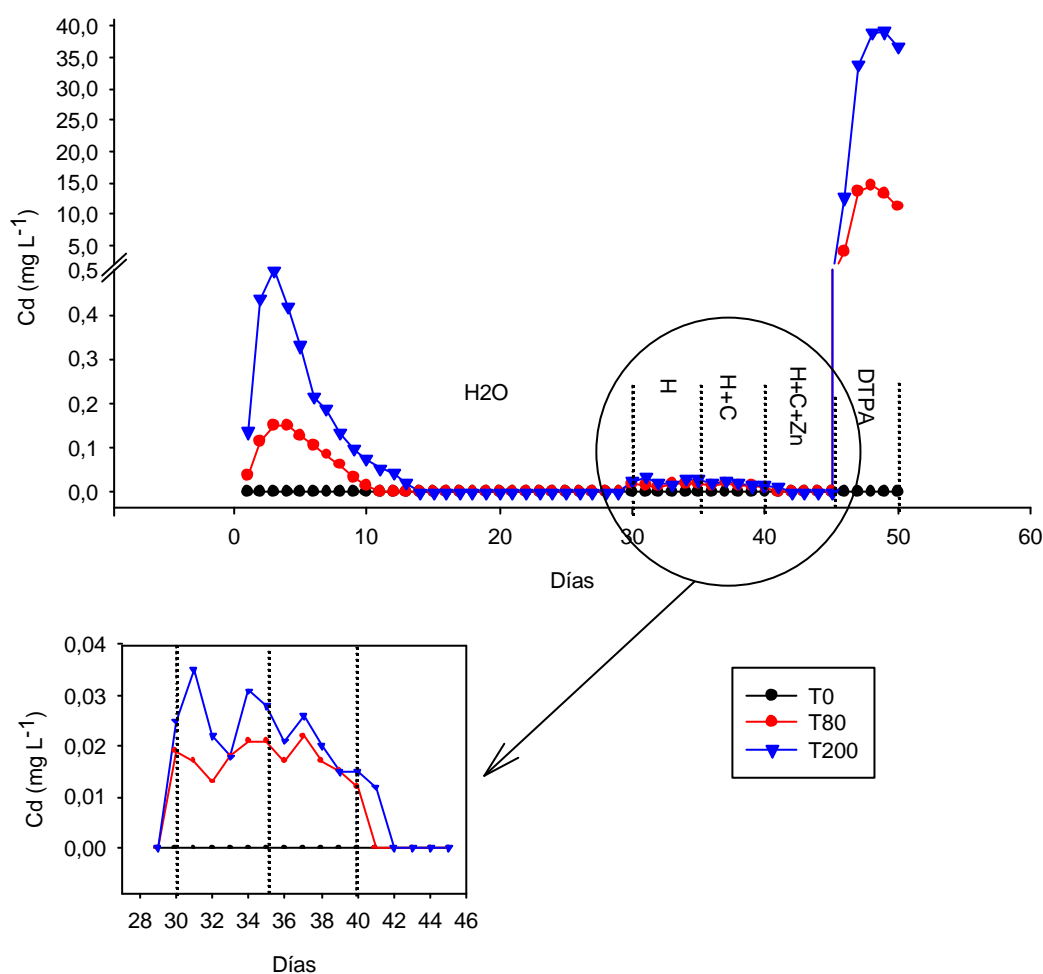


**Figura 31.** Conductividad eléctrica y concentración de cationes en los lixiviados de CAC. 0, 80 y 200 representan los niveles de contaminación de Cd en mg kg<sup>-1</sup>.

Según estos datos se puede concluir que el CAC es un material demasiado salino como para ser utilizado, sin lavado alguno, como sustrato de cultivo. De hecho existen numerosos estudios que muestran los problemas de salinidad ocasionados en el suelo

por la acumulación de CAC en pilas (Mingxing y col., 2001 a; Mingxing y col., 2001 b) Sin embargo, después de los lavados, la salinidad no sería un limitante. Y sí sería beneficioso nutricionalmente debido a su gran aporte de K.

#### 4.4.3. Evaluación de la lixiviación de Cd



**Figura 32.** Concentración de Cd en lixiviados de CAC en columnas. 0, 80 y 200 representan la dosis de contaminación de Cd en mg Kg<sup>-1</sup>.

H: Disolución Hoagland, pH =5

H+C: Disolución Hoagland + ácido cítrico (0,4 %) pH= 2,5

H +C+Zn: Disolución Hoagland + ácido cítrico (0,4 %) +ZnCl<sub>2</sub> (2mmol L<sup>-1</sup>). pH =2,4

DTPA: Disolución DTPA/CaCl<sub>2</sub> (2 mmol L<sup>-1</sup>) pH = 2,6

En la Figura 32 se muestra la concentración de Cd en los lixiviados del CAC contaminado artificialmente con Cd. Se puede observar que la lixiviación de Cd es muy baja. Sólo al inicio del ensayo, en torno a los 3 días de riego con agua se consigue unos máximos de desorción. En el caso del tratamiento con  $200 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd, estos máximos está en  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  y en el de  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  están en  $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ . Estos valores serían preocupantes en los lixiviados de suelos o sustratos con destino agrícola, ya que aunque no son elevados, la liberación continua de Cd a estos niveles podría acumularse en tejidos vegetales o en ciertos sitios de adsorción del suelo colindante, e incluso percolar hacia aguas subterráneas.

Sin embargo, la gráfica nos muestra un descenso de la concentración de Cd llegando a anularse a los 13 días de riego con agua. En ese tiempo el CAC parece haber liberado toda la fracción de Cd soluble en agua, y por más que se le riegue no se consigue lixiviar más.

En el apartado VI.4.2, donde se estudiaron las curvas de desorción de Cd se calculó que en condiciones de agitación y largo tiempo de contacto (24 horas, relación 1:5 sustrato:agua) la fracción soluble en agua no superaba el 1,6 % del total. En el ensayo de diferentes agentes extractantes, apartado VI.4.3, se observó que en condiciones de agitación menos forzada y menor tiempo de contacto (1 hora), esta fracción disminuía a 0,41 %. Ahora comprobamos que el total de Cd lixiviado por los riegos de agua es de  $0,093 \text{ mg}$  para el tratamiento de  $80 \text{ mg kg}^{-1}$  y de  $0,29 \text{ mg}$  para el tratamiento de  $200 \text{ mg kg}^{-1}$ ; esto corresponde a un 0,8 % y 1 % del total, respectivamente. Teniendo en cuenta las diferencias propias de cada ensayo, se podría concluir que el CAC solo libera entre el 0,4 y el 1,6 % del Cd total cuando se humedece con agua. Y que dicha liberación se produce mayoritariamente al inicio de los lavados, siendo nula a los 13 días.

El resto de disoluciones extractantes (menos el DTPA), que involucran procesos de intercambio catiónico, bajos pH y desplazamiento de Cd por Zn, consiguen liberar cierta cantidad de Cd, pero en niveles muy bajos (por debajo de  $0,04 \text{ mg L}^{-1}$ ). Esta liberación se anula a los 12 días por lo que tampoco supone un problema a largo plazo. Al estar diseñado este ensayo mediante riegos sucesivos que mezclan varias disoluciones, no es posible diferenciar el efecto del ácido cítrico o del Zn. El total de Cd liberado hasta el día 45, justo antes de la aplicación del agente quelante DTPA, es de

0,11 y 0,32 mg para los tratamientos de 80 y 200 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente; esto supone un 2,5 % y un 1,1% del total.

La introducción del DTPA consigue en los lixiviados niveles muy elevados, indicando que la fuerza de retención de Cd por el CAC es mucho menor que la afinidad del metal por el agente quelante.

En todo momento, el tratamiento control no lixivió Cd, independientemente de la disolución extractante utilizada.

A la vista de estos datos se puede concluir que el CAC retiene con gran fuerza la gran mayoría del Cd adsorbido. En una posible aplicación al suelo, podría liberar hasta el 2,5 % del Cd total retenido, teniendo en cuenta que en este medio coexisten procesos de intercambio catiónico, bajos pH, ácidos orgánicos y competencia con otros metales pesados. Esta liberación sería inicial, anulándose al cabo de pocos días. La introducción de agentes quelantes provocaría una lixiviación masiva del metal.

## 5. CONCLUSIONES

- El CAC contaminado artificialmente con Cd ha mostrado un elevado potencial de retención del metal, frente a agentes extractantes como: agua, disoluciones fertilizantes o ácidos orgánicos, tanto en ensayos de agitación, como en columnas de lixiviación.
- Dentro de los ácidos orgánicos, el cítrico resultó el más efectivo a la hora de extraer Cd (en condiciones de agitación), aunque la fracción extraída fue tan baja que no superó el 1,1% del total.
- El agente quelante DTPA sí consiguió extraer un porcentaje elevado de Cd (un 83,4% del total en el ensayo de agitación y un 52 % en el ensayo de columnas de lixiviación).
- Extrapolando estos resultados a condiciones agronómicas, podría presuponerse que el CAC que hubiera retenido Cd de alguna fuente de contaminación, no liberaría el metal al ser regado con agua o disoluciones nutritivas. Los ácidos orgánicos (presentes en la rizosfera) sólo serían capaces de solubilizar una fracción minoritaria de metal, por lo que la concentración de éste disponible para las plantas, también sería escasa.

**VII. EVALUACIÓN DE LA  
DISPONIBILIDAD DE METALES  
PESADOS EN SUELOS  
CONTAMINADOS ENMENDADOS  
CON CAC**



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	104
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	106
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	107
3.1. Caracterización de suelos .....	107
3.1.1. Localización y muestreo .....	107
3.1.2. Caracterización fisicoquímica de los suelos .....	110
3.1.3. Contenido y distribución de metales pesados en los suelos. Método Dold. .	112
3.2. Evaluación de la disponibilidad de Cd, Pb y Cu en un suelo enmendado con CAC. Estudio de dosis de enmienda.....	112
3.3. Análisis estadístico y generación de gráficos .....	114
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	115
4.1. Caracterización de los suelos ensayados. Distribución de metales pesados.....	115
4.2. Evaluación de la disponibilidad de Cd, Pb y Cu en un suelo enmendado con CAC. Estudio de dosis de enmienda.....	118
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	125

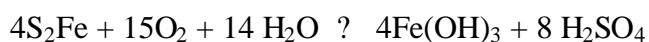
## VII. EVALUACIÓN DE LA DISPONIBILIDAD DE METALES PESADOS EN SUELOS CONTAMINADOS ENMENDADOS CON CAC

### 1. INTRODUCCIÓN

Los suelos contaminados con metales pesados potencialmente tóxicos, representan uno de los mayores riesgos medioambientales de las minas abandonadas (Thornton, 1996). Es obvio que los metales se encuentran dentro de la roca de mina de manera natural, sin embargo, el verdadero problema estriba en las prácticas mineras que al extraerlo y concentrarlo, fuerzan su biodisponibilidad. Los lavados ácidos comúnmente utilizados para disolver la roca madre disuelven al mismo tiempo metales que se distribuyen por toda la zona. La acumulación de restos de roca triturada en escombreras a menudo se convierte en una fuente de contaminación mayor que la propia mina (Batista y col., 2007; López y col., 2008). Todas estas labores crean un suelo antropogénico que frecuentemente presenta unas características muy diferentes a las del suelo original (Sencindiver y Ammons, 2000). Generalmente son suelos jóvenes, desestructurados, con una alta presencia de roca fragmentada, bajo contenido en nutrientes y materia orgánica, y con elevados niveles de metales pesados. Todo ello limita drásticamente el desarrollo de cubiertas vegetales (Vega y col., 2004).

Cuando la mineralogía de la mina está basada en sulfuros (pirita, galena, blenda), la oxidación de éstos hasta sulfatos, suele ser la principal fuente liberación de metales y de acidificación del medio (Neel y col., 2003; Haering y col., 2004). El proceso de oxidación no es sencillo ya que ocurre en varias etapas y está influenciado directamente por la presencia de oxígeno, metales oxidantes ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y bacterias (*Thiobacillus ferrooxidans*, *metallogenium*, *sulfolobus*) (Urrutia y col., 1987).

La reacción global de la oxidación de la pirita ( $\text{S}_2\text{Fe}$ ) sería:



El resto de sulfuros metálicos (de Mn, Zn, Cu, Pb etc.) seguirían un proceso análogo, en el que se formaría ácido sulfúrico y el metal quedaría libre, formando hidróxidos u iones libres dependiendo del pH y el potencial redox.

Determinados metales pesados menos abundantes que los mencionados, como el Cd, suelen presentarse como impurezas asociados a los minerales de sulfuro de otros metales. Por lo tanto en la oxidación de dichos minerales también se estaría liberando sus impurezas.

Es claro pues que aunque el metal pesado esté de forma natural en el yacimiento, es el proceso de extracción y acumulación lo que provoca la contaminación, al proporcionar un ambiente más aireado.

En este tipo de suelos mineros tan degradados cualquier aporte de materia orgánica sería beneficioso para la regeneración de una cubierta vegetal. La capacidad del CAC para retener metales es un factor adicional, que podría contribuir a dicha regeneración. Sin embargo este potencial podría variar considerablemente al interaccionar con el suelo. Éste posee determinadas características fisicoquímicas propias (pH, óxidos de Fe y Mn, granulometría gruesa, metales retenidos en muy diversas fracciones) que probablemente afectarán a los mecanismos de adsorción que hasta ahora se han estudiado para el CAC.

A la hora de determinar la biodisponibilidad de un metal en un suelo, la literatura muestra una gran variedad de resultados. La biodisponibilidad puede definirse como el contenido de metal de un suelo al que los seres vivos están expuestos (Ehers y Luthy, 2003). El tipo de suelo, contenido en materia orgánica, arcilla, óxidos de Fe y Mn, especiación del metal y sobre todo, la especie vegetal en cuestión, son los factores que más influyen (Ehlken y Kirchner, 2002). Numerosos métodos extractivos de un solo paso se han propuesto con esta finalidad (Haq y col., 1980; Norvell, 1984; Brun y col., 2001; Hammer y Keller, 2002; Chaignon y col., 2003). Su gran ventaja reside en que son fáciles de reproducir y suelen usar agentes quelantes que forman complejos metálicos estables, bien definidos y relativamente fáciles de estudiar. Sin embargo, aún no existe ningún método universalmente aceptado que defina cual es la fracción asimilable de un metal en suelo (Sauvé y col., 2000). En este capítulo se ensayarán varios de ellos, incluyendo el método Rhizo propuesto por Mu-Hua y col., (2005), basado en una combinación de ácidos orgánicos. Este último método se fundamenta en

la ya demostrada presencia de estas moléculas en la rizosfera y su papel relevante en la complejación de metales.

Por otro lado, para suelos de mina ricos en sulfuros, se han diseñado métodos extractivos secuenciales parecidos al de Tessier que consiguen separar el metal en varias fracciones atendiendo a su fortaleza de enlace. En concreto en este capítulo se usará el propuesto por Dold y Fontboté en el año 2000.

## **2. OBJETIVOS**

Si queremos comprobar el potencial del CAC como enmienda orgánica biorremediadora de suelos contaminados por metales pesados, es necesario realizar ensayos que caractericen la interacción entre CAC y el suelo. Por ello en este capítulo se estudia el efecto del CAC aplicado en varias dosis, sobre la biodisponibilidad de metales en suelos. Se podría suponer que cuanto mayor sea la dosis de CAC mayor será la retención de metales pesados. Sin embargo no debemos olvidar que uno de los aspectos a considerar en la aplicación de una enmienda con CAC es su rentabilidad económica. Por ello aunque se estudiarán distintas dosis, desde muy bajas hasta muy elevadas, el factor fundamental para determinar la adecuada debe ser su efecto sobre la biodisponibilidad del metal y el coste económico que supone. Generalmente en las prácticas agrícolas, las enmiendas orgánicas no suelen superar los 100 t ha<sup>-1</sup>.

En este trabajo nos hemos centrado en dos suelos de mina ácidos que pueden ser representativos de gran parte de minas de sulfuros. Además su extensión y contaminación son tales que se hace complicado implementar técnicas extractivas. Se escogieron dos suelos semejantes entre sí, aunque con diferente nivel de contaminación. De este modo se podrá comprobar mejor el efecto del CAC sobre los metales pesados, minimizando la variabilidad por parámetros físicos del suelo.

Por último se ha de destacar que el objetivo final es tanto descontaminar el suelo, como recuperar su fertilidad, hacerlo habitable para la flora y la fauna.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3.1. Caracterización de suelos

#### 3.1.1. Localización y muestreo

Se localizaron dos zonas mineras de importancia histórica en la Comunidad de Madrid: una en el municipio de Bustarviejo y otra en el sur del municipio de Garganta de los Montes. Ambos pueblos se encuentran en la sierra norte de Madrid, y están separados por una colina de gran importancia minera.

La mina del *Cerro de la Plata* se encuentra en el municipio de Bustarviejo (Madrid) a más de 1500 metros de altura (Figura 33), y tuvo gran importancia desde el siglo XVII hasta 1890, momento en que se abandonó su explotación. Fue una fuente importante de Ag, durante casi tres siglos. Actualmente consta de varios pozos abiertos y de numerosas escombreras a cielo abierto, las cuales son cruzadas por un pequeño arroyo que extiende la contaminación a lo largo del valle. Su mineralogía se basa principalmente en sulfuros, siendo los más abundantes Arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ), Calcopirita ( $\text{FeCuS}_2$ ), Galena ( $\text{PbS}$ ) y Matilidita ( $\text{AgBiS}_2$ ) (Jiménez et al., 2001).



**Figura 33.** Localización de la mina del Cerro de la Plata (Bustarviejo).

Análisis preliminares de la mina del *Cerro de la Plata* (Bustarviejo) mostraban una elevada concentración de varios metales pesados, así como de arsénico (Tabla 17).

**Tabla 17.** Análisis preliminar de elementos traza en la zona de la mina del *Cerro de la Plata* (Bustarviejo)

Localización de las zonas de muestreo en la mina	Concentración total de elemento en suelo (mg kg <sup>-1</sup> )					
	Cd	Pb	Cu	Mn	Zn	As
Puerta de la mina	1,7	70	40	208	265	326
Escombrera superior	1,9	185	134	356	259	1020
Marjada	3,1	4,3	22,5	1140	312	1750
Escombrera inferior	<b>32,1</b>	<b>1020</b>	<b>1870</b>	<b>2500</b>	<b>7650</b>	<b>3200</b>
Explanada	4,1	44,8	209	460	347	2360
Camino hacia la torre	10,5	591	568	250	2330	2930

Para obtener un suelo lo más contaminado posible se decidió tomar muestra de la zona más contaminada, la cual se situaba en una ladera de la escombrera inferior, que desembocaban en un riachuelo. Así pues el suelo allí tomado (denominado en este trabajo como suelo B) es una mezcla de material de escombrera y suelo original. Se le podría clasificar como Regosol Antrópico Espólico (FAO 1998), que se refiere a suelos jóvenes, sin evolución en su horizonte, de textura gruesa, formados por más de un 35% de residuos industriales como la minería. La proximidad del riachuelo hace que el peligro de dispersión de la contaminación sea elevado. El aspecto del suelo era pardo-rojizo, pedregoso y con escasa vegetación (Figura 34).



**Figura 34.** Lugar de toma de muestra del suelo B, de la mina del *Cerro de la Plata*, en Bustarviejo

El segundo suelo (suelo G) se tomó de la mina de cobre llamada *Fernandito*, situada al sureste de la localidad de Garganta de los Montes (Madrid) (Figura 35). La mina fue abandonada hace unos 50 años y posee una escombrera actual de unos 3.500 m<sup>3</sup> (Hernández y Pastor, 2005). Los suelos de la zona están ubicados en cotas de 1.180 a 1.200 m y se clasifican como cambisoles húmicos y dístricos según la FAO. Dado que el mineral principal de la mina es calcopirita (CuFeS<sub>2</sub>), parte de las formas de Cu son debidas a su presencia como sulfuro mineral (Encabo y col., 1997).



**Figura 35.** Localización de la mina de *Fernandino* en Garganta de los Montes.

La contaminación de la mina de Garganta de los Montes parecía ser más baja que la de Bustarviejo. En un análisis preliminar de la zona se encontraron altos contenidos de Cu, y medios de Cd y Pb ([Cu] = 630 mg kg<sup>-1</sup>; [Cd] = 1,4 mg kg<sup>-1</sup>; [Pb] = 52). Se tomó muestra de una zona de lavado de mineral. El suelo era arenoso con cierta cubierta vegetal, lo que le daba un color ligeramente oscuro (Figura 36).





**Figura 36.** Lugar de toma de muestra del suelo G de la mina *Fernandino* en Garganta de los Montes

### 3.1.2. Caracterización fisicoquímica de los suelos

#### Textura

El análisis de la textura de los suelos se realizó mediante el método Bouyoucos. Se pesaron 50,0 g de suelo seco y molido a 2 mm, con una precisión de 0,01g. Se colocó el suelo en un vaso de precipitado de 1L, al que se añadió 400 mL de agua destilada y 10 mL de solución dispersante (37,7g de hexametáfosfato sódico y 7,94g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 1L de agua destilada). Se agitó la mezcla durante 15 minutos, y posteriormente se transfirió la suspensión a una probeta de 1L enrasándose con agua destilada hasta 1L. Se agitó fuertemente con un agitador manual durante un minuto. Se hicieron dos mediciones de densidad y temperatura, una a los 40 s y otra a las 2 h. El proceso se realizó por triplicado.

La fórmula utilizada es la siguiente:

$$X = 100 (D + (T - 20) 0,36) / P$$

X = % de arcilla + limo (en la primera medida) o % arcilla (en la segunda medida)

D = lectura del densímetro ( $\text{g L}^{-1}$ )

T = temperatura de la suspensión



P = peso de muestra tomado

#### pH y CE

El pH y la conductividad eléctrica se determinaron en un extracto realizado en proporción 1/5 (v/v) suelo/agua, según las normas UNE-EN 13037, (1999), UNE-EN, 13038, (2001) y UNE-EN 13652, (2002). El proceso se realizó por triplicado. Se utilizó un ionómetro Orion 720A para medir el pH y un conductímetro Crison 2200 para medir la conductividad eléctrica.

#### Cationes de cambio

La concentración de cationes de cambio (Ca, K, Mg y Na) se midió mediante extracción con  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$  1M a pH 7. Se pesaron con precisión del 1 %, 10 g de suelo añadiendo después, 33 mL de la disolución de acetato amónico. Se agitó durante 5 minutos en el agitador de volteo con posterior centrifugación a 2000 r.p.m. durante 5 minutos. Se decantó el líquido sobrenadante sobre un matraz de 100 mL. Se extrajo un total de tres veces enrasando a 100 mL con disolución extractora. El contenido de cationes se midió por Absorción Atómica (Perkin Elmer Analyst 800).

#### Materia orgánica.

El contenido de materia orgánica de los suelos se midió mediante oxidación con dicromato potásico en medio ácido. A 1 g de muestra pulverizada se le añadió 10 mL de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  y 20 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Se agitaron suavemente y se dejaron reaccionar durante 30 minutos. Posteriormente se agregaron 200 mL de agua destilada, y 10 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  concentrado. Se añadió 1 mL de difenilamina y se valoró con sal de Möhr 0,5 M. El proceso se realizó por triplicado.

#### Capacidad de intercambio catiónico

La capacidad de intercambio catiónico de los suelos se midió por saturación con sodio ( $\text{NaCH}_3\text{COO}$  1 M, pH 8,2) y posterior desplazamiento de éste con el ión amonio ( $\text{NH}_4\text{OAc}$  1M pH 7) (Rhoades, 1982). El Na desplazado se midió por espectrofotometría de Absorción Atómica (Perkin Elmer Analyst 800).

### 3.1.3. Contenido y distribución de metales pesados en los suelos. Método Dold.

El contenido y la distribución de metales pesados se determinaron mediante una extracción secuencial propia de suelos mineros, puesta a punto por Dold y Fontboté (2000). Esta extracción se usa en este tipo de suelos con mineralogía de azufre, donde el contenido de materia orgánica es muy bajo, y el de óxidos de hierro muy elevado.

Este método distingue entre 7 fracciones diferentes (Tabla 18):

**Tabla 18.** Procedimiento de la extracción secuencial de Dold y Fonboté (2000).

Fracciones	Extractante químico	Condiciones experimentales
F1: Fracción soluble en agua	Agua destilada	Agitación durante 1 h
F2: Fracción intercambiable	1 M NH <sub>4</sub> OAc, pH 4,5	Agitación durante 2 h
F3: Fracción asociada a oxi-hidróxidos de Fe(III)	0.2 M NH <sub>4</sub> -oxalato, pH 3.0	Agitación durante 1 h en ausencia de luz
F4: Asociada a óxidos de Fe(III)	0.2 M NH <sub>4</sub> -Oxalato, pH 3,0	Agitación y calor durante 2 h, 80 °C
F5: Orgánica y sulfuros secundarios de Cu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 35%	Calentamiento en baño de agua a 85 °C durante 1 h
F6: Asociada a sulfuros primarios	KClO <sub>3</sub> y HCl, seguido de HNO <sub>3</sub> 4 M	Agitar y calentar hasta ebullición durante 1 h
F7: Fracción residual	HNO <sub>3</sub> , HF, HClO <sub>4</sub> , HCl	Digestión durante 2 h.

### **3.2. Evaluación de la disponibilidad de Cd, Pb y Cu en un suelo enmendado con CAC. Estudio de dosis de enmienda**

Para seleccionar una dosis adecuada de CAC para ser aplicada a los suelos contaminados en el experimento con planta, y para evaluar los efectos sobre la biodisponibilidad de metales, se diseñó un ensayo en condiciones de laboratorio con 8 dosis de CAC sobre el suelo de Bustarviejo, que fue el que mayor concentración de

metales presentaba. Las dosis fueron de 0, 20, 40, 60, 80, 100, 200 y 300 t ha<sup>-1</sup>. Estas dosis corresponden a 0, 8, 16, 24, 32, 40, 80 y 120 g kg<sup>-1</sup> de materia seca (CAC/suelo).

Tanto el suelo como el CAC se secaron a 75 °C hasta peso constante, y se molieron, tamizándolos después a 0,2 mm. Se realizó la mezcla correspondiente a cada tratamiento en bandejas de 0,5 L de volumen y se humedecieron con agua destilada en relación 1:2 (v:p, agua: mezcla). Se dejaron incubando manteniendo esa humedad, a 25 °C durante 4 semanas con una agitación de 5 minutos cada día.

Pasado el tiempo de incubación se realizaron cuatro extracciones en alícuotas distintas de cada una de las mezclas.

- Agua destilada: 1 g de mezcla en 10 mL, agitación durante 3 horas. Se extrae la fracción soluble de metal la cual está asociada a la fracción lixiviable.
- CaCl<sub>2</sub> 0,01M: 1 g de mezcla en 10 mL, agitación durante 3 horas. Se usa frecuentemente para determinar la llamada fracción biodisponible de metal (asimilable por la planta) (Novozamsky y col., 1993).
- DTPA/CaCl<sub>2</sub>: 1 g de mezcla en 4 mL, agitación durante 2 horas. Según norma UNE-EN 13651, (2002). Es un método más potente que el resto, y da información sobre la fracción potencialmente biodisponible, sin llegar a extraer los metales de la fracción residual. Ha sido utilizado durante mucho tiempo para calcular la concentración total de metal, refiriéndose a la fracción que en condiciones exageradas, pero reales, podría liberar metal. Excluye así la utilización de calor o ácidos fuertes.
- Método Rhizo: 1 g de mezcla en 10 mL de disolución extractante, agitación durante 16 horas. En este caso la disolución extractante es una mezcla de ácidos orgánicos de bajo peso molecular: ácido acético, láctico, cítrico málico y fórmico, en proporción molar 4:2:1:1:1. Este método ha sido usado con muy buenos resultados para predecir la biodisponibilidad de metales para diferentes cultivos (cebada, trigo, tomate, pepino). Fue comparado con otros agentes extractantes como el DTPA, EDTA, CaCl<sub>2</sub>, NaNO<sub>3</sub> y el método Rhizo resultó ser el que ofrecía el grado de correlación más elevado, entre el metal extraído del suelo, y su concentración en parte aérea (Mu-Hua y col., 2005; Feng y col., 2005)

La disolución sobrenadante resultante de cada extracción se filtró mediante microfiltro de 0,45µm (Millex®-HA). La concentración de Cd, Pb y Cu de los filtrados se midió mediante espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer Analyst 800) con llama o cámara de grafito, según la concentración de metal. El ensayo se realizó con cuatro repeticiones.

### **3.3. Análisis estadístico y generación de gráficos**

Los datos fueron analizados estadísticamente usando el programa SPSS (Statistical Package Social Science / Statistical Product and Service Solutions) v. 13.0. Las medias fueron comparadas usando ANOVA de un factor con el test de Duncan con una significación  $p = 0,05$ , utilizando el error estándar para determinar la variabilidad de las medias. Los gráficos se elaboraron con el programa Sigmaplot 10.0 o con Microsoft Excel XP.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización de los suelos ensayados. Distribución de metales pesados

Se trata de dos suelos de textura gruesa, muy arenosos, con muy poco porcentaje de arcilla (Tabla 19), con lo que su capacidad de intercambio catiónico es baja. El contenido de materia orgánica es también muy bajo en ambos suelos, debido principalmente a que son zonas donde crece muy poca vegetación, y por lo tanto tampoco son frecuentadas por la fauna autóctona. Aunque para un suelo este nivel tan bajo es un inconveniente, para nuestros ensayos puede ser beneficioso, ya que así habrá pocas interferencias entre el CAC aportado y la materia orgánica ya existente en el suelo. Además, estos niveles de degradación son muy comunes en zonas mineras abandonadas, por lo que los resultados podrán ser más extrapolables a otros emplazamientos.

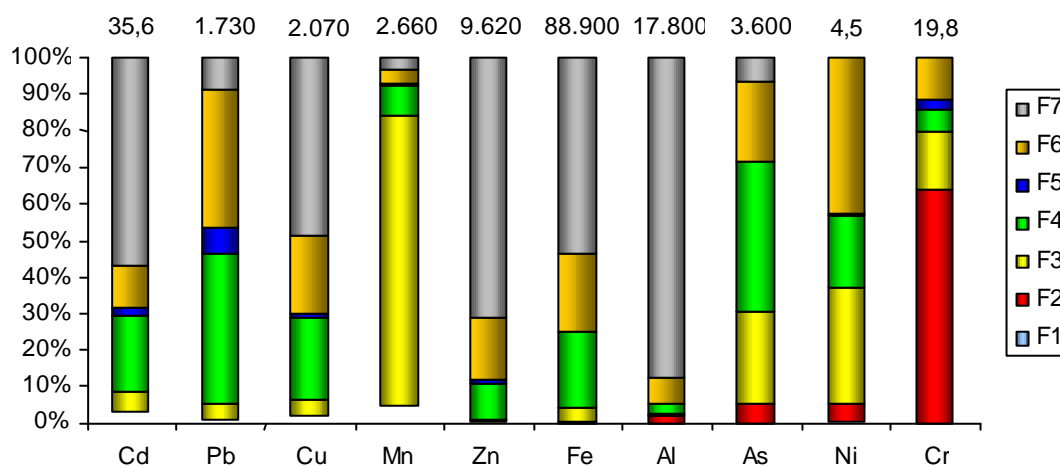
**Tabla 19.** Propiedades fisicoquímicas de los suelos estudiados. B y G son los suelos de Bustarviejo y de Garganta de los Montes respectivamente

Análisis		Suelos	
		B	G
Textura (%)	Arena	89,8	91,4
	Limo	3,8	4,2
	Arcilla	6,4	4,4
pH		4,3	5,8
Cationes intercambiables (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	Ca	0,41	290
	Mg	0,11	0,52
	K	1,28	1,46
	Na	0,02	0,28
Materia orgánica (%)		0,1	0,47
CIC (cmol <sub>c</sub> /kg)		8,3	6,8
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (g kg <sup>-1</sup> )		62,4	20,0
MnO (g kg <sup>-1</sup> )		3,03	0,14

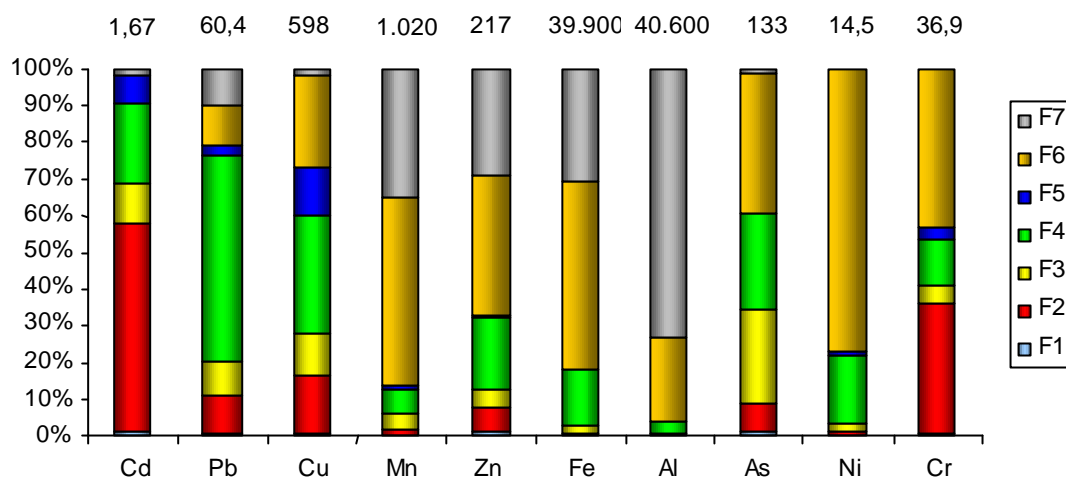
Son suelos ácidos, aunque en el suelo B la acidez es más acusada. Estos valores de pH junto con la textura gruesa que facilita el drenaje, han hecho que los pocos cationes de cambio que hubiera se lavaran con facilidad, con lo que nos encontramos con unos niveles bastante bajos de todos ellos (Coppin y Bradshaw, 1982; Cadahía et al., 2005).

Los óxidos de Fe y Mn son una fracción muy importante en la retención de metales pesados. Poseen una superficie específica muy elevada y grupos OH que les confieren una capacidad de adsorción de iones considerable. Además, esta retención se aumenta al incrementar el pH (Shuman, 1977). A priori, el suelo B tendría más capacidad que el G para adsorber metales pesados ya que su concentración en óxidos es mayor, pero el pH es muy bajo, por lo que es posible que este efecto esté más limitado que en el suelo G.

La concentración y distribución de metales pesados y arsénico se muestra en las Figuras 37 y 38. Los resultados se obtuvieron mediante una extracción secuencial propia de suelos de minas de sulfuro, según el método descrito por Dold y Fontboté (2000). Esta extracción separa el contenido total en las siete fracciones ya descritas en el apartado VII. 3.1.3.



**Figura 37.** Distribución en % de metales pesados y As en el suelo B (Bustarviejo) según la extracción secuencial Dold y Fontboté (2000). El número en la parte superior de cada barra representa la concentración total en mg Kg<sup>-1</sup>.



**Figura 38.** Distribución en % de metales pesados y As en el suelo G (Garganta de los Montes) según la extracción secuencial Dold y Fontboté (2000). El número en la parte superior de cada barra representa la concentración total en  $\text{mg kg}^{-1}$ .

De manera general se puede observar como el suelo B posee mayor concentración de metales que el suelo G, aunque éstos se encuentran distribuidos en fracciones más estables. Esto hace que aunque las concentraciones totales de metales en ambos suelos sean muy diferentes, la fracción biodisponible (F1+F2) se asemeje en cierto grado. Así el Cd en las dos primeras fracciones es  $1,03 \text{ mg kg}^{-1}$  para el suelo B y  $0,98 \text{ mg kg}^{-1}$  para el suelo G. En la Tabla 20 se muestran los valores de la suma de las dos primeras fracciones de la extracción secuencial llevada a cabo.

**Tabla 20.** Suma de las dos primeras fracciones de la extracción descrita por Dold y fontboté (2000) para los suelos de Bustarviejo (B) y Garganta de los Montes (G) ( $\text{mg kg}^{-1}$ ). Asociada mayoritariamente a la fracción biodisponible.

Suelo	Cd	Pb	Cu	Mn	Zn	Fe	Al	As	Ni	Cr
B	1,03	16,7	46	114	58,2	420	320	171	0,22	12,7
G	0,98	6,5	96	17,3	15,8	111	56	11,9	0,12	13,3

Así pues independientemente de la concentración total, a nivel de impacto medioambiental parece más justificado fijarse en éstos últimos datos que representan el riesgo más inmediato.

En la legislación existen varias referencias sobre los niveles máximos de metales pesados en suelos para diversos usos, sin embargo la mayoría de ellas se limitan a determinar el contenido total, pasando por alto el nivel de disponibilidad de cada metal.

En la Comunidad de Madrid existe legislación que determina los niveles genéricos de referencia (NGR) para metales pesados, orientados hacia la protección de la salud humana y también hacia la protección del ecosistema (Tabla 1). En esta ley se señala que los microorganismos, invertebrados y plantas de la zona deben estar adaptados genéticamente a los niveles de fondo de metales pesados (VR90), por lo que se asume que estos valores son los límites a partir de los cuales existiría un daño al ecosistema.

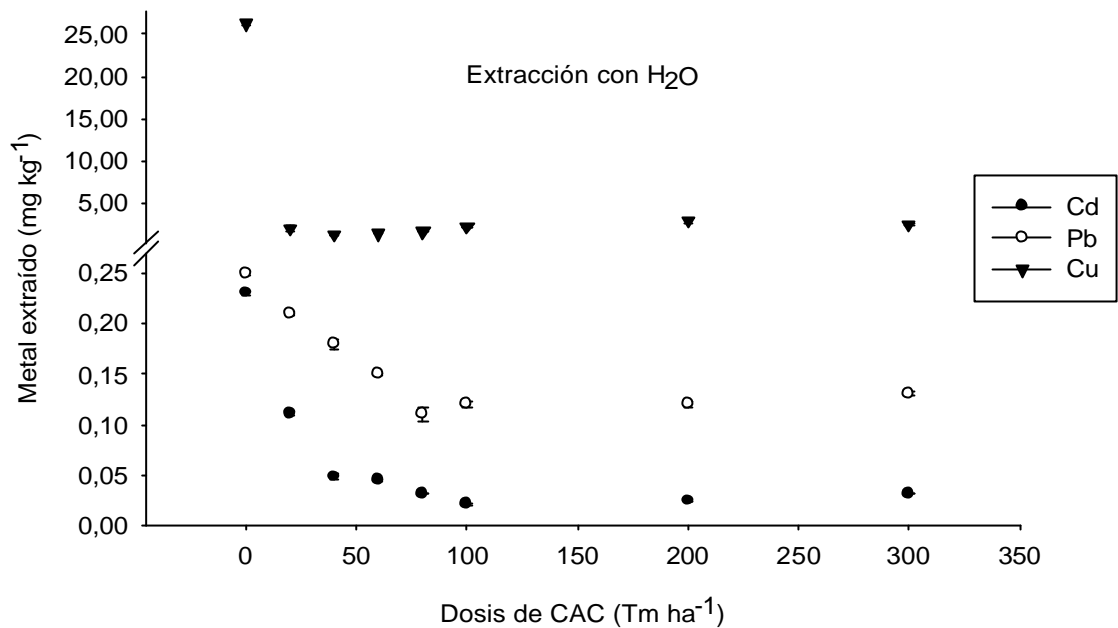
Según los criterios recopilados en la tabla 1, ambos suelos causarían por si mismos, daños al ecosistema (sus concentraciones de elementos traza superan los valores VR90). El contenido de metales pesados permitiría al suelo G ser destinado a usos urbanos, y al suelo B a usos industriales. Sin embargo, la concentración de As en ambos suelos, supera los valores establecidos. Así pues, según los criterios legislados por la Comunidad de Madrid en el año 2006, ambos suelos deberían ser descontaminados antes de destinarse a cualquier uso.

#### **4.2. Evaluación de la disponibilidad de Cd, Pb y Cu en un suelo enmendado con CAC. Estudio de dosis de enmienda**

Para comprobar el efecto del CAC sobre la biodisponibilidad de metales en suelos se escogió el de Bustarviejo, por ser el que mayor contaminación ofrecía. En un ensayo de agitación se hizo interaccionar dicho suelo con diferentes dosis de CAC (0, 20, 40, 60, 80, 100, 200 y 300 t ha<sup>-1</sup>). Una vez pasado el tiempo de incubación para permitir las reacciones, se extrajeron los metales con cuatro métodos distintos.

En la figura 39 se muestra la concentración de cada metal extraído con agua de un suelo enmendado con diferentes dosis.





**Figura 39.** Concentración de Cd, Pb y Cu extraído con agua del suelo B, enmendado con diferentes dosis de CAC. Las barras de error representan el error estándar. n = 4

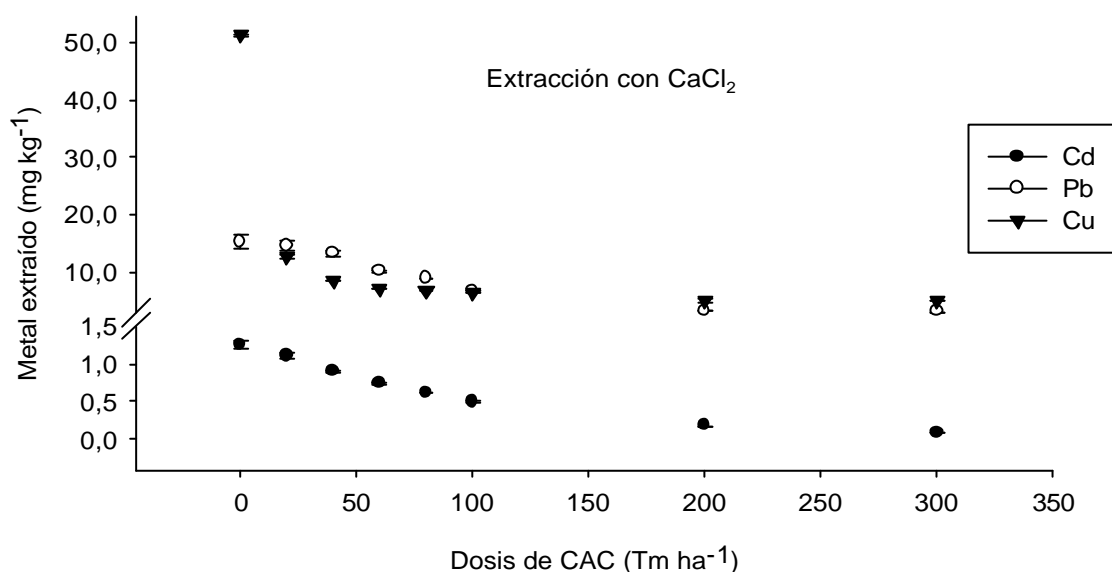
Se observa que a medida que se aumenta la dosis de CAC disminuye considerablemente la dosis de metal extraído, aunque cada uno a diferentes niveles. El tratamiento sin enmienda (0 t ha<sup>-1</sup> de CAC) se puede tomar como control, indicando el nivel de metal extraído del suelo sin tratar. En este sentido comprobamos como el Cu parece estar muy influenciado por la presencia de CAC. Con una dosis de CAC de sólo 20 t ha<sup>-1</sup>, la fracción soluble de Cu disminuye drásticamente, pasando de 25,9 mg kg<sup>-1</sup> a 2,3 mg kg<sup>-1</sup> (lo que supone una reducción del 93%). No se observan reducciones posteriores con dosis mayores de CAC. Esto corrobora los resultados obtenidos en el capítulo V, donde se comprobó, no solo la gran tendencia del Cu a retenerse en materiales orgánicos, sino que al ser capaz de adsorberse en numerosos grupos orgánicos, no hace falta una gran dosis de CAC para retenerlo.

En cuanto al Cd y Pb, en niveles mucho menores que el Cu, también sufren una retención mayor a medida que aumenta la dosis de CAC. Aunque en este caso es más paulatina. A partir de las dosis de CAC de 100 t ha<sup>-1</sup> la extracción de Cd y Pb se mantiene constante. Las dosis superiores no consiguen disminuir más la fracción de metal soluble en agua. En el estudio de isotermas de adsorción del Capítulo V, se comprobó como el CAC muestra más capacidad de retención de Cd y Cu, que de Pb. Este hecho también se refleja en este ensayo, donde a una dosis de 100 t ha<sup>-1</sup> (zona

estable) la extracción de Cd ha disminuido un 90% de la del tratamiento control, mientras que la del Pb lo ha hecho sólo hasta el 57 %. Estos datos son coherentes con los mostrados en la Tabla 12 donde el CAC mostraba un  $q_{\max}$  (capacidad máxima de adsorción) de Cd y Cu, más del doble de la del Pb.

La extracción con agua se hizo con el objetivo de representar los posibles riesgos en este suelo. Así pues, comprobamos que el suelo por si mismo tiene cierto potencial para lixiviar grandes cantidades de Cu, y un poco menores, aunque nada despreciables, de Cd y Pb. A una dosis aproximada de  $100 \text{ t ha}^{-1}$  de CAC los tres metales disminuirían su concentración drásticamente en los lixiviados.

Pero la fracción hidrosoluble no es la única importante, ya que distintas actividades como un aporte de fertilizantes puede inducir procesos de intercambio catiónico que movilizarían más metal del esperado. Por ello se realizó el mismo ensayo pero usando una disolución de  $\text{CaCl}_2$  como extractante (Figura 40).



**Figura 40.** Concentración de metal extraído con  $\text{CaCl}_2$  del suelo B, enmendado con diferentes dosis de CAC. Las barras de error representan el error estándar,  $n = 4$ .

La introducción de un catión en la disolución extractante puede provocar procesos de intercambio catiónico que desplazarían los metales retenidos, consecuentemente los niveles observados son mayores que los de la extracción con agua. Esto se observa sobre todo, en los controles de suelo sin enmendar (Tabla 21).

Aún así el CAC provoca una dinámica de retención similar a la encontrada con la extracción con agua.

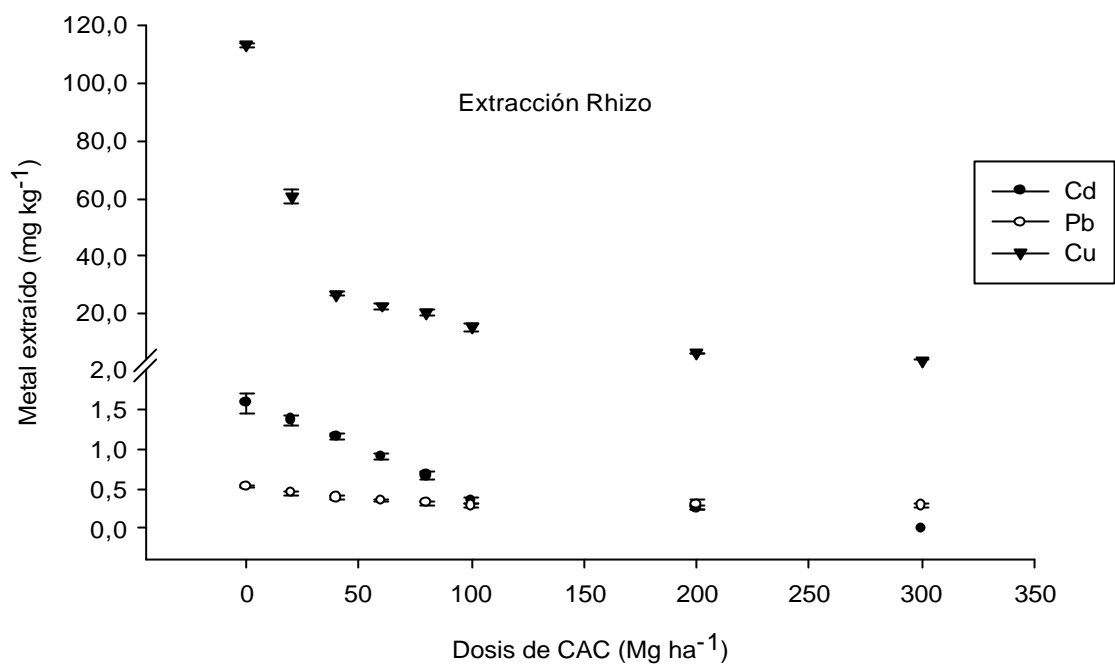
El Cu vuelve a mostrar una gran afinidad por el CAC disminuyendo drásticamente con el primer nivel de dosis ( $20 \text{ t ha}^{-1}$ ). Aunque en este caso, dosis mayores sí consiguen disminuir aún más la extracción.

La extracción con agua de Cd y Pb en el tratamiento control ( $0 \text{ t ha}^{-1}$  de CAC) era bastante similar, sin embargo al utilizar el  $\text{CaCl}_2$  el Pb está mucho más presente, extrayéndose  $15,2 \text{ mg Kg}^{-1}$ , mientras que este valor para el Cd es de  $1,3 \text{ mg kg}^{-1}$ . Esto es debido, principalmente, a que, según se muestra en la Figura 37, el Pb en el suelo de la mina de Bustarviejo es mucho más abundante que el Cd ( $1.730 \text{ mg kg}^{-1}$  de Pb frente  $35,6 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd). Las fracciones solubles en agua son similares ( $0,10$  y  $0,19 \text{ mg kg}^{-1}$  para Pb y Cd respectivamente), mientras que las fracciones asociadas a intercambio catiónico diferían sensiblemente ( $16,6$  y  $0,8 \text{ mg kg}^{-1}$  para Pb y Cd respectivamente). Aún con estas diferencias, ambos metales se retienen con una dinámica parecida según se va aumentando la dosis de CAC.

Si expresamos los datos de la Figura 40 en porcentajes, comprobamos que el Cu, a una dosis máxima de CAC de  $300 \text{ t ha}^{-1}$  disminuye hasta un 9,9 % del control, el Pb lo hace hasta el 21 % y el Cd hasta el 7,2 %.

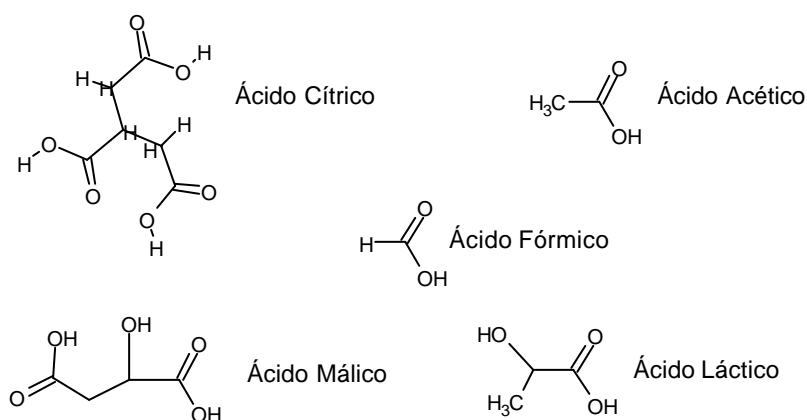
Así pues, al igual que con la extracción con agua, el Cd y el Cu extraídos con  $\text{CaCl}_2$  son proporcionalmente los más afectados por la enmienda del CAC, mientras que el Pb está proporcionalmente menos retenido.

En ensayos anteriores (V.4.3) se introdujeron los ácidos orgánicos de bajo peso molecular (LMWOA) como agentes extractantes capaces de formar complejos con metales. La utilización de estas moléculas pretende simular su presencia en la rizosfera ya que son segregados por raíces y determinados microorganismos (Fox y Comerford, 1990). En este sentido, se ensayó el método extractivo propuesto por Mu-Hua y col., (2005) (Figura 41) basado en una disolución compuesta por varios ácidos orgánicos (método descrito en el apartado VII.3.2.).



**Figura 41.** Concentración de metal extraído con el método Rhizo del suelo B, enmendado con diferentes dosis de CAC. Las barras de error representan el error estándar, n = 4.

Al igual que en extracciones anteriores, el aumento de la dosis de CAC provoca una disminución significativa en la cantidad de metal extraído. Aunque en este caso la concentración de metal extraído no se correlaciona con la cantidad de metal presente en el suelo. Los ácidos utilizados son de pequeño peso molecular, y todos ellos deben su acidez a la presencia de grupos carboxílicos (Figura 42).

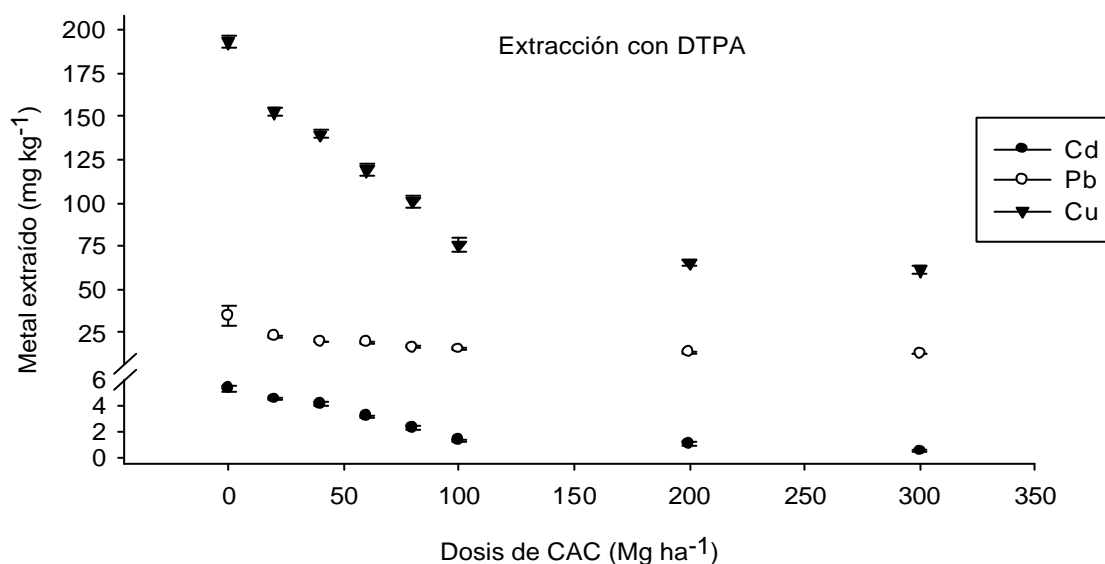


**Figura 42.** Fórmula de los ácidos usados en el método extractivo Rhizo.

Tal como se vio en el capítulo V, el Cd posee una gran afinidad por los grupos carboxílicos, de hecho, estos grupos eran los principales responsables de la adsorción de este metal en el CAC. Por ello, el método Rhizo utilizado en este ensayo muestra una concentración de Cd superior a la observada con la extracción con  $\text{CaCl}_2$  en los controles y a dosis bajas de CAC (Tabla 21 y Figura 41). Este efecto también se ve en el caso del Cu, el cual, como ya se ha comentado anteriormente, muestra una alta capacidad de retenerse sobre muy diversos grupos orgánicos. En cambio, el Pb es extraído en mucha menor concentración que con el  $\text{CaCl}_2$  (Tabla 21), ya que este metal no presentaba tanta afinidad como los anteriores, por los grupos carboxílicos.

Respecto a la dosis de CAC, se vuelve a comprobar como a partir de  $100 \text{ t ha}^{-1}$  la curva se hace mucho más estable, indicando que mayores dosis no promueven mayor retención.

Por último, se realizó el mismo ensayo pero utilizando una disolución extractante que contenía  $\text{DTPA}/\text{CaCl}_2$  (Figura 43), la cual ha sido también descrita como indicadora de la biodisponibilidad del metal (Haq y col., 1980; Norvell y col., 1984).



**Figura 43.** Concentración de metal extraído con  $\text{DTPA}/\text{CaCl}_2$  del suelo B, enmendado con diferentes dosis de CAC. Las barras de error representan el error estándar,  $n = 4$ .

Con la extracción de DTPA se observa que los niveles son mucho mayores que con el resto de métodos extractivos (Tabla 21). Esta diferencia se observa en todas las dosis de enmienda de CAC, aunque es más acusada entre los tratamientos control. El Cu

está en concentraciones más elevadas, seguido del Pb y del Cd. En este caso, los niveles de extracción si se relacionan con la concentración de metal en el suelo. Como ocurría en todos los métodos, la dosis de 100 t ha<sup>-1</sup> parece ser un punto de inflexión a partir del cual la retención tiende a permanecer constante.

**Tabla 21.** Resumen de las concentraciones de metal extraído del suelo B enmendado con 0 y 300 t ha<sup>-1</sup> de CAC según la disolución extractante utilizada. Letras diferentes representan diferencias significativas entre disoluciones extractantes, P = 0,05, n = 4.

metal extraído,( mk kg <sup>-1</sup> ) Dosis de CAC (t ha <sup>-1</sup> )	Cd		Pb		Cu	
	0	300	0	300	0	300
H <sub>2</sub> O	0,23 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,13 <sup>a</sup>	26,3 <sup>a</sup>	2,25 <sup>a</sup>
CaCl <sub>2</sub>	1,25 <sup>b</sup>	0,09 <sup>a</sup>	15,2 <sup>c</sup>	3,12 <sup>b</sup>	51,9 <sup>b</sup>	5,21 <sup>b</sup>
Rhizo	1,58 <sup>c</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,56 <sup>b</sup>	0,28 <sup>a</sup>	113 <sup>c</sup>	4,01 <sup>b</sup>
DTPA	5,24 <sup>d</sup>	0,43 <sup>b</sup>	34,6 <sup>d</sup>	12,9 <sup>c</sup>	193 <sup>d</sup>	61,2 <sup>c</sup>

## 5. CONCLUSIONES

- Los suelos estudiados procedentes de las minas de Bustarviejo y Garganta de los Montes están, *a priori*, poco acondicionados para mantener una cubierta vegetal saludable. Poseen una estructura muy arenosa con niveles muy bajos de materia orgánica y de nutrientes. Además las concentraciones totales de Cd, Pb, y As son muy elevadas en el suelo de Bustarviejo, siendo unas 30 veces más bajas en el suelo de Garganta de los Montes. El nivel de Cu es alto en ambos suelos. Aún con estas diferencias de concentraciones totales, las fracciones intercambiables de Cd y Pb son similares en ambos suelos,
- El CAC aplicado sobre el suelo de Bustarviejo consigue retener (en condiciones de agitación) la mayor parte del Cd, Pb y Cu liberados por el suelo. El CAC ofrece una capacidad de adsorción suficiente como para retener metales frente a extractantes como agua destilada, disolución de  $\text{CaCl}_2$ , o una mezcla de ácidos orgánicos. Sin embargo el CAC muestra una afinidad menor por los metales que la que presenta el agente quelante DTPA.
- Generalmente a mayor dosis de CAC se consigue mayor retención de metales, sin embargo, dosis mayores de  $100 \text{ t ha}^{-1}$  no incrementan significativamente la eficacia del proceso.
- Si extrapolásemos las conclusiones de este ensayo a condiciones agronómicas, podríamos presuponer que el aporte de CAC a un suelo contaminado disminuiría notablemente la concentración de metales disponible, evitando su lixiviación.

VIII. EVALUACIÓN DEL  
EFECTO DE LA APLICACIÓN DE  
CAC SOBRE SUELOS ÁCIDOS  
DE MINA  
CULTIVO DE *A. halimus*.



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	126
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	130
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b> .....	131
3.1. Ensayo de selección de plantas autóctonas frente al estrés por presencia de Cd	131
3.2. Evaluación de la disponibilidad de metales pesados en dos suelos mineros enmendados con CAC. Cultivo de <i>Atriplex halimus</i> en invernadero .....	134
3.3. Análisis estadístico y generación de gráficos .....	136
<b>4. RESULTADOS</b> .....	137
4.1. Selección de plantas autóctonas frente al estrés por presencia de Cd .....	137
4.2. Evaluación de la disponibilidad de metales pesados en dos suelos contaminados enmendados con CAC. Cultivo de <i>Atriplex halimus</i> en invernadero .....	141
4.2.1. Evolución del pH del suelo .....	141
4.2.2. Fraccionamiento de metales en suelo. Extracción Tessier .....	143
4.2.3. Evaluación de metales en lixiviados .....	145
4.2.4. Concentración de metales en planta .....	148
4.2.5. Peso de plantas.....	154
<b>5. CONCLUSIONES.</b> .....	159

## VIII. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE CAC SOBRE SUELOS ÁCIDOS DE MINA. CULTIVO DE *Atriplex halimus*

### 1. INTRODUCCIÓN

Generalmente las condiciones existentes en zonas de minas abandonadas son adversas para el desarrollo de la vida vegetal y animal. La desestructuración, bajo pH y elevada contaminación del suelo, entre otros factores, provocan la pérdida de coloides edáficos, la degradación de los suelos y una inevitable disminución de la vegetación y de la fauna (He y col., 2005; Vega y col., 2006).

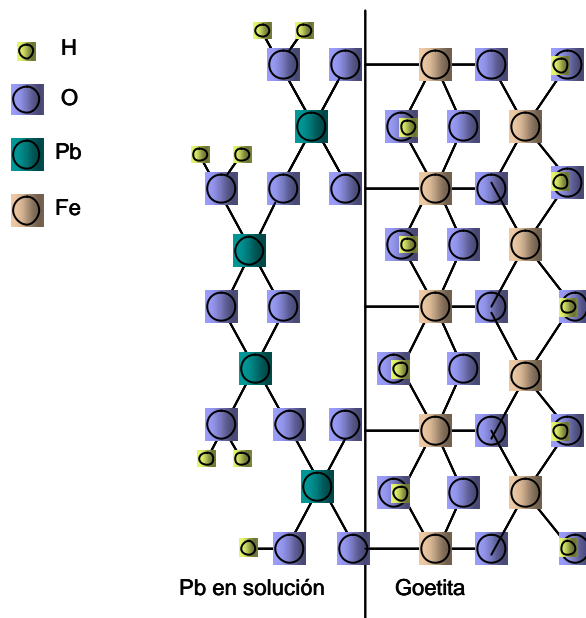
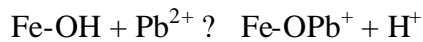
Dentro de cada suelo, la distribución de los metales unidos a diferentes fracciones, determina la toxicidad real del metal. Comúnmente se asume que los metales asociados a fracciones hidrosolubles e intercambiables están biodisponibles (accesible para las plantas) y posiblemente lixiviables. Los asociados a carbonatos, óxidos o materia orgánica se consideran potencialmente biodisponibles, mientras que los retenidos en la fase mineral no se consideran accesibles para las plantas (Ma y Rao, 1997; He y col., 2005).

Así pues, las fracciones de mayor riesgo para el ecosistema son las disponibles, donde los metales se encuentran débilmente retenidos en la fase sólida del suelo. Las fracciones asociadas a carbonatos o a materia orgánica suelen ser muy escasas en suelos ácidos de mina. Sin embargo, los diferentes óxidos y minerales de la arcilla poseen una gran superficie de adsorción (Tabla 22) y una carga neta nada despreciable, jugando un papel importante en la retención de metales.

**Tabla 22.** Área superficial de diferentes minerales del suelo. (Porta y col., 1999)

Mineral	Área superficial (m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )
Caolinita	7-30
Illita	65-100
Montmorillonita	700-800
Óxidos de Fe ,Mn	30-300
Goetita	40-80

Por ejemplo, la adsorción de plomo por parte de un hidróxido de Fe, la Goetita, puede ser descrita como un proceso del tipo (Figura 44):



**Figura 44.** Esquema de la adsorción de Pb por el mineral de Fe Goetita (Williams, 2001).

Además esta retención varía con el pH ya que los protones también tienen capacidad de ser adsorbidos en estas superficies (Parfitt, 1981).

Así pues el riesgo que supone la presencia de metales pesados en un suelo no depende únicamente de la concentración total, sino de la fracción disponible para el ecosistema, resultante de toda una serie de reacciones complejas.

La toxicidad de los metales pesados está causada frecuentemente por la imposibilidad del organismo afectado para mantener los niveles necesarios de excreción. El proceso se agrava durante el paso por los distintos eslabones de la cadena

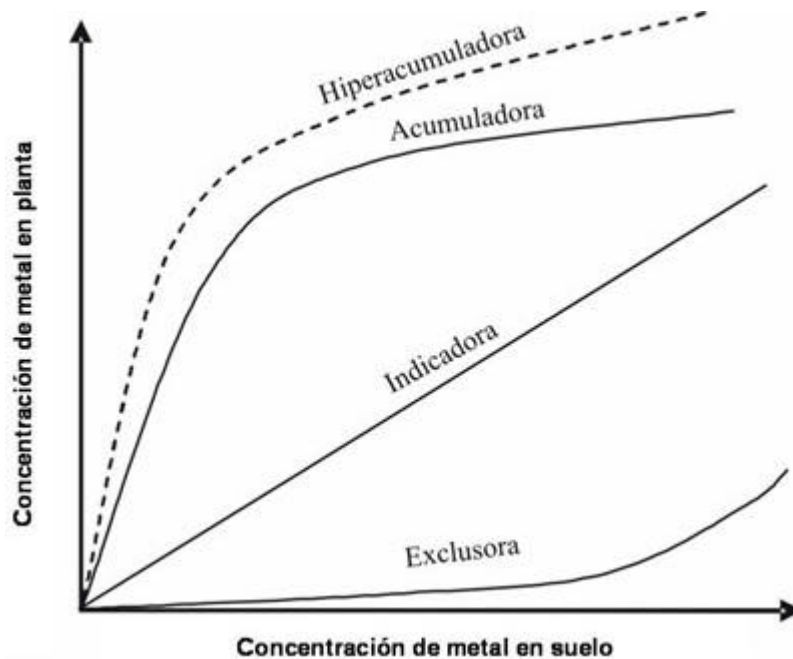
trófica, debido a que los niveles de incorporación sufren un fuerte incremento (biomagnificación), siendo en los superiores donde se hallan los mayores niveles de contaminantes (Kabata-Pendias, 2004).

El principal problema de los metales en planta es su elevada capacidad para unirse a ligandos orgánicos. Como resultado se producen interacciones con proteínas con inhibición de la actividad o disrupción en la estructura de las mismas, el desplazamiento de elementos esenciales de su metabolismo estándar, y la catálisis de reacciones de generación de radicales que provocan fenómenos de estrés oxidativo (Kabata-Pendias, 1995).

Como respuesta natural, las plantas y el ecosistema han desarrollado ciertos mecanismos de defensa que reducen la toxicidad de los metales pesados. Dependiendo del caso podemos encontrar procesos de filtración por micorrizas, alteración de membranas celulares, compartimentación vacuolar, biotransformación de elementos tóxicos en moléculas menos tóxicas, o exclusión de los metales pesados (Kabata-Pendias y col, 2001).

Muchas especies vegetales toleran elevadas concentraciones de metales en el suelo porque restringen su absorción y/o translocación hacia las hojas. Esto les permite mantener concentraciones de metal constantes y relativamente bajas en la biomasa aérea, independientemente de la concentración de metal en el suelo (estrategia de exclusión según Baker, 1981). Sin embargo, otras especies absorben activamente los metales del suelo y los acumulan en formas no tóxicas en su biomasa aérea (estrategia acumuladora). Una respuesta intermedia es la que presentan las plantas indicadoras, en las que la concentración de metales tiende a reflejar la del suelo (Baker, 1981) (Figura 45).

El término “hiperacumuladora” fue acuñado por Brooks y Reeves para referirse a plantas desarrolladas en campo, capaces de acumular más de 1.000 mg Ni kg<sup>-1</sup> de materia seca en ciertos tejidos de su biomasa aérea (Brooks et al., 1977). De forma general, las hiperacumuladoras alcanzan concentraciones de metales en hojas entre 10 y 100 veces las concentraciones “normales” (Chaney et al., 2000). Actualmente se utiliza el término hiperacumuladora de metales para designar plantas que acumulan más de 10.000 mg kg<sup>-1</sup> de Mn y Zn, de 1.000 mg kg<sup>-1</sup> de Co, Cu, Pb, Ni, As y Se y de 100 mg kg<sup>-1</sup> de Cd.



**Figura 45.** Modelos de planta en función de su respuestas frente a la presencia de metales pesados en el suelo (Adriano, 2001).

Existen básicamente dos teorías que explican este metabolismo aparentemente anómalo. La más aceptada es que son plantas adaptadas genéticamente a crecer en ambientes contaminados con lo que han desarrollado mecanismos de detoxificación internos muy eficientes. Otra teoría más reciente, afirma que la acumulación de metales en gran cantidad es una estrategia vegetal de defensa frente a herbívoros o agentes patógenos (Behmer y col., 2005; Poschenrieder y col., 2006; Salt, 2006).

Hasta la actualidad, se han identificado aproximadamente 400 especies hiperacumuladoras, distribuidas entre 45 familias, lo que representa sólo un 0,2 % de las angiospermas (Baker y col., 2000; McGrath y Zhao, 2003). No obstante, la lista sigue creciendo con nuevas citas.

Sin embargo, la utilización de este tipo de plantas en técnicas fitoextractivas en zonas de mina no es siempre lo más indicado. Encontrar una especie autóctona, hiperacumuladora, perenne y que genere gran biomasa no suele ser fácil, ya que la mayoría de las especies tienden más a comportamientos exclutores (Baker y col., 2000).

Por ello, para la recuperación de suelos de minas abandonadas se están implementando técnicas que estabilicen los metales en el suelo y permitan la revegetación. En este sentido, hay varios estudios en los que se comprueba como determinadas enmiendas orgánicas consiguen mejorar las propiedades fisicoquímicas de suelos mineros, permitiendo una cubierta vegetal que poco a poco regenera el ecosistema (Mingxing y col, 2001; Winter y col., 2002).

## **2. OBJETIVOS**

En este último capítulo se pretende abordar dos de los principales problemas medioambientales que concurren en las zonas mineras abandonadas: la extensión de la contaminación de metales al subsuelo y a zonas colindantes, y la escasez de vida vegetal.

Para ello, en primer lugar, se seleccionará una planta autóctona capaz de adaptarse a la presencia de elevadas concentraciones de metales pesados y que genere una gran biomasa. Un mayor crecimiento de la planta permitirá una mayor exploración radicular del suelo y una mejor observación de los efectos de los metales pesados. Esta planta se usará como indicador biológico de la biodisponibilidad de metales en el siguiente ensayo.

En segundo lugar se comprobará el efecto del CAC sobre la biodisponibilidad de metales pesados en los suelos estudiados en el capítulo VII. Se usarán varias dosis de enmienda (seleccionadas de los resultados del capítulo VII) y se comprobará el efecto sobre la especie seleccionada anteriormente y sobre los lixiviados.

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Ensayo de selección de plantas autóctonas frente al estrés por presencia de Cd

Con el objetivo de seleccionar una planta tolerante a metales pesados para su estudio en suelos contaminados, se diseñó un ensayo donde se comparó la respuesta de cuatro especies a la presencia de Cd en el medio de cultivo. Se seleccionó el Cd como metal contaminante por su elevada movilidad y por ser considerado uno de los más tóxicos. Se escogieron plantas autóctonas de la zona del Mediterráneo y que crecían de forma natural en el entorno de la Comunidad de Madrid. Este factor es importante ya que la incorporación de una especie foránea en un ecosistema puede desembocar en desequilibrios medioambientales. Por otro lado, las especies debían ser tolerantes a la presencia de metales pesados, ya que iban a ser transplantadas a suelos de mina. Además debían ser de hoja perenne para no dispersar la contaminación, y capaces de desarrollarse con relativa rapidez en zonas semiáridas de suelos desestructurados.

Según estos criterios se seleccionaron las siguientes cuatro especies;

##### *Atriplex halimus* L. (Orzaga)

Planta perenne de 1-3 m, arbustiva. Ramificada desde la base y de aspecto grisáceo, muy rústica. Soporta intensas sequías y tolera heladas de hasta -12°C. Crece en terrenos desérticos, salinos o yesosos. Es de distribución mediterránea, común en los saladares de



la Península Ibérica. Se cultiva como arbusto forrajero en áreas áridas y semiáridas. En la Comunidad de Madrid es frecuente encontrarla en la zona sur, en la reserva de Mar de Ontígola (Aranjuez), donde los suelos son yesosos. La bibliografía muestra un posible aprovechamiento como planta fitoextractora de Cd y Zn (Lutts y col., 2004).

*Phillyrea angustifolia* L. (Olivilla)

Es una planta leñosa de gran desarrollo que alcanza los 2-3 m de altura. Las hojas son simples de 6 cm de longitud, opuestas y perennes de color verde oscuro y los márgenes dentados. Se encuentra fácilmente en bosques o matorrales, encinares, alcornoques, madroñales, brezales, jarales, etc. Requiere un clima suave, sin fuertes heladas, por lo que no suele ascender mucho en las montañas. Se cultiva como ornamental. Habita en la mitad occidental de la región mediterránea, y en la Península Ibérica es más frecuente en su mitad meridional, pero alcanza hasta la falda de los Pirineos.



*Rhamnus alaternus* L. (Aladierno)

Planta de aspecto arbustivo, leñosa y perenne que puede alcanzar hasta 8 m de altura. Se suele encontrar en lugares húmedos ligeramente sombríos, en matorrales, pedregales y setos. No se conocen preferencias de suelo o sustrato, comportándose bastante bien en cualquier tipo de ecosistema. Su desarrollo radicular es bajo pero muy eficiente, encontrándose a menudo en grietas de pedregales.



*Rosmarinus officinalis* L. (Romero)

Es una planta originaria de la región mediterránea, sobre todo de las áreas donde el suelo es especialmente seco, arenoso y rocoso. Es de carácter arbustivo, perenne, de hasta dos metros de altura. Debido a su alto contenido en aceites aromáticos se cultiva con frecuencia en jardines





y viveros. Recientemente, ha sido objeto de estudio por presentar cierta capacidad fitoestabilizadora de metales pesados en suelos moderadamente contaminados (Madejón y col., 2009).

Para someter a estas especies a una contaminación con Cd, se las cultivó, a partir de plántulas de un año, en un sustrato comercial contaminado con  $120 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd. El sustrato estaba compuesto a base de compost de corteza de pino, de pH ácido (4-5) y de probada eficacia como sustrato de cultivo. Se eligió este material por tener un pH similar al de los suelos de mina caracterizados en el capítulo VII, poca capacidad de retención de Cd (Tapia, 2007), y dejar así disponible el suficiente metal como para que las plantas expresen síntomas de toxicidad o de tolerancia.

La contaminación del material se realizó mediante la incorporación de una disolución de  $\text{CdSO}_4$  (relación 1:2 disolución:sustrato) y posterior mezclado. Se incubó a humedad constante (80 % capacidad de campo) durante cuatro semanas, previas al transplante.

El ensayo se llevó a cabo en régimen de umbráculo o semi-invernadero (Figura 46) en la Universidad Autónoma de Madrid. Se utilizó un espacio protegido que consta de una malla de rafia de polietileno con 50 % de sombreado. Se transplantaron 64 plantas por especie, la mitad en sustrato contaminado y la otra mitad en sustrato sin contaminar, en macetas de 1,6 L.

Las plantas se cultivaron durante 70 días, regándolas con agua a la demanda, según temperatura (entre 200 y 500 mL diarios), y recogiendo muestras de lixiviados y de disolución del suelo mediante sondas de succión (Sondas Rhizon SMS, 5 cm, Eijkelkamp). La concentración de Cd en lixiviados y en disolución del suelo se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica, bien por llama (límite de detección  $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ) o por cámara de grafito (límite de detección  $0,5 \mu \text{ L}^{-1}$ ), según la concentración observada (Perkin Elmer Analyst 800).

El muestreo de planta se realizó de forma destructiva al final del ensayo. Se sacaron las plantas de los tiestos y se separaron tallos, hojas y raíces. Cada parte se lavó por separado con sucesivos volúmenes de agua destilada. Posteriormente se secaron en estufa a  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  y se molieron hasta un tamaño inferior a 0,5 mm (molinillo IKA labortechnik).

Para la digestión, se pesaron 0,5 g de muestra seca a los que se les adicionó 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado, se agitó suavemente, y después de 15 minutos se agregó 3 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% volviendo a agitar suavemente. Se digirieron en un horno microondas (CEM, Mars Xpress), siguiendo el procedimiento descrito en la Tabla 23.

**Tabla 23.** Procedimiento de digestión de muestras vegetales en horno microondas.

<i>Etapas</i>	<i>Potencia (W)</i>	<i>Tiempo rampa (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tiempo de digestión (min)</i>
1	1.200	40	200	15
2	1.200	1	210	15
3	1.200	1	220	20

Se midió el Cd en los digeridos mediante espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer Analyst 800).



**Figura 46.** Aspecto del ensayo de selección de planta autóctona (sobre corteza de pino), 15 días después del transplante

### **3.2. Evaluación de la disponibilidad de metales pesados en dos suelos mineros enmendados con CAC. Cultivo de *Atriplex halimus* en invernadero**

Se utilizaron los suelos caracterizados en el apartado VII.3.1, provenientes de las minas de Bustarviejo (B) y de Garganta de los Montes (G), tamizados a 4 mm. Se aplicaron tres dosis de enmienda con CAC sobre ellos: Control (sin CAC), 40 t ha<sup>-1</sup> y 80

t ha<sup>-1</sup> de CAC. Estas dosis fueron elegidas según los resultados del ensayo descrito en el capítulo VII. Probablemente, dosis mayores de CAC podrían ofrecer mejores resultados, sin embargo, en las prácticas agrícolas, pocas veces se aportan más de 80 t ha<sup>-1</sup> de enmienda orgánica, debido a su costo. De este modo se ensayaron 6 tratamientos, B0, B40, B80, G0, G40 y G80, donde B y G son los suelos de Bustarviejo y Garganta de los Montes respectivamente, y el número que les acompaña es la dosis de CAC en t ha<sup>-1</sup>.

Los sustratos se prepararon mezclando cada suelo con la dosis correspondiente de CAC (según tratamiento) en una mezcladora industrial de 150 L de capacidad. A cada tratamiento se le incorporó un 25 % de arena de sílice de 2-5 mm de diámetro para evitar posibles encharcamientos.

Se utilizaron tiestos de 5 L de 30 cm de altura para permitir un buen desarrollo radicular en profundidad. En cada tiesto se transplantó una plántula de *A. halimus* de un año de edad procedentes del vivero Tortadés (Girona). Se utilizaron 12 plantas por tratamiento (Figura 47).

La duración del ensayo fue de 95 días. Los tiestos se regaron con agua (250-500 mL por tiesto y día) sin ningún tipo de fertilizante añadido para no interferir con los nutrientes del CAC. Se mantuvieron a una temperatura diurna entre 25-30 °C y nocturna, de 17-22 °C en el invernadero de la Universidad Autónoma de Madrid.

Durante el ensayo se recogieron los lixiviados mediante depósitos colocados debajo de cada tiesto. En ellos se midió el contenido de Cd, Pb y Cu mediante espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer Analyst 800), bien por llama o por cámara de grafito, según el nivel de detección requerido.

El muestreo de las plantas se hizo una vez cada mes, tomando cuatro plantas por tratamiento en cada muestreo. La metodología de procesado y digestión fue la misma que la seguida en el apartado 3.1 de este capítulo, con la diferencia de que en este caso no se diferenció entre tallo y hoja, sino que se consideró conjuntamente como parte aérea. En los digeridos se midió Cd, Pb y Cu, ya que eran los metales pesados que, bien por su toxicidad o como por su concentración en los suelos, podían suponer un riesgo para las plantas.

Se midió el pH del suelo de cada tratamiento en extracto 1:5 (v:v) al mismo tiempo que se muestreaba la planta (una vez al mes).

También se realizó una extracción tipo Tessier (tal y como se describe en el apartado 3.4.2. del capítulo IV) del suelo de los tratamientos control (G0 y B0), al inicio del ensayo, y de los tratamientos G80 y B80 al final del ensayo. De este modo se pretendía observar el efecto que ejerce el CAC sobre la distribución de metales en las distintas fracciones de los suelos.



**Figura 47.** Aspecto del cultivo de *A. halimus* sobre suelos de mina enmendados con CAC, un mes después del trasplante

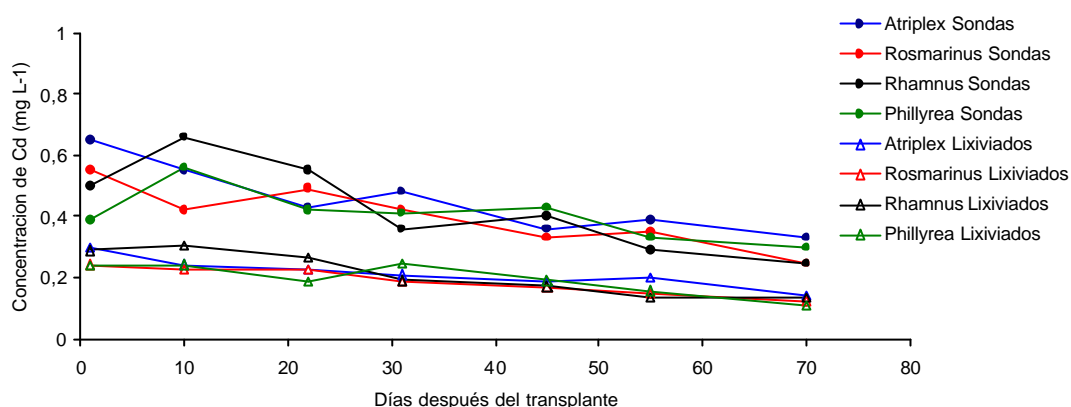
### **3.3. Análisis estadístico y generación de gráficos**

Los datos fueron analizados estadísticamente usando el programa SPSS (Statistical Package Social Science / Statistical Product and Service Solutions) v. 13.0. Las medias fueron comparadas usando ANOVA de un factor con el test de Duncan, con una significación  $p = 0,05$ , utilizando el error estándar para determinar la variabilidad de las medias. Los gráficos se elaboraron con el programa Sigmaplot 10.0 o con Microsoft Excel XP.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Selección de plantas autóctonas frente al estrés por presencia de Cd

En la Figura 48 se muestra la evolución de la concentración de Cd en los lixiviados, así como en la disolución del suelo extraída mediante sondas de succión.



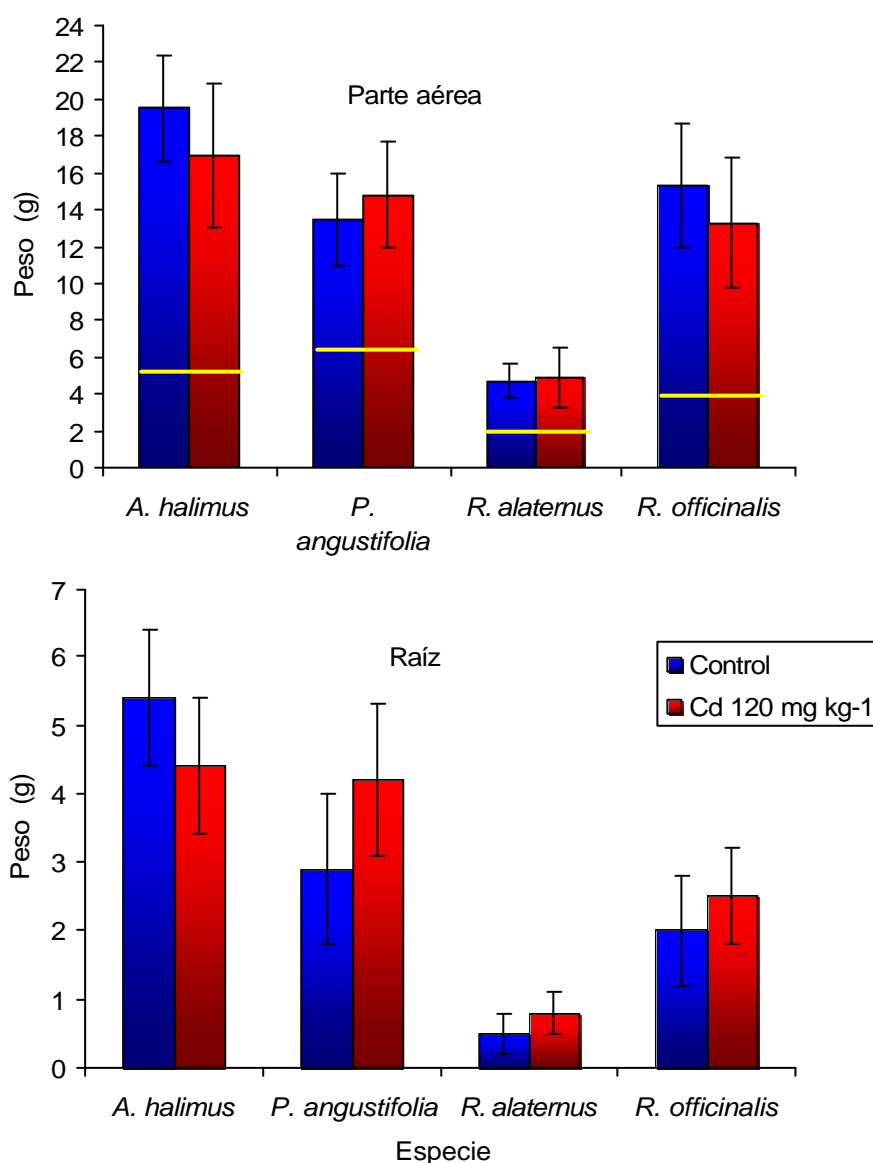
**Figura 48.** Concentración de Cd en lixiviados y en disolución del suelo extraída con sondas de succión, de las diversas especies. n=4.

Aunque el gráfico de la Figura 48 no muestra el tratamiento estadístico (por complejidad de líneas), no se observaron diferencias significativas entre especies, pero si entre lixiviados y sondas de succión ( $p = 0,05$ ). Así pues, todas las plantas estaban sometidas a una concentración de Cd similar. El Cd presente en los lixiviados fue ligeramente menor al extraído por las sondas de succión, seguramente debido a un menor tiempo de contacto con el sustrato en el caso de los lixiviados (los suelos eran arenosos con gran facilidad para el drenaje). En ambos métodos se observó que al inicio del ensayo las concentraciones de Cd eran mayores que al final, ya que probablemente, la fracción soluble iba disminuyendo a medida que se sucedían los riegos.

Algunos autores estiman que para averiguar si una planta es o no tolerante al Cd hace falta someterla a una concentración en hidroponía (donde el Cd está totalmente disponible) cercana a  $3 \text{ mg L}^{-1}$  (Markovsca y col., 2009; Zhu, 1999). Sin embargo, esas condiciones raras veces se dan en suelos contaminados. Por ello escogimos un sustrato con un nivel de contaminación tal, que dejara un Cd disponible similar al que

encontraríamos más tarde en los suelos ensayados. Estudios previos (apartado VII.4.1) mostraron que los lixiviados de los suelos de Bustarviejo y Garganta de los Montes mostraban unas concentraciones entre 0,01 y 0,4 mg L<sup>-1</sup> de Cd. Por lo tanto, los niveles de Cd a los que estábamos exponiendo a las plantas en este ensayo (entre 0,2 y 0,6 mg L<sup>-1</sup> de Cd) no distaban mucho de los que se encontrarían si se desarrollaran en los suelos de mina propuestos.

A los 70 días de cultivo se muestrearon las plantas midiendo su biomasa y la concentración de Cd en raíz, tallo y hoja, En la Figura 49 se muestra el peso de raíz y parte aérea.



**Figura 49.** Peso seco de parte aérea y raíz a los 70 días de cultivo. Las barras de error representan desviación estándar de la media, n=12. La línea amarilla horizontal representa el peso seco de la parte aérea al inicio del ensayo.

Según la Figura 49, ninguna especie mostró diferencias significativas entre la biomasa del tratamiento control y el contaminado ( $p = 0,05$ ). Tampoco se observaron síntomas visuales de toxicidad o estrés en las plantas.

La especie *A. halimus* fue la que más se desarrolló, tanto en su parte aérea como en su raíz (de media, la biomasa de la parte aérea incrementó un 290% respecto al momento de transplante). La especie *R. alaternus* fue la que menos biomasa generó (con un incremento medio respecto al momento de transplante del 125%), con un desarrollo radicular mínimo que no consiguió explorar la totalidad del tiesto de cultivo. *R. officinalis* y *P. angustifolia* se desarrollaron de manera similar con un incremento medio de biomasa aérea del 230 % y 210 %, respectivamente.

La concentración de Cd en planta a los 70 días de cultivo se muestra en la Tabla 24, donde se separan tallo, hoja y raíz. Esta separación se realizó para comprobar en que parte de la planta tendían a acumular el metal tóxico.

**Tabla 24.** Concentración de Cd en los distintos órganos de las especies estudiadas, a los 70 días de cultivo. FT es el factor de traslocación ( $[\text{Cd}]_{\text{P.aérea}}/[\text{Cd}]_{\text{raíz}}$ ) (Ali y col., 2002; Monni y col., 2000). Letras diferentes representan diferencias significativas entre especies,  $p = 0,05$ , test de Duncan  $n = 12$ . L.D. Límite de detección

	<i>A.halimus</i>	<i>P.angustifolia</i>	<i>R. alaternus</i>	<i>R. officinalis</i>
órgano	mg Cd kg <sup>-1</sup> materia seca.			
hoja	34,7 <sup>a</sup>	<L.D.	4,4 <sup>b</sup>	7,5 <sup>b</sup>
tallo	35,2 <sup>a</sup>	11,3 <sup>b</sup>	7,5 <sup>b</sup>	12,9 <sup>b</sup>
raíz	20,6 <sup>c</sup>	108 <sup>ab</sup>	190 <sup>a</sup>	60,2 <sup>b</sup>
FT	3,4 <sup>a</sup>	0,10 <sup>c</sup>	0,06 <sup>c</sup>	0,34 <sup>b</sup>

El comportamiento de acumulación de metal en cada especie se muestra muy diferente. Así, la *P. angustifolia* y *R. alaternus*, con unos factores de traslocación bajos, apenas transportan el Cd hacia las hojas, localizándolo mayoritariamente en las raíces, y una mínima parte en el tallo (Tablas 24 y 25). La especie *R. officinalis* muestra un comportamiento similar aunque transporta más metal hacia la parte aérea. Esta dinámica acumulativa de metales, se supone adecuada para plantas utilizadas en técnicas de fitoestabilización, es decir, plantas que consiguen acumular el metal en sus raíces.

Posiblemente se trate de plantas exclusoras (Figura 45), que en presencia de metales tóxicos, activan mecanismos que evitan la traslocación de éstos hacia la parte aérea. Aunque todas las especies son de hoja perenne, suelen perder hojas al cabo del tiempo, o en momentos de estrés. Por ello, el hecho de no transportar el Cd hacia la parte aérea es un factor positivo en la fitoestabilización, evitando así cualquier dispersión del contaminante.

**Tabla 25.** Cantidad total de Cd ( $\mu\text{g}$ ) en los distintos órganos de las especies estudiadas, a los 70 días de cultivo. Letras diferentes representan diferencias significativas entre especies,  $p = 0,05$ , test de Duncan  $n = 12$ .

	<i>A.halimus</i>	<i>P.angustifolia</i>	<i>R. alaternus</i>	<i>R. officinalis</i>
órgano	$\mu\text{g}$ Cd en materia seca (% de Cd respecto al total)			
Hoja	267 <sup>a</sup> (39)	---	12 <sup>c</sup> (7)	69 <sup>b</sup> (25)
Tallo	324 <sup>a</sup> (48)	93 <sup>b</sup> (17)	16 <sup>b</sup> (9)	53 <sup>b</sup> (20)
Raíz	91 <sup>b</sup> (13)	453 <sup>a</sup> (83)	152 <sup>b</sup> (84)	151 <sup>b</sup> (55)
Total	682 <sup>a</sup>	545 <sup>a</sup>	181 <sup>b</sup>	272 <sup>b</sup>

Por el contrario, la especie *A. halimus* muestra un comportamiento totalmente distinto a las otras tres especies. La mayor parte del metal se encuentra en la parte aérea, repartiéndose por igual entre tallo y hoja. Una concentración menor se obtiene en la raíz. Este comportamiento también fue observado por Lutts y col. (2004) quienes encontraron que la especie *A. halimus* no sólo era capaz de absorber grandes cantidades de Cd y Zn, sino que tenía gran facilidad por acumularlo en los brotes, y en menor medida, en las hojas. En condiciones de hidroponía, encontraron una concentración máxima de Cd en brote de  $1.250 \text{ mg kg}^{-1}$  de materia seca. Estos autores atribuyeron este hecho a que esta especie, extremadamente halófila (con unos mecanismos eficaces de detoxificación de sales), tiende a inmovilizar los metales como sales de oxalato. Según sus estudios, este proceso tiene lugar preferentemente en las hojas y brotes. Los mismos autores indicaron, que esta especie sería una buena opción en técnicas de fitoextracción, ya que es capaz de acumular gran parte de metal en parte aérea y de generar una gran biomasa ( $5 \text{ t ha}^{-1}$ ).



Considerando el gran desarrollo de la especie *A. halimus* y su notoria respuesta a la presencia de metales pesados, se concluyó que sería la especie adecuada para llevar a cabo el ensayo con planta, donde se evaluará la disponibilidad de metales en suelos contaminados, enmendados con CAC de CAC. Esta planta se usará como indicadora de la biodisponibilidad de metales en suelo. Su elevado desarrollo radicular le permitirá explorar gran parte del suelo, y su sensible respuesta a la presencia de metales nos debería indicar el nivel de contaminación al que se enfrenta.

#### **4.2. Evaluación de la disponibilidad de metales pesados en dos suelos contaminados enmendados con CAC. Cultivo de *Atriplex halimus* en invernadero**

En este apartado se propone el uso del CAC para enmendar dos suelos con diferente nivel de contaminación (suelo de la mina de Bustarviejo (B) y de la mina de Garganta de los Montes (G)), donde se cultivará la especie *A. halimus*. Los tratamientos ensayados son los siguientes:

1. B0: Suelo de Bustarviejo control, sin enmienda de CAC
2. B40: Suelo de Bustarviejo enmendado con 40 t ha<sup>-1</sup> de CAC
3. B80: Suelo de Bustarviejo enmendado con 80 t ha<sup>-1</sup> de CAC
4. G0: Suelo de Garganta de los Montes control, sin enmienda
5. G40: Suelo de Garganta de los Montes enmendado con 40 t ha<sup>-1</sup> de CAC
6. G80 Suelo de Garganta de los Montes enmendado con 80 t ha<sup>-1</sup> de CAC

En este ensayo se estudió el efecto del CAC sobre el pH de los suelos, la distribución de Cd, Pb y Cu en las diferentes fracciones de éstos, la concentración de metales en lixiviados y sobre la absorción de metales y desarrollo de *A. halimus*.

##### 4.2.1. Evolución del pH del suelo

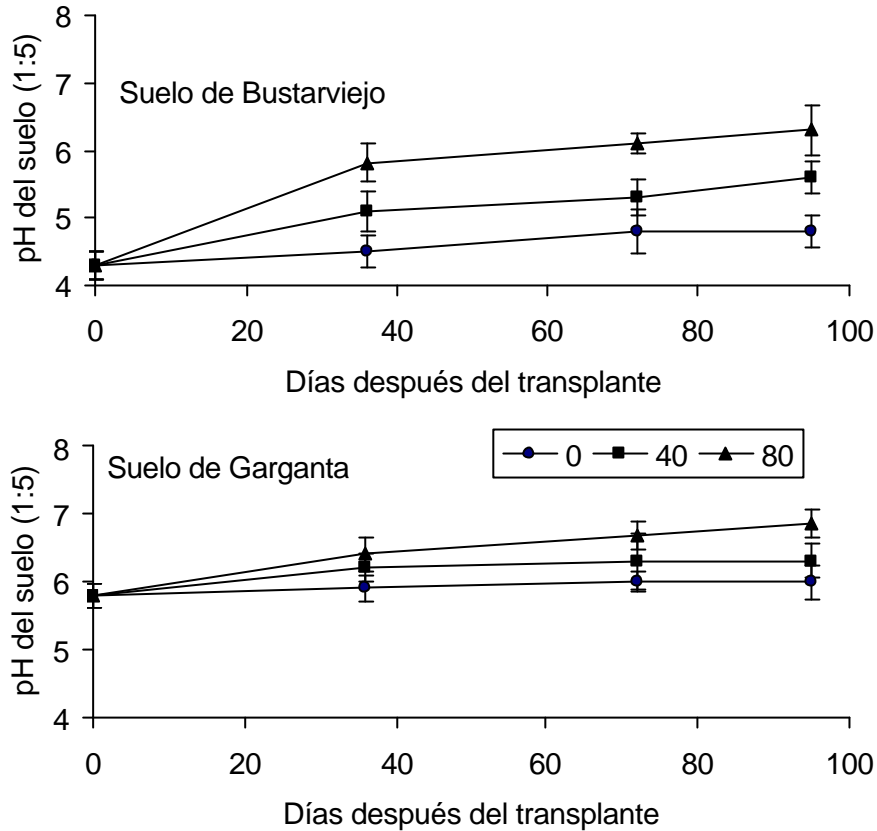
En la Figura 50 se muestra la evolución del pH de los suelos a lo largo del ensayo. Se observa que en los dos suelos ácidos (pH = 4,3 en suelo B y 5,8 para el suelo G), el aporte de CAC (con un pH inicial cercano a 8) contribuye a aumentar el pH significativamente respecto al control. La dosis de 40 t ha<sup>-1</sup> lo hace en menor medida

que la de  $80 \text{ t ha}^{-1}$ , y en ocasiones no se diferencia significativamente del control, pero siempre muestra una tendencia a elevar el pH.

Debido a que el suelo de Bustarviejo (B) es más ácido que el de Garganta de los Montes (G), la subida de pH en el primero es más notoria. Mingxing y col. (2001 a y b) también encontraron un incremento similar de pH en los suelos sobre los que se acumulaba CAC. Winter y col. (2002) aplicaron CAC como enmienda orgánica en suelos ácidos mineros y observaron un aumento de 1,5 unidades de pH respecto a los tratamientos control.

El impacto que una enmienda orgánica ejerce sobre el pH de un suelo, puede influir en la forma en que los metales pesados se enlazan a los diferentes puntos de adsorción. En el apartado V.4.3, se comprobó que valores altos de pH inducían una mayor retención de Cd, Pb y Cu en CAC. Así, la superficie orgánica de adsorción, se hace más reactiva en condiciones básicas, ya que los grupos ácidos como carboxílicos, alcoholes, fenoles, tioles, etc, quedan cargados negativamente, favoreciendo la adsorción de cationes. Pero el pH también afecta a otro tipo de sitios de adsorción muy relevante en suelos mineros. Nos referimos a los óxidos de Fe y Mn, que poseen una carga variable, y sobre los cuales se adsorben los cationes. El denominado punto cero de carga es aquél valor de pH en donde dichas superficies de adsorción presentan carga nula. A valores de pH superiores, esa carga empieza a ser negativa incrementado la adsorción de metales pesados, y a valores inferiores, es ligeramente positiva, pudiendo disminuir considerablemente el proceso. El punto cero de carga de óxidos de hierro sintéticos ha sido objeto de estudio desde hace tiempo, encontrándose entre pH 7-9 (Parks, 1965; Schwertmann y Taylor, 1977). Por el contrario, los óxidos de hierro naturales suelen presentar puntos de carga cero ~~muchos~~ más bajos. Van Schuylenborgh y Arens (1950) estimaron el punto de carga cero de la Goetita (uno de los óxidos de Fe más abundantes) a pH 3. Esta gran diferencia se suele atribuir al tipo de cristalización y a las impurezas presentes (Parfitt, 1981).

Como se observa en la Figura 50, la incorporación de CAC en la dosis de  $80 \text{ t ha}^{-1}$ , ha incrementado el pH del suelo B de 4,3 a 6,3, y en el suelo G, de 5,8 a 6,9, muy por encima del punto cero de carga teórico de minerales como la Goetita. Por lo tanto, es de suponer que los procesos de retención de metales pesados, tanto en la superficie orgánica como en la mineral, estén favorecidos con el aporte de la enmienda de CAC.



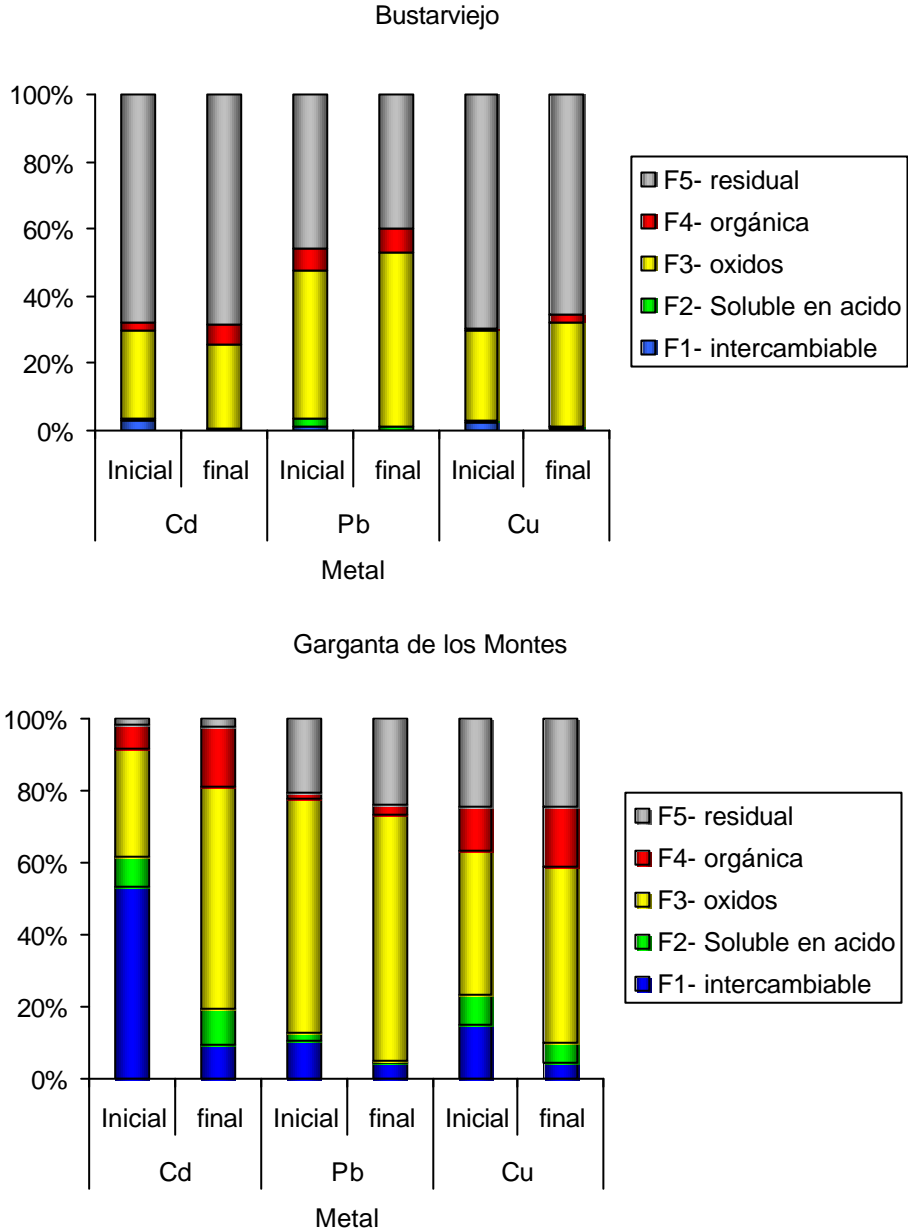
**Figura 50.** Evolución del pH de los suelos B y Gen los diferentes tratamientos. 0, 40 y 80 se refieren a la dosis de CAC añadidas en  $t\ ha^{-1}$ . Las barras de error representan el error estándar.  $n = 4$ .

#### 4.2.2. Fraccionamiento de metales en suelo. Extracción Tessier

Se efectuó una extracción secuencial por la metodología Tessier, de los suelos sin enmienda al principio del ensayo, y de los suelos enmendados con  $80\ t\ ha^{-1}$  al final del ensayo (95 días). Así, pudimos comprobar el efecto de la adición de CAC sobre el fraccionamiento de los metales en los suelos B y G. Los datos se muestran en la Figura 51.

Era de esperar que el CAC adsorbiera parte de la fracción soluble de los metales, o que por lo menos cambiara su distribución. Observamos que de hecho en el suelo de Bustarviejo las primeras fracciones (F1 y F2), asociadas a los metales débilmente adsorbidos, retenidos principalmente por procesos de intercambio catiónico, disminuyen en todos los metales al aplicar la enmienda. En el caso del Cd parece ser que parte de esa pérdida se gana en la fracción orgánica (F4), y en el caso del Pb, en la fracción de

óxidos de Fe y Mn (F3). El Cu muestra un comportamiento parecido al del Cd, aumentando su fracción orgánica con la aplicación de CAC.



**Figura 51.** Fraccionamiento Tessier de metales pesados en los suelos de Bustarviejo y de Garganta de los Montes. Inicial se refiere al suelo sin enmienda antes del cultivo. Final se refiere al suelo con 80 t ha<sup>-1</sup> de CAC al final del cultivo.

Estos datos tienen bastante sentido si recordamos que el Cd y el Cu, en los ensayos de isotermas de adsorción sobre CAC expuestos en el capítulo V, eran los metales que más se adsorbían, posiblemente debido a su gran afinidad por diferentes

grupos reactivos de la materia orgánica. Sin embargo el Pb, que mostraba cierta afinidad por la celulosa y derivados, tenía una capacidad de adsorción menor, debido a que estas moléculas estaban parcialmente degradadas por los procesos de compostaje. Similares estudios fueron realizados por Shuman (1998) con CAC obteniendo resultados análogos a los expuestos en la Figura 51. Estos autores atribuyeron el aumento del Pb en la fracción 3, al incremento de la carga de los óxidos, producido por la subida de pH. Si observamos la figura 50, comprobamos que el aumento de pH en el tratamiento de 80 t ha<sup>-1</sup> es notable, por lo que muy posiblemente haya provocado una mayor carga neta de los óxidos de Fe y Mn.

En el caso del suelo de Garganta de los Montes, la dinámica es la misma que la observada para el suelo de Bustarviejo (Figura 51). El Cd débilmente retenido (F1+F2) es notoriamente fijado por la fracción orgánica (F4) aportada por el CAC, al igual que el Cu, aunque en menor medida. El Pb se vuelve a retener más en los óxidos de Fe y Mn (F3) que en la materia orgánica, aunque en este caso la situación difiere ligeramente de la del suelo de Bustarviejo, ya que el contenido de óxidos de Fe y Mn es diferente. Ambos óxidos son más abundantes en el suelo de Bustarviejo (Tabla 19.).

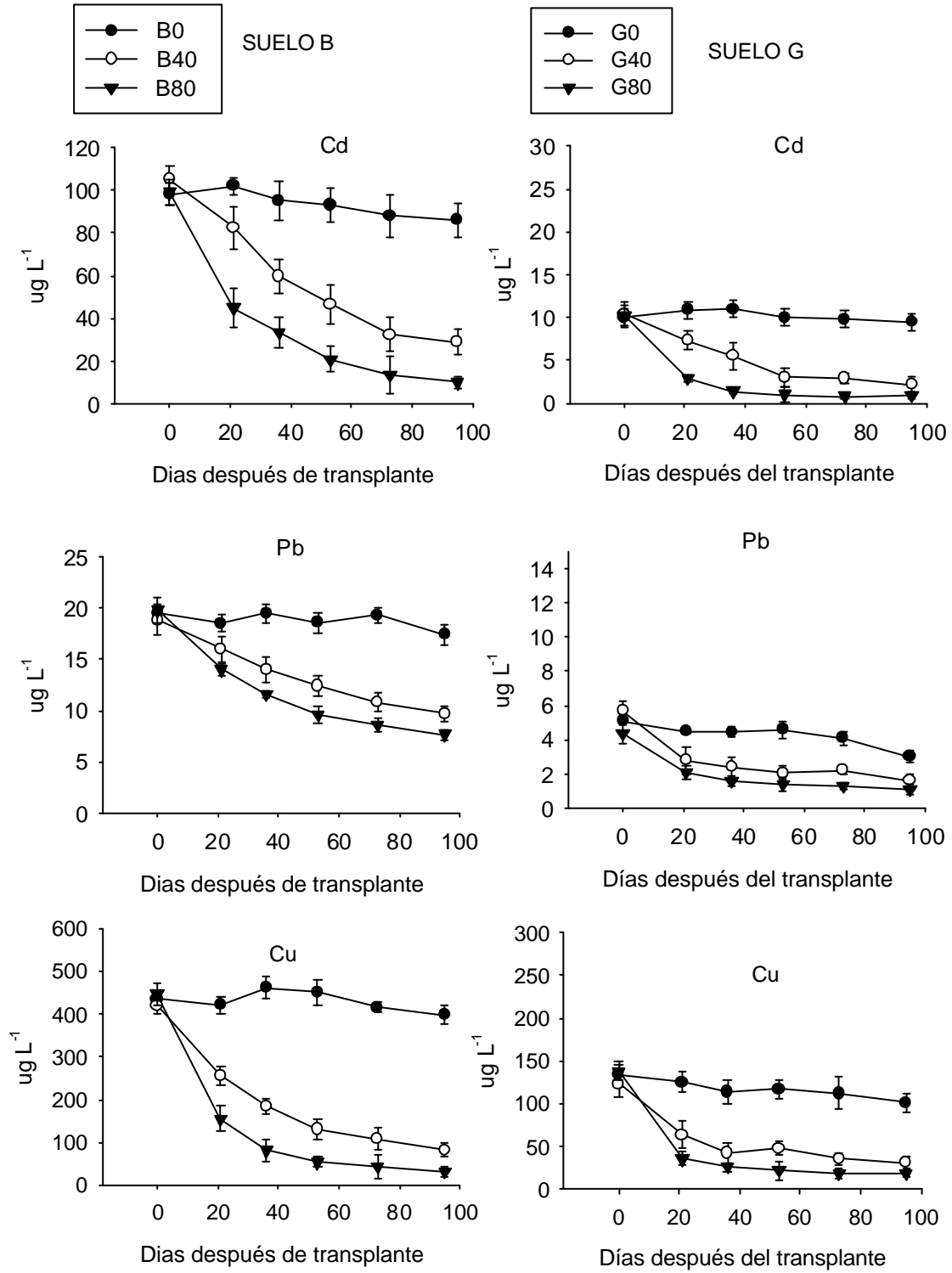
#### 4.2.3. Evaluación de metales en lixiviados

Uno de los objetivos principales en la recuperación de suelos contaminados es evitar los posibles lixiviados que dispersan la contaminación. En este ensayo se midió la concentración de Cd, Pb y Cu en los lixiviados de los tiestos durante todo el periodo de crecimiento de las plantas. Los lixiviados eran abundantes (drenajes de entre 30-50 % del volumen de riego) ya que ambos suelos son arenosos. En la Figura 52 se muestra la evolución de la concentración de metales en los lixiviados del suelo de Bustarviejo y Garganta de los Montes respectivamente.

Debido al mayor grado de contaminación del suelo de Bustarviejo (B), se observa que todos los metales están en mayor concentración en los lixiviados de los diferentes tratamientos de éste, que en los correspondientes del suelo de Garganta (G).

Esta diferencia es máxima en los tratamientos control, sin enmienda, donde los niveles se mantienen constantes (sin diferencias significativas entre muestreos) durante todo el ensayo. Sin embargo, como era de esperar, cualquiera de las dosis de CAC

aplicadas en ambos suelos, provocan una disminución gradual en la concentración de metales en los lixiviados.



**Figura 52.** Evolución de la concentración de metales en los lixiviados del suelo de Bustarviejo y de Garganta de los Momtes. 0, 40 y 80 representan las dosis de CAC en  $\text{t ha}^{-1}$ . Las barras de error se refieren al error estándar.  $n = 4$ .

Si nos fijamos en el aporte de CAC en la dosis de  $80 \text{ t ha}^{-1}$ , observamos que en ambos suelos, la concentración de Cu y Cd en lixiviados a los 95 días de ensayos, ha disminuido de forma notoria; entre un 80 y un 90 % menor que el tratamiento control, dependiendo del metal y el suelo (Tabla 26). Por otro lado, la concentración de Pb en lixiviados se ha visto menos influenciada por el aporte de CAC en la dosis de  $80 \text{ t ha}^{-1}$ . Aunque también ha disminuido, ésta solo lo ha hecho entre un 56 y un 66 % respecto al control.

**Tabla 26.** Concentración de Cd, Pb y Cu en los lixiviados de los tratamientos control y en los enmendados con  $80 \text{ t ha}^{-1}$  de CAC a los 95 días de ensayo.

	Suelo B			Suelo G		
	B0	B80	Reducción (%)	G0	G80	Reducción (%)
Cd	86,0	10,2	88	9,5	0,95	90
Pb	17,4	7,7	56	3,03	1,03	66
Cu	398	37,9	90	101	18,5	82

*Concentración en  $\mu\text{g L}^{-1}$ . El porcentaje de reducción se refiere a la concentración de metal disminuida, del tratamiento con  $80 \text{ t ha}^{-1}$  respecto al control (B0 o G0)*

Los tratamientos con  $40 \text{ t ha}^{-1}$  de CAC muestran una dinámica muy similar a la expuesta para los de  $80 \text{ t ha}^{-1}$ , con la diferencia de que la disminución de la concentración de metales en los lixiviados respecto al control, es menor.

En ambos suelos, la disminución de la concentración de Cu en lixiviados con el aporte de CAC, es más acusada en los 30 primeros días de ensayo, tendiendo después, hacia niveles más estables. En cambio, el Cd y el Pb siguen una cinética más lenta. Incluso en el suelo B (con niveles mayores de metales), la concentración de ambos metales en los lixiviados podría haber seguido disminuyendo si se hubiera prolongado el ensayo.

Es interesante observar que la misma dosis de CAC es capaz de disminuir más la cantidad neta de metal en los lixiviados del suelo B que en los del suelo G, aunque proporcionalmente los datos sean iguales. De hecho, en el tratamiento B80, se consiguió

reducir la concentración de Cd en  $75,8 \mu\text{g L}^{-1}$  (B0 =  $86 \mu\text{g L}^{-1}$ , B80 =  $10,2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Tabla 26); mientras que el tratamiento G80 lo hizo en  $8,6 \mu\text{g L}^{-1}$ , 9 veces menos (G0 =  $9,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0,95 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Esto parece indicar que la dosis de  $80 \text{ t ha}^{-1}$  es suficiente, incluso excesiva, para anular el Cd en los lixiviados del suelo G, ya que  $0,95 \mu\text{g L}^{-1}$  en lixiviados es una cantidad casi despreciable (cercana al límite de detección de la cámara de grafito,  $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ). El hecho de que la dosis de  $40 \text{ t ha}^{-1}$  produzca, en el suelo G, un efecto similar a la dosis de  $80 \text{ t ha}^{-1}$  refuerza esta idea.

En resumen, la aplicación de CAC a los suelos estudiados, ha disminuido notoriamente la concentración de Cd, Cu y, en menor medida los niveles de Pb, en los lixiviados. Este efecto ha podido deberse a procesos de adsorción por parte de la fracción orgánica o, a través de superficies minerales que, seguramente, han incrementado su carga negativa por el aumento de pH. También habría que considerar que la disminución de metales en los lixiviados estuviera influenciada por la absorción de las plantas. Sin embargo, como se verá en el apartado siguiente, no se observó correlación entre la absorción de metales por parte de la planta, y el nivel de éstos en los lixiviados,

#### 4.2.4. Concentración de metales en planta

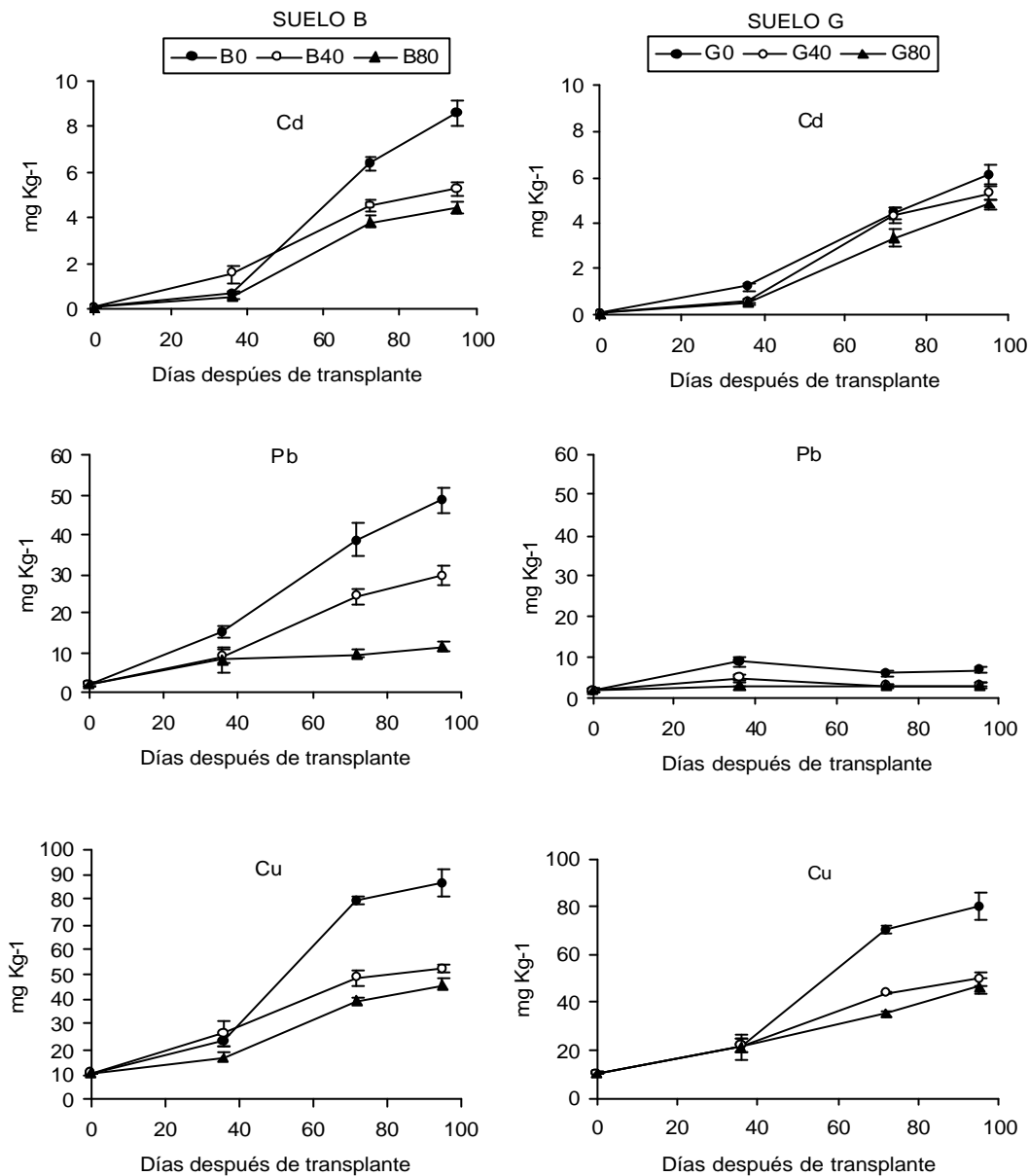
Existen distintos métodos para determinar la biodisponibilidad de un metal en el suelo, mediante extracciones secuenciales, extracciones de un sólo paso basadas en diferentes agentes extractantes, lixiviados, etc., que hemos estudiado en los apartados anteriores). Todos ellos son usualmente utilizados por su sencillez y reproducibilidad. Sin embargo, su efectividad depende mucho del tipo de suelo en cuestión. Por ello el método más real, aunque más laborioso, es evaluar la cantidad de metal que absorbe una planta, que es en definitiva el fin último de la evaluación de la biodisponibilidad.

En este apartado se evaluará la respuesta de *A. halimus*, cultivada en los suelos B y G, a la enmienda con CAC, con el objetivo de validar los resultados hallados hasta el momento.

##### a) Concentración de Cd, Pb y Cu en parte aérea

La figura 53 muestra las concentraciones de Cd, Pb y Cu en parte aérea de *A. halimus* en los suelos de Bustarviejo (B) y de Garganta de los montes (G) enmendados con distintas dosis de CAC.





**Figura 53.** Evolución de la concentración de Cd, Pb y Cu en parte aérea de *A. halimus* cultivada en suelo de Bustarviejo. B0, B40 y B80 y G0, G40 y G80 se refieren a las dosis de CAC en t ha<sup>-1</sup>. Las barras de error representan el error estándar.

Aunque las diferencias no son siempre significativas a lo largo del ensayo, en general, se detecta una tendencia a disminuir la concentración de los tres metales en la parte aérea de *A. halimus* a medida que se aumenta la dosis de CAC. Este efecto se observa en ambos suelos y en los tres metales, aunque en el caso del Pb, las concentraciones en parte aérea son mucho mayores en las plantas del suelo B que en las del suelo G.

**Tabla 27.** Concentración de Cd, Pb y Cu en parte aérea de *A. halimus* cultivada en los tratamientos control y en los enmendados con 80 t ha<sup>-1</sup> de CAC a los 95 días de ensayo.

	Suelo B			Suelo G		
	B0	B80	Reducción (%)	G0	G80	Reducción (%)
Cd	8,7	4,4	49	6,1	4,8	21
Pb	48,6	11,3	76	6,9	3,0	56
Cu	86,4	45,4	47	80,1	46,6	42

*Concentración en mg kg<sup>-1</sup>. El porcentaje de reducción se refiere a la concentración de metal del tratamiento con 80 t ha<sup>-1</sup> respecto al control (B0 o G0)*

En ambos suelos, el Pb parece ser el metal cuya acumulación en parte aérea se ve más disminuida por el efecto del aporte de la enmienda (Tabla 27). Este efecto se ve más acusado a partir de los 40 días de ensayo. De hecho, las plantas del tratamiento B80, al final del ensayo, mostraron una concentración de Pb en parte aérea un 76 % menor que la del tratamiento B0. Esta reducción en el caso del Cd y el Cu en el suelo B, es menor, aunque nada despreciable (49 % y 47 %, respectivamente). Resultados similares se obtuvieron en las plantas cultivadas en el suelo G. Estos datos de planta contrastan con lo observado en el estudio de los lixiviados (Tabla 26), donde el Pb era el metal cuya concentración se veía menos afectada por el aporte de CAC.

Los lixiviados del suelo B contienen concentraciones de Pb Cd y Cu notoriamente más elevados que las del suelo G (Figura 52). Por lo tanto, cabría esperar, que las concentraciones de metales en planta también fueran más elevadas en el suelo B. Sin embargo, esto sólo ocurre en el caso del Pb. Las concentraciones de Cd y Cu en parte aérea de las plantas cultivadas en el suelo G son similares a las encontradas en las plantas del suelo B.

Así pues, se pone de manifiesto que el análisis de los lixiviados no es una buena metodología para evaluar la biodisponibilidad de Cd, Pb y Cu en estos suelos. Aunque recordemos, que el estudio de los lixiviados se realizó principalmente con el objetivo de evaluar la posible dispersión de la contaminación.

Para evaluar la disponibilidad de los metales resultó más adecuada la extracción secuencial Tessier mostrada en la Figuras 51. Si nos fijamos únicamente en la fracción

1, referida a la extracción con  $\text{CaCl}_2$  (fracción soluble e intercambiable) y resumida en la Tabla 28 expuesta a continuación, comprobamos que los valores explican mejor la absorción de metales por la planta.

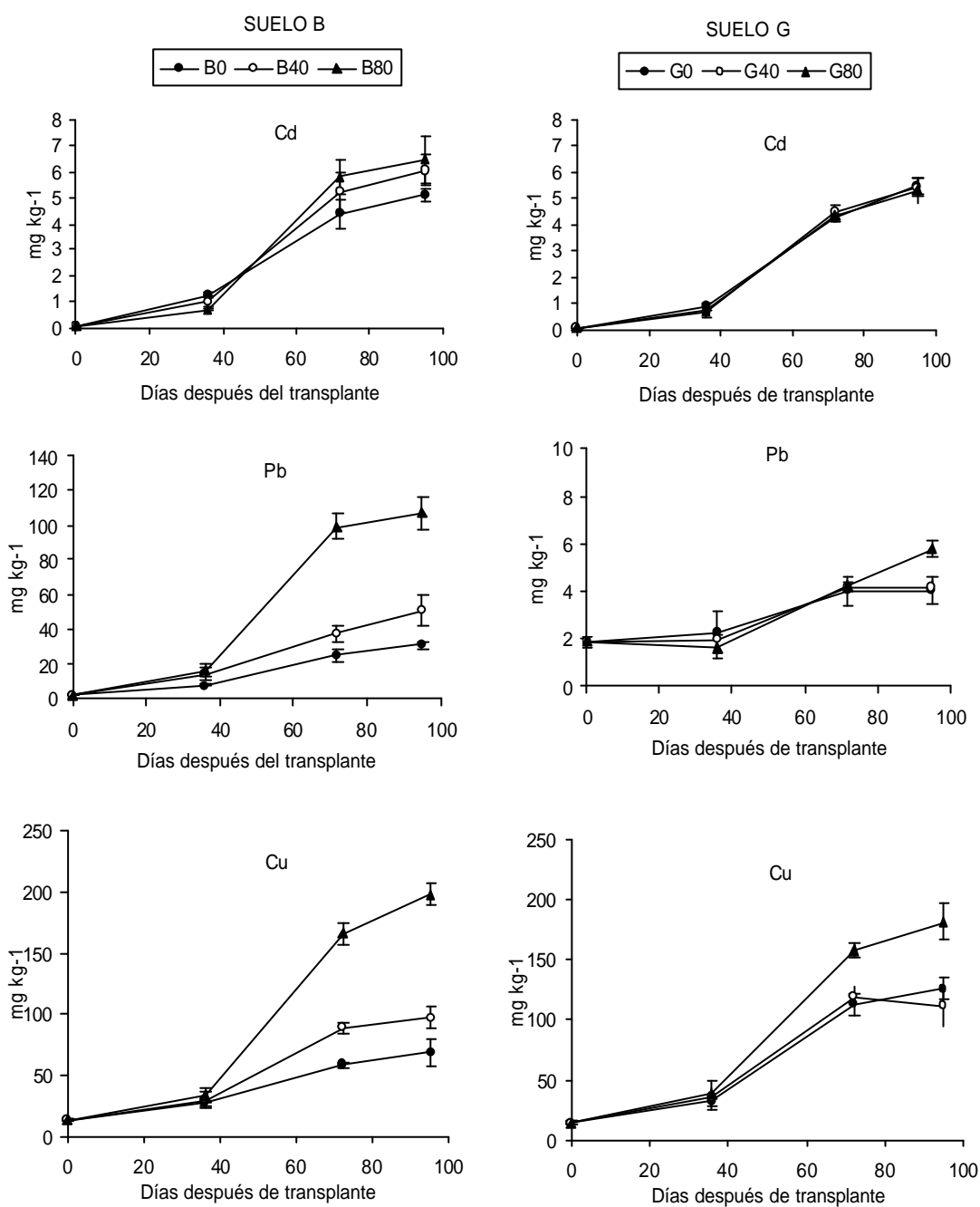
**Tabla 28.** Datos de la fracción 1 de la extracción de Tessier expuesta en la figura 51, aquí en  $\text{mg kg}^{-1}$ . B y G son los suelos de Bustarviejo y Garganta de los Montes respectivamente. Inicial = Tratamiento sin enmienda al principio del ensayo. Final = Tratamiento con  $80 \text{ t ha}^{-1}$  al final del ensayo. Letras distintas representan diferencias significativas entre muestra inicial y final.  $p = 0,05$ .

	<i>Cd</i>		<i>Pb</i>		<i>Cu</i>	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
B	1,03 <sup>a</sup>	0,05 <sup>b</sup>	16,7 <sup>a</sup>	5,2 <sup>b</sup>	45,8 <sup>a</sup>	12,5 <sup>b</sup>
G	0,98 <sup>a</sup>	0,09 <sup>b</sup>	6,5 <sup>a</sup>	2,1 <sup>b</sup>	96,6 <sup>a</sup>	26,7 <sup>b</sup>

Según la fracción 1 de la extracción Tessier, se puede observar que, tanto al inicio como al final del ensayo, las concentraciones de Cd son similares en los dos suelos (Tabla 28), al igual que lo son en la parte aérea de las plantas cultivadas en ambos (Tabla 27). Se puede comprobar también, una gran diferencia entre el Pb presente en la fracción 1 de la extracción Tessier de ambos suelos, y como ésta se refleja en las plantas. En el caso del Cu la correlación no es tan clara, pero superior a la mostrada con los lixiviados. Esto podría indicar, que las plantas no sólo son capaces de absorber metales de la fracción soluble en agua, sino que también podrían tomarlos de fracciones intercambiables, *a priori* menos accesibles.

#### b) Concentración de Cd, Pb y Cu en raíces

En la Figura 54 se muestran las concentraciones de Cd, Pb y Cu en las raíces de *A. halimus* cultivadas en los dos suelos enmendados con CAC.



**Figura 54.** Evolución de la concentración de Cd, Pb y Cu en raíz de *A. halimus* cultivada en suelo de Bustarviejo. B0, B40 y B80 y G0, G40 y G80 se refieren a las dosis de CAC en t ha<sup>-1</sup>. Las barras de error representan el error estándar.

La dinámica de acumulación de metales en raíz de las plantas cultivadas en el suelo B parece ser diferente de la observada para la parte aérea. De hecho se observa una tendencia inversa, acumulándose más metal a medida que se aumenta la dosis de enmienda. Este efecto es más claro en el Pb y el Cu, mientras que en el Cd, es mucho menor.

Las plantas cultivadas en suelo G muestran menos diferencias entre los tratamientos. Aún así, el Cu y el Pb en las raíces del tratamiento G80 tienden a ser superiores a las observadas en las raíces del resto de tratamientos, al final del ensayo. La concentración de Cd en raíces de las plantas del suelo G no parece verse afectada por la dosis de enmienda.

Al igual que ocurría en el análisis de la parte aérea, las concentraciones de Pb en raíz en las plantas cultivadas en el suelos B son muy elevadas comparadas con las de los suelos G. Por el contrario, el Cd y el Cu se mantienen en los mismos niveles en ambos suelos.

Así pues, en el suelo B, donde la concentración de metales es más elevada, el aporte de CAC parece inducir una acumulación de éstos en raíz y una disminución en parte aérea. Por lo tanto, el factor de traslocación ( $[M_{P.A\acute{e}ra}]/[M_{Ra\acute{i}z}]$ ), disminuye con el aporte de CAC. Este efecto se aprecia en menor medida en las plantas del suelo G (Tabla 29).

**Tabla 29.** Factor de traslocación de metales ( $[M_{P.A\acute{e}ra}]/[M_{Ra\acute{i}z}]$ ) en *A. halimus*, al final del ensayo, cultivadas en los suelos B y G en los tratamientos control y enmendados con  $80 \text{ t ha}^{-1}$ . Letras distintas representan diferencias significativas entre tratamientos del mismo suelo.  $p = 0,05$ .

Tratamiento	Suelo B		Suelo G	
	B0	B80	G0	G80
Cd	1,7 <sup>a</sup>	0,7 <sup>b</sup>	1,1 <sup>a</sup>	0,9 <sup>a</sup>
Pb	1,6 <sup>a</sup>	0,1 <sup>b</sup>	1,7 <sup>a</sup>	0,5 <sup>b</sup>
Cu	1,3 <sup>a</sup>	0,2 <sup>b</sup>	0,6 <sup>a</sup>	0,3 <sup>a</sup>

En la bibliografía apenas se recogen datos sobre la acumulación de metales por parte de la especie *A. halimus*, aunque sí de otras especies halófitas similares. Estos estudios muestran que este tipo de plantas, como estrategia defensiva, tienden a acumular la mayor parte de los metales tóxicos en las paredes celulares de las raíces, fuera de los procesos metabólicos (Sousa y col, 2008). Sin embargo, según Lutts y col. (2004), esta acumulación en la especie *A. halimus*, se da preferentemente en los brotes, mediante la formación de sales de oxalato. Esto explicaría los relativamente elevados

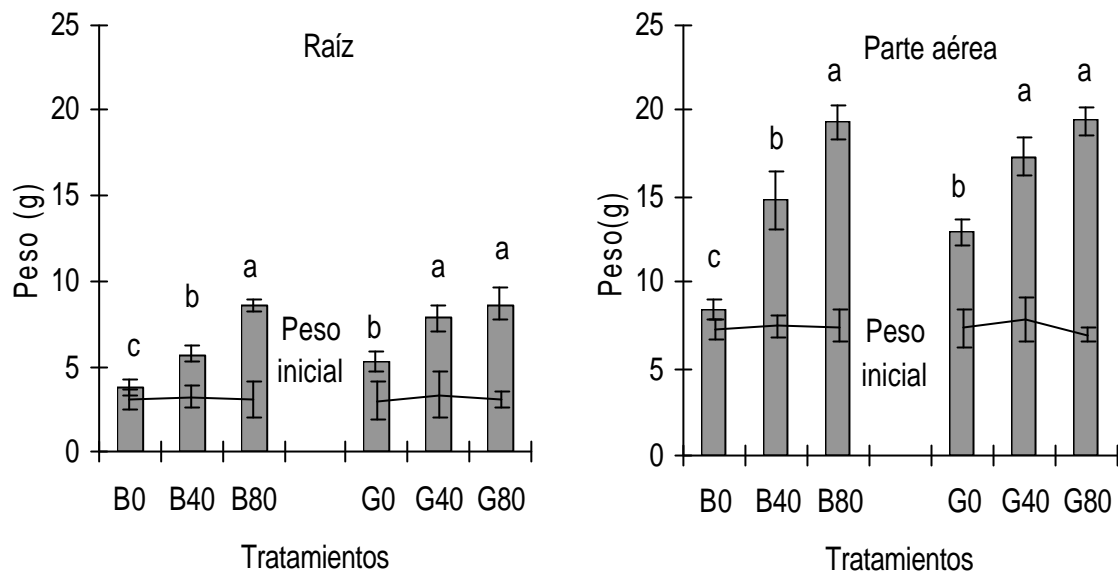
factores de traslocación encontrados en los tratamientos control (Tabla 29), donde la disponibilidad de metal es mayor. Algunos estudios describen un alto factor de traslocación en plantas halófitas cultivadas en escombreras o suelos mineros. Por ejemplo, se observó que las especies *Paspalum distichum* y *Cynodon dactylon* presentaban concentraciones muy elevadas de Pb, Zn y Cu en parte aérea y muy baja en raíces (Shu y col. 2002).

Varios análisis realizados anteriormente, mostraban que la enmienda con CAC a los suelos B y G, disminuía la disponibilidad de Cd, Pb y Cu, como el fraccionamiento Tessier expuesto en el apartado VIII.4.2.2, el estudio de la concentración de metales en lixiviados del apartado VIII.4.2.3 y el ensayo de agitación de 8 dosis de CAC sobre el suelo B, expuesto en el apartado VII.4.2). Por lo tanto es comprensible la disminución de metal en parte aérea de *A. halimus* al aplicar el CAC. Pero el hecho de que el Pb y el Cu tiendan, en ciertos casos, a acumularse en las raíces al aplicar CAC es algo más difícil de interpretar. Una posible explicación sería, que este tipo de plantas halófitas ( a través de los exudados radiculares) pueden afectar la distribución de metales en la rizosfera alterando el pH y los potenciales redox de la misma, lo cual podría provocar procesos de precipitación de metales en la superficie de la raíz (Rebordea y Ganador, 2007). Aunque también, en nuestro caso, este eventual aumento de pH ha podido ~~podría~~ deberse al efecto del CAC aplicado.

#### 4.2.5. Peso de plantas

Lógicamente es de esperar que la mayor o menor presencia de metales tóxicos, en el suelo condicione el desarrollo de la planta. En la figura 55, se muestra el peso de las raíces y de la parte aérea de *A. halimus* cultivadas en los suelos B y G, enmendadas con CAC.

En ambos suelos se observa un efecto positivo de la enmienda con CAC sobre el crecimiento de *A. halimus*. Tanto las raíces como la parte aérea se desarrollan mejor cuanto mayor es la dosis de CAC aplicada. Las diferencias son más marcadas en el suelo de Bustarviejo (B) donde las dos dosis de enmienda provocan un desarrollo de raíz y parte aérea significativamente superiores al control. En el suelo de Garganta de los Montes no siempre es así. Hay diferencias significativas respecto al control, pero no entre los tratamientos de 40 y 80 t ha<sup>-1</sup>.



**Figura 55.** Peso seco de raíz y parte aérea de los diferentes tratamientos al final del ensayo (95 días). Las barras verticales representan el error estándar. Las barras horizontales representan el peso de cada tratamiento al inicio del ensayo.  $n = 4$ ,  $p = 0,05$  en el test de Duncan. Letras distintas representan diferencias significativas entre los tratamientos de un mismo suelo.

Por otro lado se observó que el tratamiento B0 produjo un crecimiento exiguo de la raíz, que seguramente no le permitió explorar la totalidad del sustrato, siendo el único caso en el que la planta parecía morir al final del ensayo. De hecho, apenas hubo desarrollo radicular respecto a su momento de transplante (Figura 58).

Posiblemente, este efecto negativo sobre el desarrollo de las plantas del tratamiento B0, no sólo sea debido a la presencia de metales, sino que también puede haber influido la baja fertilidad de los suelos en los que no se ha aplicado la enmienda de CAC. Al final del ensayo se analizó los cambios en los niveles de distintos nutrientes del suelo. Estos datos se muestran en la Tabla 30.

Generalmente, el aporte de CAC ha conseguido aumentar significativamente el K intercambiable, el porcentaje de materia orgánica y el pH. El resto de elementos no varían significativamente en los diferentes tratamientos, aunque se comprueba que el suelo G ofrece mejores condiciones para el cultivo que el B.

**Tabla 30.** Parámetros nutricionales en los suelos de los distintos tratamientos, obtenidos al final del ensayo (95 días). Letras distintas representan diferencias significativas entre tratamientos de un mismo suelo.  $n = 3, p = 0,05$ .

	B0	B40	B80	G0	G40	G80
Ca	0,3 <sup>a</sup>	0,45 <sup>a</sup>	0,43 <sup>a</sup>	263 <sup>a</sup>	271 <sup>a</sup>	255 <sup>a</sup>
Mg	0,10 <sup>a</sup>	0,11 <sup>a</sup>	0,11 <sup>a</sup>	0,52 <sup>a</sup>	0,52 <sup>a</sup>	0,55 <sup>a</sup>
K	1,25 <sup>b</sup>	1,71 <sup>a</sup>	1,99 <sup>a</sup>	1,47 <sup>b</sup>	1,92 <sup>a</sup>	2,3 <sup>a</sup>
P	0,21 <sup>a</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0,21 <sup>a</sup>	180 <sup>a</sup>	190 <sup>a</sup>	195 <sup>a</sup>
M.O. (%)	0,10 <sup>b</sup>	0,85 <sup>a</sup>	1,75 <sup>a</sup>	0,45 <sup>c</sup>	1,12 <sup>b</sup>	2,13 <sup>a</sup>
pH	4,7 <sup>c</sup>	5,6 <sup>b</sup>	6,3 <sup>a</sup>	6,0 <sup>b</sup>	6,2 <sup>ab</sup>	6,9 <sup>a</sup>

*Cationes: obtenidos mediante extracción de cationes de cambio con  $AcNH_4$ . ( $cmol_c kg^{-1}$ )*

*Fósforo: método Olsen. ( $cmol_c kg^{-1}$ )*

*Materia orgánica (M.O.): Oxidación con  $K_2Cr_2O_7$*

*pH: extracto 1:5*

Es interesante observar que en los tratamientos G40 y G80, los valores nutricionales que indican la fertilidad del suelo, son más elevados que en los correspondientes tratamientos del suelo B. Sin embargo, esto no induce un mayor desarrollo de las plantas crecidas en el suelo G respecto a las del B (Figura 55). Esto podría indicar que el factor limitante del desarrollo de *A. halimus*, no es tanto la fertilidad del suelo, como los niveles de metales pesados biodisponibles.

Sólo se observan diferencias significativas de desarrollo de parte aérea entre los tratamientos control, B0 y G0, y es precisamente en éstos, donde la diferencia de concentración de metales pesados disponibles entre los suelos, resultan más evidentes (ensayo de dosis de enmienda, apartados VI.4.2; fraccionamiento Tessier de los suelos VII.4.2.2; análisis de lixiviados VII 4.2.3).

A modo de ejemplo, las Figuras 56, 57, 58 y 59 recogen diversos aspectos del desarrollo de las plantas. En estas fotografías se aprecia que cuanto mayor es la enmienda de CAC, mayor tiende a ser el desarrollo vegetativo.

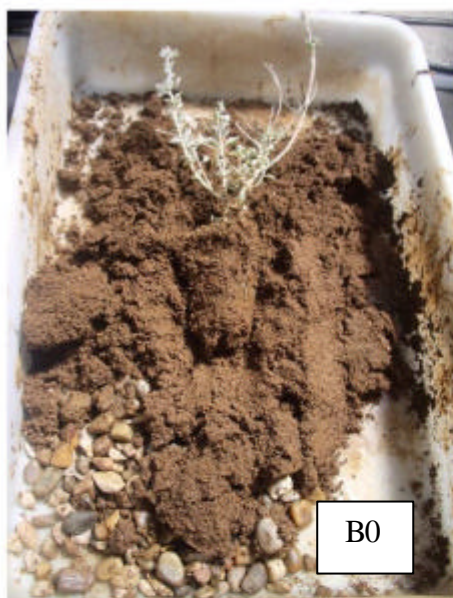




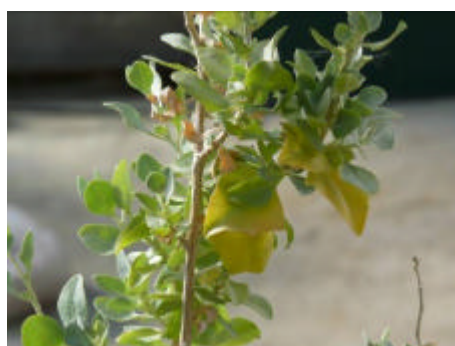
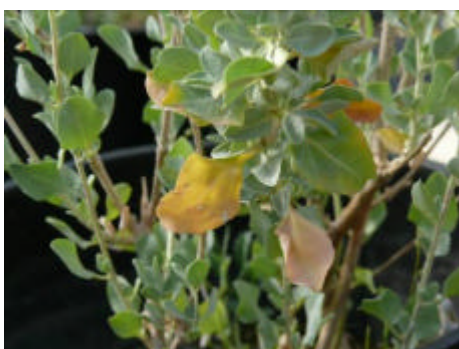
**Figura 56.** Aspecto de las plantas cultivadas en el suelo de Bustarviejo con 0, 40 y 80 t ha<sup>-1</sup> de CAC al final del ensayo.



**Figura 57.** Aspecto de las plantas cultivadas en el suelo de Garganta de los Montes con 0, 40 y 80 t ha<sup>-1</sup> de CAC al final del ensayo.



**Figura 58.** Aspecto de las raíces de las plantas cultivadas en suelo de Bustarviejo al final del ensayo.



**Figura 59.** Aspecto de la sintomatología que presentaban algunas hojas de los tratamientos sin enmienda.

## 5. CONCLUSIONES.

### 5.1. Ensayo de selección de especies autóctonas

- La especie *Atriplex halimus* fue la que más crecimiento obtuvo al ser cultivada en un sustrato orgánico comercial contaminado artificialmente con Cd. Tanto la parte aérea como las raíces mostraron un peso seco mayor que el resto de especies estudiadas.
- Respecto a la absorción de Cd las especies *Phillyrea angustifolia* y *Rhamnus alaternus* tienden a inmovilizar la mayor parte del metal en las raíces, acumulando una fracción no mayor del 16 % del Cd total en la parte aérea. Por el contrario, la especie *Atriplex halimus* mostró concentraciones de Cd en brotes y hoja superiores a los encontrados en raíz, traslocando el 87 % del Cd hacia la parte aérea. La especie *Rosmarinus. officinalis* mostró un comportamiento intermedio, distribuyendo el Cd en proporciones similares entre la raíz y la parte aérea.
- La especie *A. halimus* tiende a acumular metales en parte aérea de manera mucho más eficiente que el resto de especies estudiadas, generando además una gran biomasa en condiciones de estrés inducido con Cd. Así pues, fue seleccionada como planta indicadora, para llevar a cabo el ensayo de enmienda de CAC sobre suelos ácidos de mina.

### 5.2. Ensayo de aplicación de CAC sobre suelos de mina y cultivo de *Atriplex halimus*

- El CAC mostró un claro efecto de inmovilización de metales pesados al ser aplicado a los suelos de mina estudiados, disminuyendo la concentración de Cd y Cu hasta en un 90 % y de Pb hasta un 66 % en los lixiviados. Dicho efecto resultó extenderse también a fracciones de metal en posiciones de intercambio.
- El aporte de CAC a los suelos produjo un incremento en el desarrollo de parte aérea y raíz de la especie *Atriplex halimus* cultivada en ellos. La dosis máxima de CAC ensayada (80 t ha<sup>-1</sup>) indujo un crecimiento global de hasta un 230 % respecto al control.

- Por otro lado, el aporte de CAC supuso una mejora en la fertilidad del suelo lo que contribuyó a que las plantas crecidas en presencia de CAC se desarrollaran mejor que los controles sin enmendar.
  
- La lixiviación de Pb resultó menos alterada por la aplicación de CAC que la de Cd y Cu; sin embargo, la concentración de Pb en parte aérea de *A. halimus* disminuyó proporcionalmente más que la del resto de metales al aplicar CAC. Esto sugiere que la planta es capaz de tomar metales de fracciones más estables que las lixiviables.
  
- La estabilización de metales producida por el CAC al ser aplicado a los suelos ácidos posiblemente se deba principalmente a dos factores:
  - A los posibles procesos de adsorción de metales sobre los grupos orgánicos contenidos en el CAC (estudiados en el capítulo V).
  - A la subida de pH del suelo producida por el aporte de CAC (con pH cercano a 8), lo cual derivó en un aumento de la capacidad de adsorción de metales en las superficies coloidales de los suelos.

## **IX. CONCLUSIONES**

## IX. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados de este trabajo permiten obtener las siguientes conclusiones:

1. El CAC caracterizado presenta una composición orgánica abundante en hidratos de carbono y en moléculas con grupos carboxílicos, aromáticos y N-alquilo. Presenta también elevadas concentraciones de potasio, cloruro, fosfato y materia orgánica.
2. De los tres metales estudiados, el Cd es el que más se adsorbe en el CAC, uniéndose principalmente a los grupos carboxílicos. El Pb tiene una baja capacidad de adsorción en CAC debido, principalmente, a que las moléculas de celulosa a las que tiene tendencia a unirse, están parcialmente degradadas por los procesos de fermentación propios de la elaboración del CAC. El Cu presenta una capacidad de adsorción sobre CAC ligeramente más baja que la del Cd y superior a la del Pb, sin mostrar preferencia por ninguna fracción, molécula o grupo funcional en concreto.
3. Tanto el aumento de temperatura como de pH, inducen un aumento en la adsorción de los tres metales en CAC.
4. El CAC presenta una afinidad por el Cd lo suficientemente fuerte como para retenerlo frente a extracciones con agua,  $\text{CaCl}_2$ , o ácidos orgánicos de bajo peso molecular, aunque, en todos los casos, libera una pequeña fracción de metal. El agente quelante DTPA es capaz de extraer la mayor parte del Cd retenido en el CAC.

5. El CAC, aplicado como enmienda a los suelos estudiados, retiene la mayor parte del Cd, Pb y Cu distribuidos en las fracciones más lábiles de éstos. Cuanto mayor es la dosis, mayor es la retención observada.
6. Los procesos responsables de la adsorción de los metales pesados por el CAC, se basan en la variedad de grupos funcionales del sustrato orgánico, y en el incremento de pH que éste provoca en los suelos.
7. La especie *Atriplex halimus* es capaz de desarrollarse correctamente en presencia de metales pesados en el medio de cultivo. Muestra un comportamiento traslocador, acumulando la mayor parte del metal en la parte aérea. Su capacidad de adsorción de metales y su generación de biomasa fue la más elevada de entre las especies estudiadas.
8. El CAC aplicado en los suelos de las minas de Bustarviejo y Garganta de los Montes, en dosis de 40 y 80 t ha<sup>-1</sup>, contribuyó a disminuir la lixiviación de metales pesados y a aumentar el desarrollo de la especie *A. halimus* cultivada en ellos. Además, cuanto mayor era la dosis de CAC, menos absorción de metales pesados mostró la planta.

*En resumen, se podría concluir que el CAC es un residuo orgánico abundante y barato, utilizable en la recuperación de suelos de minas. Su aplicación disminuiría notablemente la lixiviación de metales pesados, evitando así la extensión de la contaminación hacia aguas subterráneas. Además, su aporte de nutrientes y materia orgánica, facilitaría el mantenimiento de una cubierta vegetal, algo fundamental para regeneración del ecosistema.*

## X. BIBLIOGRAFÍA



## X. BIBLIOGRAFÍA

- Adriano, D.C. 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer-Verlag. New York, USA.
- Aiguo, L., Gonzalez, R.D., 1999. in: Colloid Interface SCI. 218, 225-232.
- Ali, N.A., Bernal, M.P., Ater, M., 2002. Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. Plant and Soil 239, 103-111.
- Alonso, E., Callejón, M., Jiménez, J.C., Ternero, M. 2002. Heavy metal extractable forms in sludge from wastewater treatment plant. Chemosphere, 47, 765-775.
- Alloway, B.J. 1995. Heavy metals in soils. Blackie Academic and Profesional. NY.
- Anon.1979. Vegetables. *Canada - Smithfield Experimental Farm Research Report*. Agriculture Canada. Smithfield, Ontario, Canada.
- Ansorena, J. 1994. Sustratos. Propiedades y caracterización. Mundi Prensa, Madrid.
- Argo, W.R., Weesies, B.J., Bergman, E.M., Marshal, M. 1997. Evaluating rhizon soil solution samplers as a method for extracting nutrient solution and analyzing media for container-grown crops. HortTechnology 7 (4); 404-408.
- Baker, A.J.M. 1981. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. J. Plant Nutrition 3:643-654.
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D. y Smith, J.A.C. 2000. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. En: Phytoremediation of Contaminated Soil and Water (eds. Terry, N. y Bañuelos, G.), pp. 85-107, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.
- Baker, H., Khalili, F., 2004. Analysis of the removal of lead (II) from aqueous solutions by adsorption onto insolubilized humic acid, temperature and pH dependence. Anal. Chim. Acta. 516, 179-186.
- Barceló, J., Nicolás, R., Sabater, B., Sanchez, R. 1987. Fisiología vegetal. Ediciones Pirámide, Madrid.
- Batista, M. J., Abreu, M. M., y Serrano, M. 2007. Biogeochemistry in Neves-Corvo mining area, Iberian Pyrite Belt, Portugal. Journal of Geochemical Exploration, 92, 159-176.

- Behemer, S.T., Lloyd, C.M., Raubenheimer, D., Stewart-Clark, J., Knight, J., Leighton, R.S., Harper, F.A. y Smith, J.A.C. 2005. Metal hyperaccumulation in plants: mechanisms of defence against insect herbivores. *Functional Ecology* 19: 55-66.
- Benguella, B., Benaissa, H., 2002. Cadmium removal from aqueous solutions by chitin, kinetic and equilibrium studies. *Water Res.* 36, 2463-2474.
- Benito, M. 2002. Compostaje de restos de poda: evaluación de la madurez, estabilidad y aplicación agronómica. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. España.
- Bradbury, M.H. y Baeyens, B. 2005. Modelling the sorption of Mn(II), Co(II), Ni(II), Zn(II), Cd(II), Eu(III), Am(III), Sn(IV), Th(IV), Np(V) and U(VI) on montmorillonite: Linear free energy relationships and estimates of surface binding constants for some selected heavy metals and actinides. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69 (4) 875-892.
- Brooks, R.R., Lee, J., Reeves, R.D. y Jaffre, T. 1977. Detection of Nickeliferous Rocks by Analysis of Herbarium Specimens of Indicator Plants. *J. Geochem. Exploration* 7: 49-57.
- Brun, L.A., Mailler, J., Hinsinger, P., Pe'pin, M., 2001. Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environmental Pollution* 111, 293-302.
- Buswell JA 1994. Potential of spent substrate for bioremediation purposes. *Compost Science and Utilization* 2, 31-36.
- Byrne, E. 1979. Chemical analysis of agricultural materials. *An Foras Taluntais*, 1-194.
- Cadahía, C., Eymar, E., Lucena, JJ. et al. 2005. Fertirrigación de cultivos hortícolas ornamentales y frutales. 3ª edición. Mundiprensa, Madrid.
- Carpena, R.O., Bernal, M.P. 2007. Claves de la fitorremediación: Fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas*, XVI, nº 2.
- Celik, M.S.; Yoon, R.H., 1991. Adsorption of Poly(oxyethylene)nonylphenol homologues on a low-ash coal. *Langmuir*. 7, 79-86.
- Celikel, G., Buyukalaca, S. 1999. The effects of re-using substrates on the yield and earliness of cucumber on autumn growing period. *Acta Horticulturae* 492, 259-264.
- Chaney, R.L., Li, Y.-M., Brown, S.L., Homer, F.A., Malik, M., Angle, J.S., Baker, A.J.M., Reeves, R.D. y Chin, M. 2000. Improving metal hyperaccumulator wild plants to develop commercial phytoextraction systems: approaches and progress. En: *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. (eds Terry, N. y Bañuelos, G.), Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA.

- Chaignon, V., Sanchez-Neira, I., Herrmann, P., Jaillard, B., Hinsinger, P., 2003. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vinegrowing area. *Environmental Pollution* 123, 229-238.
- Chen, G.G., Zeng, G.M., Tu, X., Huang G.H., Chen, Y.N. 2005. A novel biosorbent: characterization of the spent mushroom compost and its application for removal of heavy metals. *Journal of Environmental Sciences* 17, 756-760.
- Chiang, P-N., Wang M.K., Chiu, C.Y., Chou, S-Y. 2006. Effects of cadmium amendments on low-molecular-weight organic acid exudates in rhizosphere soils of tobacco and sunflower. *Environ Toxicol* 21, 479-488.
- Chirenje, T., Ma, L.Q., Lu, L.P., 2006. Retention of Cd, Cu, Pb and Zn by wood ash, lime and fume dust. *Water Air Soil Poll.* 171, 301-314.
- Chuah, T.G., Jumariah, A., Azni, I., Katayon, S., Thomas Chong, S.Y., 2005. Rice husk as a potentially low-cost biosorbent for heavy metal and dye removal: an overview. *Desalination*. 175, 305-316.
- Cieslinski, G., Van Rees, K.C.J., Szmigielska, A.M., Krishnamurti, G.S.R., Huang, P.M. 1998. Low-molecular-weight organic acids in rhizosphere soils of durum wheat and their effect on cadmium bioaccumulation. *Plant Soil* 203, 109-117.
- Codling, E.E., Chaney, R.L., Mulchi C.L., 2008. Effects of broiler litter management practices on phosphorus, copper, zinc, manganese, and arsenic concentrations in Maryland Coastal Plain soils. In: *Soil Sci Plant Anal.* 39, 1193-1205.
- Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M. 2006. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and complexation properties of Pb and Cd with EPS Part II. Consequences of EPS extraction methods on Pb<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> complexation. *Enzyme and Microbial Technology* 38, (1-2), 246-252.
- Coppin, N.J., Bradshaw, A.D. The establishment of vegetation in quarries and open pit non-metal mines. *Mining Journal Books Ltd.* London (1982).
- Davis, T.A., Volesky, B., Vieira, R.H.S.F. 2000. Sargassum seaweed as biosorbent for heavy metals. *Water Research* 34, 4270-4278.
- Davis, T.A., Volesky, B., Mucci, A., 2003. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Res.* 37, 4311-4330.
- De La Torre, F. 1993. Evaluacion de un modelo de competencia metal H<sup>+</sup> para la complejacion de Cu (II) con acidos fulvicos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. España.
- Dold, B., Fontboté, L., 2000. Element cycling and secondary mineralogy in porphyrin copper tailings as a function of climate, primary mineralogy, and mineral processing. *Journal of Geochemical Exploration.* 74, 3-55.

- Durrant, A.J.; Wood, D.A.; Cain, R.B., 1991. Lignocellulose biodegradation by *agaricus-bisporus* during solid substrate fermentation. *Journal of General Microbiology*, 137, 751-755.
- Feng, M.H., Shang, X.Q., Zhang, S.Z., Wen, B. 2005. Comparison of rizhosphere-based method with other one-step extraction methods for assessing the bioavailability of heavy metals to wheat. *Chemosphere* 59, 939-949.
- Ehers, L.J., Luthy, R.G., 2003. Contaminant bioavailability in soil and sediment. *Environmental Science & Technology* 37, 295-302.
- Ehlken, S., Kirchner, G., 2002. Environmental processes affecting plant root uptake of radioactive trace elements and variability of transfer factor data. A review. *Journal of Environmental Radioactivity* 58, 97-112.
- Elkhatib, E.A., Elshebiny, G.M., Balba, A.M., 1991. Lead sorption in calcareous soil. *Environ. Pollut.* 69, 269-276.
- Encabo, C., Cala, V., Gutierrez-Maroto, A., 1987. Evaluación de la dispersión de metales pesados en suelos del entorno de una mina, mediante el método de especiación secuencial química. *Boletín Geológico y Minero*, 108: 57-68.
- Fourest, E., Volesky, B., 1996. Contribution of sulfonate groups and alginate to heavy metal biosorption by the dry bi interaction of metals and protons with algae. 3. Marine algae, with emphasis on lead and aluminum mass of *Sargassum fluitans*. *Environ. Sci. Technol.* 30, 277-282.
- Fox, T.R., Comerford, N.B., 1990. Low-molecular-weight organic acids in selected forest soils of the southeastern USA. *Soil Science Society of America Journal* 54, 1139-1144.
- Fuentes, D., Disante, K.B., Valdecantos, A., Cortina, J., V.Vallejo, R., 2007. Sensitivity of Mediterranean woody seedlings to cooper, nickel and zinc. *Chemosphere* 66, 412-420.
- Gaballah, I., Kibertus, G., 1998. Recovery of heavy metal ions through decontamination of synthetic solutions and industrial effluents using modified barks. *J. Geochem. Explor.* 62, 241-286.
- Gadd, G.M. 2000. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 271-279.
- Garrido, F., Illera, V., García-Conzález, M.T., 2005. Effect of the addition of gypsum and lime-rich industrial by-products on Cd, Cu and Pb availability and leachability in metal-spiked acid soils. *Appl. Geochem.* 20, 397-408.
- Gerrits, J.P.G. 1994. Composition, use and legislation of spent mushroom substrate in Netherlands. *Compost Science and Utilisation.* 2, 24-30.

- Gordziel, S.A., Flanagan, D.R., Swarbrick, J., 1982. Interaction of mono-molecular films of biological significance with heavy-metal ions and complexes at the air-water-interface .1. stearic-acid and zinc, cadmium, and mercury. *Journal of Colloid and Interface Science* 86 (1), 178-184.
- Guibal, E., Roulph, C., Le Clára, P. 1995. Infrared spectroscopic study of uranyl biosorption of fungal biomass and materials of biological origin. *Environmental Science and Technology*, 29, 2496–2503.
- Guo, M.X., Chorover, J., Fox, R.H., 2001. Effects of spent mushroom substrate weathering on the chemistry of underlying soils. *Journal of Environmental Quality* 30, 2127-2134.
- Hall, J.L. 2002. Cellular mechanism for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53:1–11.
- Hammer, D., Keller, C., 2002. Changes in the rhizosphere of metal accumulating plants evidenced by chemical extractants. *Journal of Environmental Quality* 31, 1561-1569.
- Hanc, A., Tlustos, P., Szakova, J., Habart, J., Gonderk, K., 2008. Direct and subsequent effect of compost and poultry manure on the bioavailability of cadmium and copper and their uptake by oat biomass. *Plant Soil Environ.* 54, 271-278.
- Haq, A.U., Bates, T.E., Soon, Y.K., 1980. Comparison of extractants for plant-available zinc, cadmium, nickel, and copper in contaminated soils. *Soil Science Society of America Journal* 44, 772-777.
- He, Z.L., Yanga, X.E., Stoffellab, P.J., 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Review. J. Trace Elem. Med. Biol.* 19, 125–140.
- Hernandez, A.J. y Pastor, J. 2005. Incidencia conjunta de metales pesados en pastos de vacuno ubicados en el entorno de una mina abandonada en la sierra de Guadarrama. *Producciones agroganaderas: Gestión eficiente y conservación del medio natural (Vol. II), Reunión científica de la SEPP*, 955-962.
- Illera, V. 1998. Especiación de metales pesados en suelos degradados de la CAM tratados con lodo de depuradora y residuo sólido urbano. Memoria presentada para optar al grado de Licenciada en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Madrid. España.
- Illera, V., Garrido, F., Serrano, S., García-González, M.T., 2004. Immobilization of the heavy metals Cd, Cu and Pb in an acid soil amended with gypsum- and lime-rich industrial by-products. *Eur. J. Soil. Sci.* 55, 135-145.
- Jiménez, L., Jiménez, R., Rodríguez, A., Calero, A., Mutjé, P., 2002. Materias primas no madereras para la fabricación de papel. in: *Congreso Iberoamericano de Investigación en Celulosa y Papel*.

- Jiménez, R., Álvarez, A.M. 2005. Control de la degradación de suelos. Ed: Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Jiménez, R., Jordá, L., Jordá, R., Prado, P. 2001. La minería metálica en Madrid desde 1417 hasta nuestros días. Cuaderno de Campo, Instituto Geológico y Minero de España.
- Jones, D.L., Dennis, P.G., Owen, A.G., van Hees, P.A.W. 2003. Organic acid behavior in soils—misconceptions and knowledge gaps. *Plant Soil* 248, 31–41.
- Jones, J.B. y Wolf, B. 1984. Manual of soil testing procedure using modified Morgan extracting reagent. Athens, Georgia, Benton laboratories, 61.
- Jordan, S.N., Mullen, G.J., Murphy, M.C. 2008. Composition variability of spent mushroom compost in Ireland. *Bioresource Technology* 99, 411-418.
- Kabata-Pendias, A. 1995. Agricultural problems related to excessive trace metal contents of soils. En: *Heavy metals problems and solutions* (eds W. Salomons et al.), . 3-18. Springer-Verlag, Berlin.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. 2001. *Trace Elements in Soils and Plants*, Third Edition, CRC Press, USA.
- Kabata-Pendias, A., 2004. Soil-Plant transfer of trace elements-an environmental issue. *Geoderma* 122, 143-149.
- Kaplan, L.A., Standley, L.J., y Newbold, J.D. 1995. Impact on water quality of high and low density applications of spent mushroom substrate to agricultural lands. *Compost Sci. Util.* 3, 55–63.
- Kara, M., Yuzer, H., Sabahand, E., Celik, M.S., 2003. Adsorption of cobalt from aqueous solutions onto sepiolite. *Water Res.* 37, 224-232.
- Karlsson, T., Elgh-Dalgren, K., Bjön, E., Skyllberg, U., 2007. Complexation of cadmium to sulfur and oxygen functional groups in an organic soil. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71, 604–614.
- Kavita, B., Narres, G., Archana, G. 2008. Amelioration of phytotoxic effects of Cd on mung bean seedlings by gluconic acid secreting rhizobacterium *Enterobacter asburiae* PSI3 and implication of role of organic acid. *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 2965–2972.
- Kayode, O., Emmanuel, I., Bamidele, I., 2008. Kinetic and thermodynamic aspects of the adsorption of  $Pb^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  ions on tripolyphosphate-modified kaolinite clay. *Chem. Eng. J.* 136, 99-107.
- Kingery, w.L, Wood, C.W., Delaney, D.P., Williams, J.C., Mullins, G.L., 1994. Impact of long-term land application of broiler litter on environmentally related soil properties. *J. Environ. Qual.* 23, (1), 139-147.

- Kochian, L.V., Pineros, M.A., Hoekenga, O.A. 2005. The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity. *Plant Soil* 274, 175–195.
- Krauskopf, K.B., y Bird, D.K. 1995. *Introduction to geochemistry*. McGraw-Hill, NY,
- Kumar, G.P., Yadav, S.K., Thawale, P.R., Singh, S.K., Juwakar, A.A., 2008. Growth of *Jatropha curcas* on heavy metal contaminated soil amended with industrial wastes and *Azotobacter* - A greenhouse study. *Bioresource Technology* 99 (6): 2078-2082.
- Lau, K.L., Tsang, Y.Y., Chiu, S.W. 2003. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. *Chemosphere*, 52, 1539-1546.
- Levine I.N., 1996. *Fisicoquímica*, Vol 1, 4<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill Spain, 393-399.
- Li, Z.B., Shuman, L.M., 1997. Mobility of Zn, Cd and Pb in soils as affected by poultry litter extract .1. Leaching in soil columns. *Environmental Pollution* 95 (2): 219-226.
- Lindsay, W.L., 1979. *Chemical Equilibria in Soils*. Wiley , New York.
- López, M., González, I., & Romero, A. 2008. Trace elements contamination of agricultural soils affected by sulphide exploitation (Iberian Pyrite Belt, SW Spain). *Environmental Geology*, 54, 805–818.
- López-Cuadrado, M., Ruiz, J., Masaguer, A. 2006. Producción de planta ornamental en contenedor con sustratos alternativos a la turba. IMIDRA, Madrid España.
- Lutts, S., Lefevre, I., Delperece, C., Kivits, S., Dechamps, C., Robledo, A. and Correal, E., 2004. Heavy metals accumulation by the halophyte species Mediterranean saltbush. *J. Environmental Quality* 33, 1271-1279.
- Ma, J.F. 2000. Role of organic acids in detoxification of aluminium in higher plant. *Plant Cell Physiol* 41, 383–390.
- Ma, L.Q., Rao, G.N., 1997. Chemical fractionation of cadmium, copper, nickel, and zinc in contaminated soils. *J. Environ. Qual.* 13, 372–376.
- Madejón, P., Burgos, P., Cabrera, F., Madejon, E., 2009. Phytoestabilization of atended soils polluted with trace elements using the Mediterranean shrub: *Rosmarinus officinalis*. *International Journal of Phytoremediation*, 11, 542-557.
- M.A.P.A. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1994. *Métodos Oficiales de Análisis tomo III*. Edita Secretaría General Técnica, España.
- Markosva, Y.K., Gorinova, N.I., Nevkovska, M.P., Miteva, K.M. 2009. Cadmium-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Brassica juncea* plants. *Biologia Plantarum* 53, 151-154.

- Martinez, M., Miralles, N., Hidalgo, S., Fiol, N., Villaescusa, I., Poch, J., 2006. Removal of lead(II) and cadmium(II) from aqueous solutions using grape stalk waste. *Journal of Hazardous Materials* 133 (1-3): 203-211.
- Mata, Y. N., Blazquez, M. L., Ballester, A., Gonzalez, F., Munoz, J. A., 2008. Characterization of the biosorption of cadmium, lead and copper with the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Journal of Hazard Mater* 158, (2-3), 316-323.
- Macnair, M.R. 2003. The hyperaccumulation of metals by plants. *Advances in Botanical Research* 40: 63-105.
- McGrath, S.P. y Zhao, F.J. 2003. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current Opinion in Biotechnology*. 14: 277-282.
- McLaughlin, M.J., Singh, B.R. 1999. *Cadmium in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London.
- Meharg, A.A 2005. Mechanisms of plant resistance to metal and metalloid ions and potential biotechnological applications. *Plant Soil* 274, 163–174.
- Mingxin, G., Jon, C., Rex, R., Richard, H. F. 2001 a. Leachate Chemistry of Field-Weathered Spent Mushroom Substrate. *Journal of Environmental Quality* 30, 1699-1709.
- Mingxin, G., Jon, C., Rex, R., Richard, H. F. 2001 b. Effects of Spent Mushroom Substrate Weathering on the Chemistry of Underlying Soils. *Journal of Environmental Quality* 30, 2127-2134.
- Mohseni, M., Allen, D.G., Nichols, K.M. 1998. Biofiltration of alpha - pinene and its application to the treatment of pulp and paper air emission. *TAPPI Journal* 81, 205-211.
- Mu-Hua, F., Shao-quan, S., Shuzhen, Z., Bei, W. 2005. A comparison of the rhizosphere-based method with DTPA, EDTA, CaCl<sub>2</sub>, and NaNO<sub>3</sub> extraction methods for prediction of bioavailability of metals in soil to barley. *Environmental Pollution* 137, 231-240.
- Nachtigall, G.R., Nogueiro, R.C., Alleoni, L.R.F., Cambri, M.A., 2007. Copper concentration of vineyard soils as a function of pH variation and addition of poultry litter. *Braz. Arch. Biol. Techn.* 50, (6), 941-948.
- Navarro, A., Martinez, F., 2008. Effects of sewage sludge application on heavy metal leaching from mine tailings impoundments. *Bioresource Technology* 99, 7521-7530.
- Neel, C., Bril, H., Courtin-Nomade, A., & Dutreuil, J. P. 2003. Factors affecting natural development of soil on 35-year-old sulphide-rich mine tailings. *Geoderma*, 111, 1–20.



- Negro, C., Tommasi, L., Miceli, A., 2003. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technol.* 87, 41-44.
- Norvell, W.A., 1984. Comparison of chelating agents as extractants for metals in diverse soil materials. *Soil Science Society of America Journal* 48, 1285-1292.
- Novozamsky, I., Lexmond, T.H.M., Houba, V.J.G., 1993. A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals by plants. *International Journal Environmental Analytical Chemistry* 51, 47-58.
- Ordieres, J., Alba, F., 2000. Proyecto de investigación sobre la generación de biomasa desde el residuo de champiñón. V Internacional Congreso in Project Management.
- Pagnanelli, F., Papini, P.M., Toro, L. 2000. Biosorption of metal ions on arthrobacter sp: biomasa characterization and biosorption modeling. *Environmental Science Technology*, 34, 2773-2778.
- Parks, G.A. 1965. The isoelectric points of solid oxides, solid hydroxides and aqueous hydroxy complex systems. *Chem. Rev.* 65, 177-198.
- Pichtel, J., Bradway, D.J., 2008. Conventional crops and organic amendments for Pb, Cd and Zn treatment at a severely contaminated site. *Bioresource Technology* 99 (5): 1242-1251.
- Porta, J., López-Acevedo, M., y Roquero, C. 1999. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Ediciones Mundi-Prensa. España.
- Poschenrieder, C., Tolrà, R. y Barceló, J. 2006. Can metals defend plants against biotic stress?. *Trends in Plant Science* 11: 288-295.
- Preston, C.M., 1996. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Science* 161, 144-166.
- Preston, C.M., Forrester, P.D. 2004. Chemical and carbon-13 cross-polarization magic-angle spinning nuclear magnetic resonance characterization of logyard fines from british Columbia. *Journal of Environmental Quality*. 33, 767-777.
- Pretsch, E., Büblmann, P., Affolter, C., Herrera, A., Martínez, R. 2005. Determinación estructural de compuestos orgánicos. Masson S.A. Barcelona España.
- Reboreda, R., Caçador, I., 2007. Copper, zinc and lead speciation in salt marsh sediments colonised by *Halimione portulacoides* and *Spartina maritime*. *Chemosphere* 69, 1655-1661.
- Rhoades, J., 1982. Cation Exchange Capacity. in: A.L. page (Ed). *Methods of soil analysis, part 2. Agronomy Monograph n° 9.* Madison.

- Ryan, P.R., Delhaize, E., Jones, D.L. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52, 527–556.
- Salt, D.E. 2006. An extreme Plant Lifestyle: Metal Hyperaccumulation. En: *Plant Physiology Online*. Chapter 26. Essay 26.2. Disponible en: <http://4e.plantphys.net/article.php?ch=&id=356>.
- Sart, A., Tuzen, M., 2008. Biosorption of Pb(II) and Cd(II) from aqueous solution using green alga (*Ulva lactuca*) biomass. *J. Hazard. Mater.* 152, 302-308.
- Sauve', S., Norvell, W.A., McBride, M., Hendershot, W., 2000. Speciation and complexation of cadmium in extracted soil solutions. *Environmental Science & Technology* 34, 291-296.
- Schat, H., Llugany, M. y Bernhard, R. 2000. Metal-specific patterns of tolerance, uptake and transport of heavy metals in hyperaccumulating and nonhyperaccumulating metallophytes. En: *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water* (eds. Terry, N. y Bañuelos, G.), pp. 171-200, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA.
- Schuylenaorh, J. y Arens, P.L. 1950. The electrokinetic behaviour of freshly prepared  $\gamma$ - and  $\alpha$ -FeOOH. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 69, 1557-1565.
- Sencindiver, J. C., y Ammons, J. T. 2000. Minesoil genesis and classification. In: R. I. Barnhisel, R. G. Darmody, W. L. Daniels (Eds.), *Reclamation of drastically disturbed lands*. American Society of Agronomy, Agronomy Series, 41.
- Seoanez, M. 1999. Contaminación del suelos: estudios, tratamiento y gestión. Ed: Mundiprensa. Madrid.
- Shu, W.S., Ye, Z.H., Lan, C.Y., Zhang, Z.Q., Wong, M.H., 2002. Lead, zinc, and copper accumulation and tolerance in populations of *Paspalum distichum* and *Cynodon dactylon*. *Environmental Pollution* 120, 445–453.
- Shuman, L.M. 1977. Adsorption of Zn by Fe and Al hydrous oxides as influenced by aging and pH. *Soil Science Society of America Journal*, 41, 703-706.
- Shuman, L.M. 1998. Effects of organic waste amendments on cadmium and lead in soil fractions of two soils. *Communication in Soil. Sci. Plant Anal.*, 29, 2939-2952.
- Slobodan, K., 2007. A consideration of the correct calculation of thermodynamic parameters of adsorption. *J. Serb. Chem. Soc.* 72, 1363-1367.
- Smith, J.M., 1981. *Chemical Engineering Kinetics*, third ed., McGraw-Hill, New York, 310-322.
- Sousa, A.I., Caçador, I., Lillebø, A.I., Pardal, M.A., 2008. Heavy metal accumulation in *Halimione portulacoides*. *Chemosphere* 70, 850-857.

- Stark, L.R., Williams, F.M. 1994. The roles of spent mushroom substrate for the mitigation of coal mine drainage. *Compost Science and Utilization* 2, 84-94.
- Stark, L.R., Wenerick, W.R., Williams, F.M., Stevens, S.E. Jr., Wuest, P.J. 1994. Restoring the capacity of spent mushroom compost to treat coal mine drainage by reducing the inflow rate: A microcosm experiment. *Water and Air Pollution* 75, :405-420.
- Stevenson, F.J. 1994. *Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions.* 2nd. ed., Wiley.
- Schwertmann, U. y Taylor, R.M. 1977. Iron oxides. Pp. 145-180 in: *Minerals in Soil Environments.* (J.B. Dixon & S.B. Weed, editors). Soil Sci. Soc. Amer.
- Szmidt, A.K.R., y Chong, C. 1995. Uniformity of spent mushroom substrate (SMS) and factors in applying recommendations for use. *Compost Sci. Util.* 3, 72-79.
- Tapia, Y.M. 2007. Movilidad de metales pesados en sustratos de restos de podas y biosólidos. Ensayos de fitorremediación con *Rosmarinus officinales* y *Atriplex halimus*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Madrid. España.
- Tarley, C.R.T., Arruda, M.A.Z. 2004. Biosorption of heavy metal using rice milling by-products. Characterisation and application for removal of metals from aqueous effluents. *Chemosphere*, 54, 987-995.
- Tatiana, M., Alesi, S., Andrei, S., 2002 in: *Proceedings of the 17th WCSS.* 14-21
- Tessier, A., Campbell., P.G.C., Bisson, M. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metal. *Anal. Chem.* SI. 844-851.
- Thornton, I. 1996. Impacts of mining on the environment: some local, regional and global issues. *Applied Geochemistry*, 11, 355-361.
- Town, R.M., Powell, H.K.J., 1993. Ion-selective electrode potentiometric studies on the complexation of copper (II) by soil-derived humic and fulvic-acids. *Anal. Chim. Acta.* 279, (2), 221-233.
- UNE-EN 13037, 1999. Mejoradores de suelo y sustratos de cultivo. Determinación de pH. AENOR, España.
- UNE-EN 13038, 2001. Mejoradores de suelo y sustratos de cultivo. Determinación de conductividad eléctrica. AENOR, España.
- UNE-EN 13039, 2001. Mejoradores de suelo y sustratos de cultivo. Determinación del contenido de materia orgánica y de las cenizas. AENOR, España.
- UNE-EN 13650, 2002. Mejoradores de suelo y sustratos de cultivo. Extracción de elementos solubles en agua regia. AENOR, España.

- UNE-EN 13651, 2002. Mejoradores de suelo y sustratos de cultivo. Extracción de nutrientes solubles en cloruro cálcico/DTPA (CAT). AENOR, España.
- UNE-EN 13652, 2002. Mejoradores de suelo y sustratos de cultivo. Extracción de nutrientes y elementos solubles en agua. AENOR, España.
- UNE-EN 13654-1, 2002. Mejoradores de suelo y sustratos de cultivo. Determinación de nitrógeno. AENOR, España.
- Urrutia, M., Graña, J., García-Rodeja, R., Macías, F. 1987. Procesos de oxidación de la pirita en medios superficiales: potencial acidificante e interés para la recuperación de suelos de mina. Cuaderno de Laboratorio Xeológico de Laxe 11, 131-145.
- Vaca-Paulin, R., Esteller-Alberich, M.V., Lugo-de la Fuente, J., Zavaleta-Mancera, H.A. 2006. Effect of sewage sludge or compost on the sorption and distribution of copper and cadmium in soil. *Waste Management*. 26, 71-78.
- Vedder, P.J.C., Galindo, J.M. 1979. Cultivo moderno del champiñón. Ed: Mundiprensa. Madrid, España.
- Vega, F. A., Covelo, E. F., Andrade, M. L., Marcet, P. 2004. Relationships between heavy metals content and soil properties in mine soils. *Analytica Chimica Acta*, 524, 141–150.
- Vega, F.A., Covelo, E.F., Andrade, M.L., 2006. Competitive sorption and desorption of heavy metals in mine soils: influence of mine soil characteristics. *J. Colloid Interf. Sci.* 298, 582–592.
- Walter, I., Martínez, F., Cala, V. 2006. Heavy metal speciation and phytotoxic effects of three representative sewage sludges for agricultural uses. *Environmental Pollution*, 139, 507-514.
- Williams, I., 2001. *Environmental Geochemistry*. Ed: Wiley, NY.
- Winter, E.M. y Redente, E.F. 2002. Reclamation of High-Elevation, Acidic Mine Waste with Organic Amendments and Topsoil. *J. Environ. Qual.* 31,1528–1537.
- Wong, K.K., Lee, C.K, Low, K.S., 2003. Removal of Cu and Pb by tartaric acid modified rice husk from aqueous solutions. *Chemosphere*. 50, (1), 23-28.
- Wu, Q., Xu, Z., Meng, Q., gerard, E., Morel, J., 2004. Characterization of cadmium desorption in soils and its relationships to plant uptake and cadmium leaching. *Plant and Soil* 258, 217-226.
- Wuest, P.J., Fahy, H.K. 1991. Spent mushroom compost. *Traists and Uses. Mushroom News*, 39, 9-15.
- Xiong, C.H., Yao, C.P. 2009. Study on the adsorption of cadmium (II) from aqueous solution by D152 resin. *Journal of Hazardous Materials* 166 (2-3): 815-820.

- Yun, Y.S., Park, D., Park, J.M. 2001. Biosorption of trivalent chromium on the brown seaweed biomass. *Environmental Science Technology*, 35, 4353-4358.
- Zhou, D., Zhang, L., Guo, S., 2005. Mechanisms of lead biosorption on cellulose/chitin beads. *Water Res.* 39, 3755-3762.
- Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Tarun, A.S., Weber, S.U., Jouanim, L., Terry, N. 1999. Cadmium tolerance and accumulation in Indian Mustard is enhanced by overexpressing gamma -Glutamylcysteine Synthetase. *Plant Physiol*, 121, 1169-1177.
- Zibilske, L.M. 1998. Composting of organic wastes. p. 482. In D.M. Sylvia et al. (ed.). *Principles and applications of soil microbiology*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Zmora-Nahum, S., Hadar, Y., Chen, Y. 2007. Physico-chemical properties of commercial composts varying in their source materials and country of origin. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 1263-1276.