



ETSIA

Escuela Técnica
Superior
de Ingeniería
Agronómica

Efecto del agua de poro extraída de residuos mineros enmendados con dos tipos de biochar y sometidos a condiciones de hidromorfía sobre la germinación y el vigor de plántulas de dos especies halófitas

**Effect of pore water from mine wastes amended with two
types of biochar under hydromorphic conditions, on the
germination and vigour of seedlings of two halophytic
species**

TRABAJO FIN DE ESTUDIO

**GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y DE SISTEMAS
BIOLÓGICOS**

Alumna: Isabel Galindo Muñoz

Directora del TFE: María José Vicente Colomer

Codirector del TFE: José Álvarez Rogel



Universidad
Politécnica
de Cartagena

Cartagena, julio de 2018

**EFFECTO DE DOS ENMIENDAS DE RESIDUOS MINEROS
DE ZONAS SALINAS SOBRE LA GERMINACIÓN Y EL
VIGOR DE PLÁNTULAS DE DOS ESPECIES
HALÓFITAS**

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA



Alumna:

Isabel Galindo Muñoz

Directora:

María José Vicente Colomer

Codirector:

José Álvarez Rogel

Cartagena, julio de 2018



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL

María José Vicente Colomer, Profesora Titular de Universidad, adscrita al Departamento de Producción Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena,

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo Fin de Grado, titulado “Efecto del agua de poro extraída de residuos mineros enmendados con dos tipos de biochar y sometidos a condiciones de hidromorfia sobre la germinación y el vigor de plántulas de dos especies halófitas”, presentado por D^a. Isabel Galindo Muñoz, ha sido realizado bajo su dirección.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente documento en Cartagena, a 10 de julio de dos mil dieciocho.

**MARIA JOSE
VICENTE
COLOMER**

Firmado digitalmente por MARIA JOSE|VICENTE|COLOMER
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=MARIA JOSE|VICENTE|COLOMER,
serialNumber=39852927E,
givenName=MARIA JOSE,
sn=VICENTE COLOMER,
ou=Ciudadanos, o=ACCV, c=ES
Fecha: 2018.07.12 09:43:54 +02'00'

Fdo.: María José Vicente Colomer



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGRARIA

José Álvarez Rogel, Profesor Titular de Universidad, adscrito al Departamento de Ciencia y Tecnología Agraria de la Universidad Politécnica de Cartagena,

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo Fin de Grado, titulado “Efecto del agua de poro extraída de residuos mineros enmendados con dos tipos de biochar y sometidos a condiciones de hidromorfía sobre la germinación y el vigor de plántulas de dos especies halófitas”, presentado por D^a. Isabel Galindo Muñoz, ha sido realizado bajo su codirección.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente documento en Cartagena, a 10 de julio de dos mil dieciocho.

**JOSE|
ALVAREZ|
ROGEL**

Firmado digitalmente por JOSE|
ALVAREZ|ROGEL
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=JOSE|ALVAREZ|ROGEL,
serialNumber=27466005A,
givenName=JOSE, sn=ALVAREZ
ROGEL, ou=Ciudadanos, o=ACCV,
c=ES
Fecha: 2018.07.12 10:56:47 +02'00'

Fdo.: José Álvarez Rogel

Agradecimientos

A mis padres y compañeros por apoyarme en buenos y malos momentos durante esta etapa de aprendizaje. A todos los profesores que han compartido conmigo sus conocimientos para formarme. Y, por supuesto, agradecer a María José y Pepe por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y ayudarme a realizarlo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación del estudio.....	2
1.2. Sierra Minera de Cartagena-La Unión.....	3
1.2.1. Localización.....	3
1.2.2. Sierra Minera de Cartagena-La Unión en período de actividad minera.....	3
1.2.3. Consecuencias de la explotación intensiva.....	4
1.3. Las plantas halófitas.....	6
1.3.1. <i>Sarcocornia fruticosa</i>	6
1.3.2. <i>Arthrocnemum macrostachyum</i>	11
1.4. Fitorremediación.....	14
1.4.1. Fitorremediación de metales pesados.....	14
1.4.2. Biochar como enmienda.....	16
1.4.2.1. Mecanismos de sorción de metales.....	16
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo e hipótesis de partida.....	19
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y METODOLOGÍA	20
3.1. Descripción del proyecto, diseño del experimento y obtención y características del agua de poro.....	21
3.2. Ensayos de germinación.....	26
3.2.1. Materiales.....	26
3.2.1.1. Material de laboratorio.....	26
3.2.1.2. Material vegetal.....	26
3.2.1.3. Aguas de poro utilizadas en los ensayos de germinación y vigor.....	27
3.2.2. Metodología de los ensayos de germinación.....	27
3.3. Ensayos de vigor.....	31
3.3.1. Metodología de los ensayos de vigor.....	31

3.4. Análisis estadístico.....	32
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	33
4.1. Resultados de <i>Sarcocornia fruticosa</i>	34
4.1.1. Resultados de germinación de <i>S. fruticosa</i> en agua de poro de residuos mineros ácidos.....	34
4.1.2. Resultados de germinación de <i>S. fruticosa</i> en agua de poro de residuos mineros básicos.....	37
4.1.3. Resultados de vigor de <i>S. fruticosa</i> en agua de poro de residuos mineros ácidos.....	40
4.1.4. Resultados de vigor de <i>S. fruticosa</i> en agua de poro de residuos mineros básicos.....	44
4.2. Resultados de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i>	48
4.2.1. Resultados de germinación de <i>A. macrostachyum</i> en agua de poro de residuos mineros ácidos.....	48
4.2.2. Resultados de germinación de <i>A. macrostachyum</i> en agua de poro de residuos mineros básicos.....	51
4.2.3. Resultados de vigor de <i>A. macrostachyum</i> en agua de poro de residuos mineros ácidos.....	54
4.2.4. Resultados de vigor de <i>A. macrostachyum</i> en agua de poro de residuos mineros básicos.....	58
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.....	62
5.1. Discusión.....	63
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES.....	68
6.1. Conclusiones.....	69
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	70
7.1. Bibliografía.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Ubicación de la Sierra Minera de Cartagena-La Unión.....	3
FIGURA 2. Frumkin, R. Valle de Acre, saladar de Na'aman. Vista de <i>Sarcocornia fruticosa</i>	7
FIGURA 3. Fernández, I. (2016). <i>Sarcocornia fruticosa</i> . Vista de ramillas con flores.....	8
FIGURA 4. . Duarte, B. (2012). <i>Sarcocornia fruticosa</i> presenta una coloración roja durante el verano debido a las concentraciones excesivas de sal en los sedimentos.....	9
FIGURA 5. Lám. 158 - <i>Sarcocornia fruticosa</i> , marismas de Almonte, Huelva (MA 221039).....	10
FIGURA 6. Darmarin, A. (2016). <i>Arthrocnemum macrostachyum</i>	11
FIGURA 7. Chetalain, <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> (Moric) K. Koch. Vista de ramillas con flores.....	12
FIGURA 8. Lám. 157 - <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> , Villamejor, Aranjuez, Madrid (MA 282600).....	13
FIGURA 9. Esquema adaptado de Li et al., 2017. Mecanismos de retención de metales pesados por el biochar.....	17
FIGURA 10. Derecha: Imagen de los tubos de PVC utilizados en el experimento. Izquierda: Esquema del diseño experimental.....	24
FIGURA 11. Imagen de una columna experimental con los electrodos de pH y Eh y las sondas Rhizon® en el cubo con agua para simular el nivel freático.....	24
FIGURA 12. Tamices con varias granulometrías.....	28
FIGURA 13. Semillas de <i>Sarcoconia fruticosa</i> sobre papel de filtro en placa de Petri.....	29
FIGURA 14. Semillas germinadas de <i>Sarcoconia fruticosa</i>	30
FIGURA 15. Plántulas de <i>Sarcoconia fruticosa</i> tras 15 días en cámara de cultivo.....	31
FIGURA 16. Plántula de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> sobre papel milimetrado vista desde la lupa.....	31
FIGURA 17. Germinación de <i>Sarcocornia fruticosa</i> expresada en porcentaje de cada uno de los tratamientos que contienen residuos mineros ácidos más el tratamiento control.....	34
FIGURA 18. Curva de germinación de <i>Sarcocornia fruticosa</i> en agua de poro de residuo minero ácido.....	35
FIGURA 19. Tiempo medio de germinación (TMG) de <i>Sarcocornia fruticosa</i> en cada uno de los tratamientos que contienen residuos mineros ácidos.....	36
FIGURA 20. Germinación de <i>Sarcocornia fruticosa</i> expresada en porcentaje de cada uno de los tratamientos que contienen residuos mineros básicos más el tratamiento control.....	37
FIGURA 21. Curva de germinación de <i>Sarcocornia fruticosa</i> en agua de poro de residuo minero básico.	38

FIGURA 22. Tiempo medio de germinación (TMG) de <i>Sarcocornia fruticosa</i> en cada uno de los tratamientos que contienen residuos mineros básicos.	39
FIGURA 23. Plántulas de <i>Sarcocornia fruticosa</i> del tratamiento control.....	40
FIGURA 24. Plántulas de <i>Sarcocornia fruticosa</i> del tratamiento A.....	40
FIGURA 25. Plántulas de <i>Sarcocornia fruticosa</i> del tratamiento A-BED.....	40
FIGURA 26. Plántulas de <i>Sarcocornia fruticosa</i> del tratamiento A-BRU.....	40
FIGURA 27. Longitud de la raíz de <i>Sarcocornia fruticosa</i> tras 15 días en agua de poro con residuos mineros ácidos.....	41
FIGURA 28. Longitud del hipocótilo de <i>Sarcocornia fruticosa</i> tras 15 días en agua de poro con residuos mineros ácidos.....	42
FIGURA 29. Longitud de los cotiledones de <i>Sarcocornia fruticosa</i> tras 15 días en agua de poro con residuos mineros ácidos.	43
FIGURA 30. Plántulas de <i>Sarcocornia fruticosa</i> del tratamiento control.....	44
FIGURA 31. Plántulas de <i>Sarcocornia fruticosa</i> del tratamiento B.....	44
FIGURA 32. Plántulas de <i>Sarcocornia fruticosa</i> del tratamiento B-BED.....	44
FIGURA 33. Plántulas de <i>Sarcocornia fruticosa</i> del tratamiento B-BRU.....	44
FIGURA 34. Longitud de la raíz de <i>Sarcocornia fruticosa</i> tras 15 días en agua de poro con residuos mineros básicos.....	45
FIGURA 35. Longitud del hipocótilo de <i>Sarcocornia fruticosa</i> tras 15 días en agua de poro con residuos mineros básicos.	46
FIGURA 36. Longitud de los cotiledones de <i>Sarcocornia fruticosa</i> tras 15 días en agua de poro con residuos mineros básicos.	47
FIGURA 37. Germinación de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> expresada en porcentaje de cada uno de los tratamientos que contienen residuos mineros ácidos.....	48
FIGURA 38. Curva de germinación de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> en agua de poro de residuo minero ácido.....	49
FIGURA 39. Tiempo medio de germinación (TMG) de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> en cada uno de los tratamientos que contienen residuos mineros ácidos.....	50
FIGURA 40. Germinación de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> expresada en porcentaje de cada uno de los tratamientos que contienen residuos mineros básicos.....	51
FIGURA 41. Curva de germinación de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> en agua de poro de residuo minero básico.	52
FIGURA 42. Tiempo medio de germinación (TMG) de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> en cada uno de los tratamientos que contienen residuos mineros básicos.....	53
FIGURA 43. Plántula de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> del tratamiento control.....	54
FIGURA 44. Plántula de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> del tratamiento A.....	54

FIGURA 45. Plántula de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> del tratamiento A-BED.....	54
FIGURA 46. Plántula de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> del tratamiento A-BRU.....	54
FIGURA 47. Longitud de la raíz de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> tras 15 días en agua de poro con residuos mineros ácidos.....	55
FIGURA 48. Longitud del hipocótilo de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> tras 15 días en agua de poro con residuos mineros ácidos.....	56
FIGURA 49. Longitud de los cotiledones de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> tras 15 días en agua de poro con residuos mineros ácidos.....	57
FIGURA 50. Plántula de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> del tratamiento control.....	58
FIGURA 51. Plántula de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> del tratamiento B.....	58
FIGURA 52. Plántula de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> del tratamiento B-BED.....	58
FIGURA 53. Plántula de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> del tratamiento B-BRU.....	58
FIGURA 54. Longitud de la raíz de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> tras 15 días en agua de poro con residuos mineros básicos.....	59
FIGURA 55. Longitud del hipocótilo de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> tras 15 días en agua de poro con residuos mineros básicos.	60
FIGURA 56. Longitud de los cotiledones de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> tras 15 días en agua de poro con residuos mineros básicos.	61

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Tabla adaptada de Conesa y Schulín, 2010. Las dos especies halófitas elegidas en este estudio y su captación de metales pesados en las diferentes ubicaciones.....	15
TABLA 2. Características del residuo ácido (A) y básico (B).....	21
TABLA 3. Características del biochar de lodos de depuradora (BED) y de podas urbanas (BRU).....	22
TABLA 4. Características del agua de poro de los diferentes tratamientos, utilizada en los ensayos de germinación y vigor.....	27
TABLA 5. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de los porcentajes de germinación de <i>Sarcocornia fruticosa</i> en residuos mineros ácidos.....	34
TABLA 6. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial del tiempo medio de germinación en <i>Sarcocornia fruticosa</i> con residuos mineros ácidos.....	36
TABLA 7. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de los porcentajes de germinación en <i>Sarcocornia fruticosa</i> con residuos mineros básicos.....	37
TABLA 8. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial del tiempo medio de germinación en <i>Sarcocornia fruticosa</i> con residuos mineros básicos.....	39
TABLA 9. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud de la raíz de <i>Sarcocornia fruticosa</i> con residuos mineros ácidos.....	41
TABLA 10. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud del hipocótilo de <i>Sarcocornia fruticosa</i> con residuos mineros ácidos.....	42
TABLA 11. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud de los cotiledones de <i>Sarcocornia fruticosa</i> con residuos mineros ácidos.....	43
TABLA 12. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud de la raíz de <i>Sarcocornia fruticosa</i> con residuos mineros básicos.....	45
TABLA 13. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud del hipocótilo de <i>Sarcocornia fruticosa</i> con residuos mineros básicos.....	46
TABLA 14. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud de los cotiledones de <i>Sarcocornia fruticosa</i> con residuos mineros básicos.....	47
TABLA 15. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de los porcentajes de germinación de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> en residuos mineros ácidos.....	48
TABLA 16. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial del tiempo medio de germinación en <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> con residuos mineros ácidos.....	50
TABLA 17. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de los porcentajes de germinación en <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> con residuos mineros básicos.....	51
TABLA 18. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial del tiempo medio de germinación en <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> con residuos mineros básicos.....	53
TABLA 19. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud de la raíz de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> con residuos mineros ácidos.....	55
TABLA 20. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud del hipocótilo de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> con residuos mineros ácidos.....	56

TABLA 21. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud de los cotiledones de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> con residuos mineros ácidos.....	57
TABLA 22. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud de la raíz de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> con residuos mineros básicos.....	59
TABLA 23. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud del hipocótilo de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> con residuos mineros básicos.....	60
TABLA 24. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud de los cotiledones de <i>Arthrocnemum macrostachyum</i> con residuos mineros básicos.....	61

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Para la regeneración de la cubierta vegetal en ambientes degradados por metales pesados como son las balsas o pantanos de estériles mineros, es muy recomendable realizar estudios previos acerca de la toxicidad de los residuos mineros en semillas, plántulas y plantas jóvenes/adultas, así como del efecto que pueden tener posibles enmiendas para mejorar las condiciones edáficas.

En este proyecto se ha utilizado la respuesta germinativa y los primeros estadios de desarrollo de dos especies de plantas halófitas, capaces de crecer en zonas afectadas por metales pesados, para evaluar la efectividad de dos tipos de biochar como enmiendas de residuos mineros. Los residuos mineros utilizados se recogieron de la Sierra Minera de Cartagena-La Unión, en la que millones de toneladas de dichos residuos que permanecen allí desde el cierre definitivo de las minas en 1991 expuestos a la erosión hídrica y eólica, lo que supone un riesgo de transferencia de contaminantes al entorno. El biochar fue fabricado a partir de lodos de depuradora y podas de árboles urbanos, dos tipos de residuos que se producen de forma habitual en los núcleos urbanos. La utilización de ambos residuos como enmiendas supone, por tanto, una manera de reutilizarlos y de revalorizarlos.

1.2 SIERRA MINERA DE CARTAGENA-LA UNIÓN

1.2.1 Localización

La Sierra Minera de Cartagena-La Unión se sitúa en el borde meridional de la Región de Murcia y ocupa una superficie aproximada de 100 km².

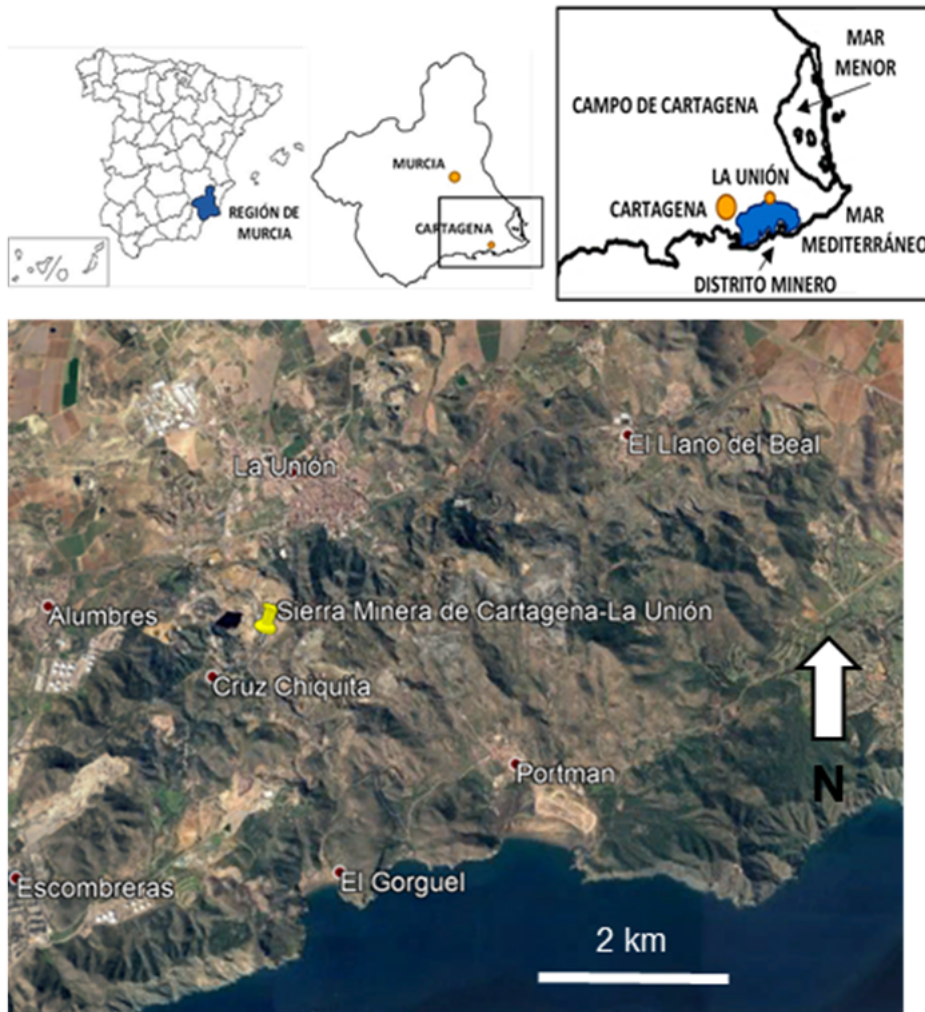


FIGURA 1. Ubicación de la Sierra Minera de Cartagena-La Unión.

1.2.2 Sierra Minera de Cartagena-La Unión en período de actividad minera

Esta sierra contenía importantes reservas minerales con un variado contenido metálico (plomo, plata, hierro, cinc, etc.), siendo el plomo el más abundante y el que ha articulado la actividad minera desde tiempos remotos, donde los cartagineses y romanos excavaron pozos y galerías en busca de este metal.

En la década de 1950 la empresa Peñarroya adquirió la propiedad de la mayor parte de la Sierra Minera. Comenzaron las explotaciones a cielo abierto, lo que suponía graves problemas ambientales, además, se vertían los residuos de la minería al mar, muchos de ellos en la bahía de Portman. Llegaron a verter, más de 60 millones de toneladas de estériles con altas concentraciones de metales pesados (cadmio, plomo) y con productos usados en el lavado de minerales (sulfato de cobre, cianuro sódico, sulfato de cinc y ácido sulfúrico). La empresa finalizó su actividad en 1988, por motivos económicos y de presión social contra los vertidos al mar. Y con ello, en 1991 se puso fin al período de actividad minera en la Sierra de Cartagena-La Unión.

1.2.3 Consecuencias de la explotación intensiva

La explotación de la Sierra Minera afectó gravemente a todo el entorno, con el vertido de estériles al mar en la bahía de Portman y con las explotaciones a cielo abierto que provocaron graves problemas medioambientales por los inmensos movimientos de tierra. Estos grandes volúmenes de tierra o rocas, desmontes, escombreras, balsas de sedimentación y terraplenes, están sujetos a movimientos masivos y a erosión por los agentes exógenos (Vera, 1979).

Los residuos generados se componen por una mezcla fangosa de roca molida con altos contenidos en metales y restos de compuestos químicos empleados en el molturado y lavado del mineral. Estos residuos pueden liberar metales tóxicos durante cientos de años tras el cese de la actividad minera (Gundersen et al., 2001). Se trata de un residuo muy susceptible de ser erosionado, especialmente en áreas donde las lluvias presentan carácter torrencial (Jacob y Otte, 2004; Gieré et al., 2003). La erosión hídrica es considerada uno de los principales factores de erosión, aunque a largo plazo, la erosión eólica también se consideró un riesgo importante. Sin embargo, la primera es de mayor preocupación ya que se presentan lluvias cortas y de alta intensidad, por lo que se transportan grandes cantidades de desechos en las ramblas en un corto tiempo y a grandes distancias (Conesa y Schulin, 2010).

Por otro lado, una de las causas más importantes en la contaminación de las aguas es la generación de drenajes ácidos por la oxidación de los minerales con sulfuros como son las piritas (Sainz et al., 2003; Grande et al., 2005). El bajo pH resultante promueve la dilución de minerales y la liberación de metales tóxicos y otros compuestos en los cuerpos de agua. Para evitar este proceso algunos de los relaves han sido cubiertos con una mezcla que contiene cal (Conesa y Schulin, 2010).

Los contenidos en metales pesados de estos residuos mineros, mayoritariamente de cinc y plomo, los convierten en posibles contaminantes de suelos y aguas superficiales y subterráneas (Belmonte, Romero y Moreno, 2010). En total, se encuentran 8,82 km² (Conesa y Schulin, 2010) directamente afectados por los 2.351 depósitos de la minería (García, 2004).

Los estudios han demostrado la presencia de altas concentraciones de metales en los sedimentos de los cauces y desembocaduras de las ramblas y las marismas costeras adyacentes (por ejemplo, 500 mg kg⁻¹ As, 12 000 mg kg⁻¹ Pb). Hay siete ramblas principales que drenan el área minera. Cinco de ellas fluyen hacia la laguna Mar Menor (Miedo, Matildes, Beal, Ponce, Carrasquilla) y dos hacia el Mar Mediterráneo (El Gorguel y Portman) (Conesa y Schulin, 2010).

Los desechos mineros en el área son espontáneamente colonizados por especies de plantas nativas. En los relaves (o balsas de estériles), la mayoría de las especies son gramíneas

(por ejemplo, *Lygeum spartum*, *Piptatherum miliaceum*); en las marismas contaminadas dominan las especies halófitas (por ejemplo, *Arthrocnemum macrostachyum*). La absorción de metales por las plantas es muy variable y depende de la especie, del pH del suelo y de muchos otros factores. Las pruebas preliminares han demostrado la utilidad de diversos tipos de enmiendas (cal, fertilizante, estiércol de cerdo) para mejorar el establecimiento de ciertas especies de plantas sobre las zonas afectadas por los residuos mineros, lo que se conoce como fitomanejo. Dentro de las opciones de fitomanejo, la fitoestabilización es una de las alternativas más interesantes, ya que implica disminuir la erosión y reducir la movilidad y transferencia de metales a la cadena trófica (Conesa y Schulín, 2010). Entre las especies más interesantes para este tipo de técnicas están las plantas halófitas ya que son capaces de tolerar la salinidad que suelen presentar los residuos mineros y también toleran la presencia de metales pesados (Párraga-Aguado et al., 2014).

1.3 LAS PLANTAS HALÓFITAS

Hay numerosas definiciones basadas en el punto de vista de diversos autores. Según Waisel (1972), se definen como plantas que crecen satisfactoriamente y completan su ciclo de vida en hábitats con un alto contenido en sal. Desde un punto de vista fisiológico, las halófitas son reconocidas como plantas que pueden sobrevivir a altas concentraciones de electrolitos en sus sustratos (Flowers et al., 1977). Estos sustratos están dominados mayoritariamente por NaCl, pero también pueden contener otras sales como Na₂SO₄, MgSO₄, CaSO₄, MgCl₂, KCl y Na₂CO₃ (Grigore y Toma, 2017). Pueden habitar en suelos con una salinidad mayor a 200 mM NaCl según Flowers y Colmer (2008).

Crece en una amplia variedad de hábitats salinos: dunas de arena costeras, saladares, marismas, salinas, estepas salinas, etc.

1.3.1 *Sarcocornia fruticosa*

Taxonomía:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Caryophyllidae

Orden: Caryophyllales

Familia: Chenopodioideae

Género: *Sarcocornia* A.J. Scott

Especie: *Sarcocornia fruticosa* (L.) A.J. Scott



FIGURA 2. Frumkin, R. Valle de Acre, saladar de Na'aman. Vista de *Sarcocornia fruticosa*. Recuperado de <http://flora.org.il>.

Sarcocornia fruticosa (L.) A.J. Scott es un arbusto que mide entre 50-150 cm de altura, es erecto, muy ramificado y radicante. La parte basal de los tallos es leñosa. Sus ramas pueden ser de rectas a ascendentes. Sus hojas son opuestas, reducidas a escamillas soldadas en la base que se disponen en el ápice de cada artejo formando un anillo cupuliforme de bordes hialinos y ápices puntiagudos. Las inflorescencias, con flores hermafroditas, son espiciformes, terminales y laterales y que están formadas por cimas trifloras. La flor central se sitúa a mayor altura que las laterales; perianto carnoso formado por la fusión de cuatro tépalos (Castroviejo et al. 1990).



FIGURA 3. Fernández, I. (2016). *Sarcocornia fruticosa*. Vista de ramillas con flores. Recuperado de <https://www.asturnatura.com>.

Florece a finales de primavera hasta otoño. El fruto es un aquenio con una semilla. Las semillas son de color pardo o pardo-grisáceo. Están cubiertas por protuberancias o “pelos” cortos y cónicos, no ganchudos.



FIGURA 4. Duarte, B. (2012). *Sarcocornia fruticosa* presenta una coloración roja durante el verano debido a las concentraciones excesivas de sal en los sedimentos.

Durante las épocas de lluvia los saladares suelen inundarse pudiendo existir condiciones de anoxia en los suelos. Por el contrario, durante las estaciones más cálidas y secas el agua de los suelos se evapora y las sales tienden a concentrarse en sus horizontes más superficiales, lo que incrementa las condiciones de estrés hídrico y osmótico para la vegetación. Ante estas situaciones de estrés provocadas por la salinidad, la anoxia o el estrés hídrico y térmico las plantas acumulan pigmentos solubles en agua de la familia de las betacianinas lo que les confiere un color rojizo (Figura 4) (Chang-Quan et al., 2006).

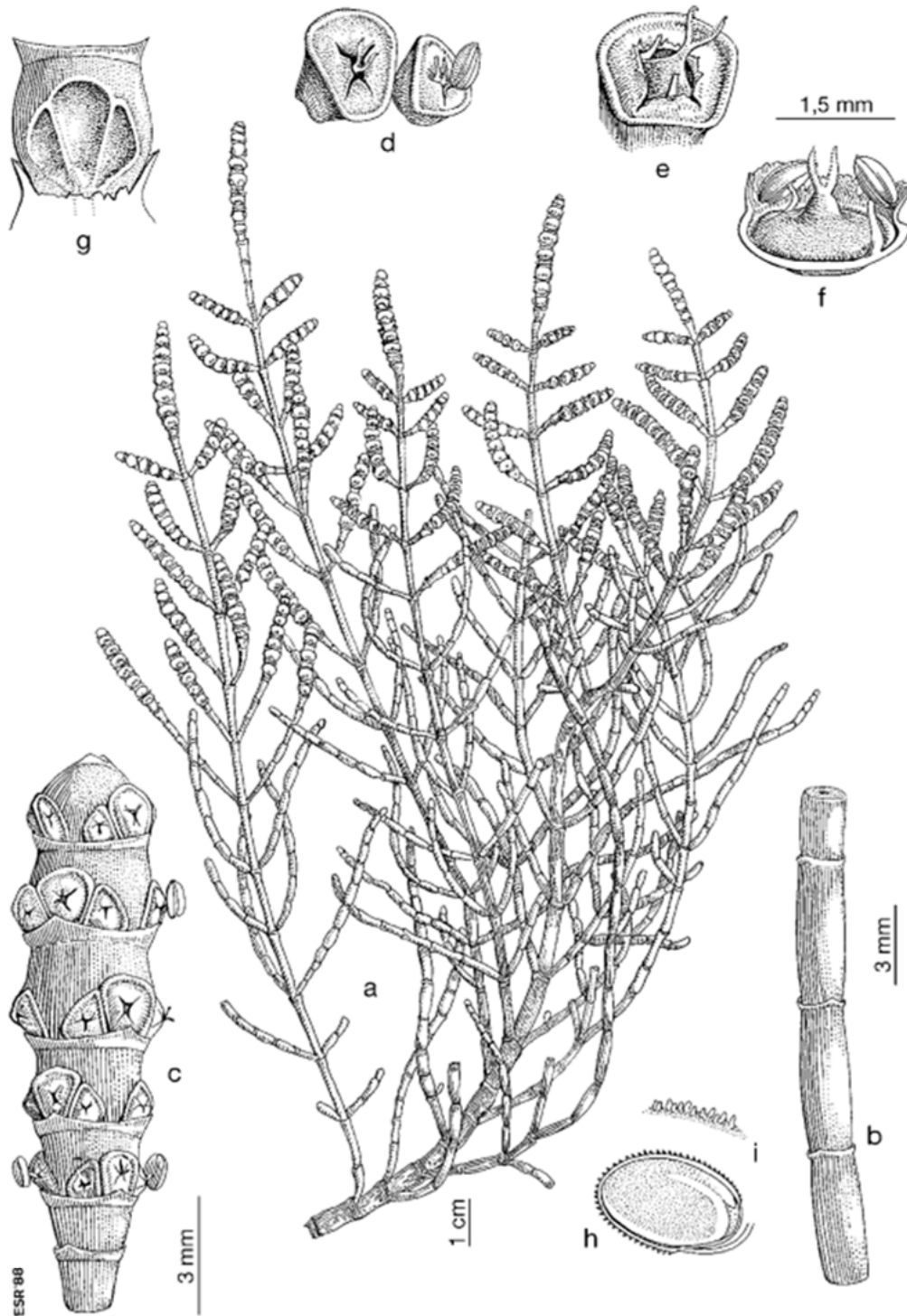


FIGURA 5. Lám. 158. *Sarcocornia fruticosa*, marismas de Almonte, Huelva (MA 221039): a) rama en flor y fruto; b) ramilla estéril; c) rama fértil o espiga florífera; d) flores en distintos estados de maduración; e) detalle de una flor en la antesis, mostrando los estigmas y filamentos; f) disección de una flor mostrando el androceo y gineceo; g) artejo fértil, en la fructificación, mostrando los tres huecos dejados por la cima triflora; h) sección de una semilla; i) detalle de las protuberancias de la testa.

1.3.2 *Arthrocnemum macrostachyum*

Taxonomía:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Caryophyllidae

Orden: Caryophyllales

Familia: Chenopodioideae

Género: *Arthrocnemum* Moq.

Especie: *Arthrocnemum macrostachyum* (Moric.) Moris in Moris & Delponte



FIGURA 6. Darmarin, A. (2016). *Arthrocnemum macrostachyum*. Recuperado de <http://www.lifile.com>.

Arthrocnemum macrostachyum (Moric.) C. Koch es una planta muy ramificada, aparentemente sin hojas. Es un arbusto perenne, monoico, glabro, y, por supuesto, halófito. Habitualmente mide entre 0,3-1 m de altura, aunque puede alcanzar en algunos casos los 1,5 m. Posee tallos fuertes y muy suculentos y ramas que pueden ser de erectas a ascendentes. Las

ramillas están formadas por artejos encadenados, carnosos, cilíndricos, verdes y de superficie lisa, en la que puede aparecer una tonalidad blanco-azulada como si estuviera cubierta por una capa de cera (López González, 2007). Las ramas, durante las estaciones secas, pueden cambiar a tonalidades rojizas por la acumulación de ftopigmentos como antocianina y betacianina (Wang et al., 2006) que protegen la integridad del aparato fotosintético en presencia de ambientes salinos (Flowers et al., 2014).

Cada articulación está formada por un par de hojas opuestas que se sueldan y recubren el entrenudo. Las flores (hermafroditas) crecen en espigas cilíndricas de 2-4 cm de largo y 5 mm de ancho que se asientan en grupos de tres en la base de los artejos. Las flores poseen dos estambres que atraviesan el perianto para salir al exterior. Tienen una envuelta ventrada que rodea el fruto, un aquenio comprimido que contiene una sola semilla (López González, 2007). La semilla mide aproximadamente 1-1,5 mm de largo, ovoide, negra, brillante y muy papilada.

Su floración normalmente ocurre en verano-otoño. En años secos donde se deseca pronto el saladar, la floración podría comenzar en mayo (López González, 2007).



FIGURA 7. Chetalain, *Arthrocnemum macrostachyum* (Morice) K. Koch. Vista de ramillas con flores. Recuperado de <http://www.ville-ge.ch>.

Crece en saladares de las regiones del Mediterráneo, Norte y Este de África y Este y Sur de Asia (Lieth et al., 1999). *A. macrostachyum*, muestra su mayor producción de biomasa con 400-600 mM NaCl, con poca mortalidad hasta 1000 mM NaCl (Khan et al., 2000).

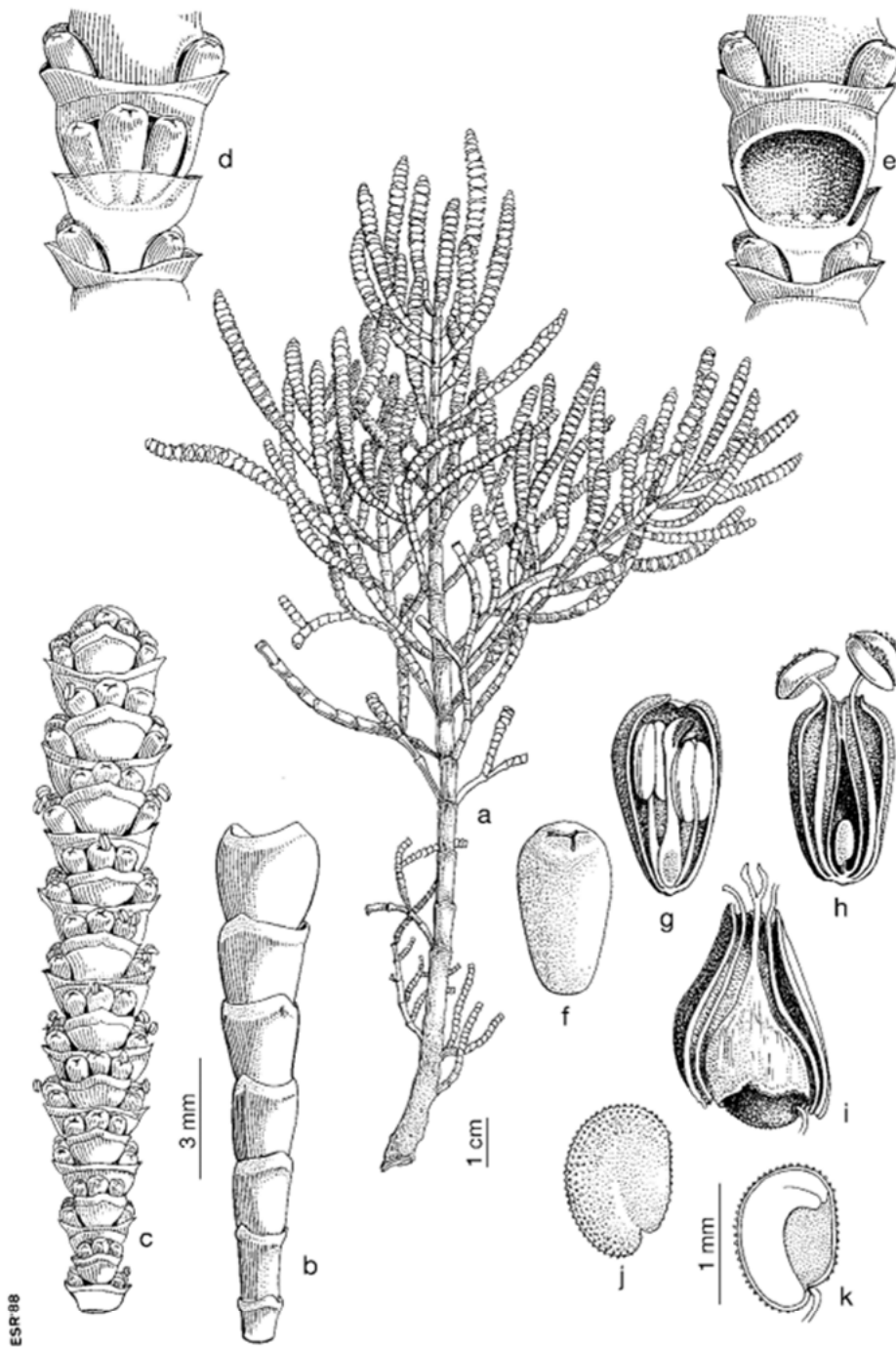


FIGURA 8. Lám. 157 - *Arthrocnemum macrostachyum*, Villamejor, Aranjuez, Madrid (MA 282600): a) rama florífera; b) ramilla estéril; c) ramilla fértil; d) segmento fértil mostrando la cima triflora; e) segmento maduro mostrando el hueco único dejado por el conjunto fructífero; f) flor inmadura; g) sección de botón floral; h) sección de flor en la antesis; i) sección de flor en la madurez; j) semilla; k) sección de semilla.

1.4 FITORREMEDIACIÓN

Anteriormente se hablaba de los problemas que han surgido por la contaminación de residuos procedentes de la minería en la Sierra de Cartagena-La Unión y zonas cercanas a ésta. Suelos en los que encontramos gran cantidad de metales pesados como Pb, Cd, As, Zn, etc. La contaminación por estos metales no solo provoca problemas ambientales, sino también problemas de salud para los habitantes de estas zonas.

La eliminación o reubicación de las balsas de residuos mineros abandonadas es una opción difícil y costosa, ya que implica transportar y gestionar elevados volúmenes de materiales altamente contaminados. En este sentido, pueden ser más útiles opciones de recuperación *in situ* con el fin de favorecer soluciones menos costosas y más aceptadas desde el punto de vista socio-medioambiental (EC, 2002). La estabilización superficial de las balsas mineras ha sido abordada tradicionalmente aplicando criterios de sellado y cubrición con capa vegetal. Este método efectivo, aunque de coste muy elevado, resulta impracticable cuando el área a tratar es grande o cuando la orografía del terreno resulta escarpada o de difícil acceso, como es el caso de la Sierra Minera de Cartagena-La Unión. Por estos motivos, en los últimos años han surgido nuevas tendencias que suponen favorecer el desarrollo de una cubierta vegetal *in situ* como medida para reducir la incidencia de la erosión y por lo tanto la dispersión de contaminantes. El empleo de la fitorremediación, en términos de fitoestabilización (Mendez y Meier, 2008), fitomanejo (Robinson et al., 2009) o restauración paisajística (Rieuwerts et al., 2009), se considera una alternativa adecuada para estabilizar los suelos con presencia de residuos mineros.

1.4.1 Fitorremediación de metales pesados

La fitorremediación consiste en el uso de técnicas basadas en la utilización de plantas para remover, reducir, transformar, mineralizar, degradar, volatilizar o estabilizar contaminantes presentes en el suelo, sedimentos o aguas superficiales (Kelley et al., 2000; Miretzky et al., 2004; Cherian y Oliveira, 2005; Eapen et al., 2007; Cho et al., 2008). Además, después de ser utilizadas en fitorremediación, estas plantas pueden ser empleadas en la producción de papel, madera y biocombustibles (Navarro de la Torre, 2017).

La mayoría de los metales pesados son persistentes en el suelo por su naturaleza inmóvil, como el plomo (Pb), que es relativamente inmóvil y no está disponible para la absorción de las plantas (Kabata-Pendias y Pendias, 1992; Chen et al., 2000). Sin embargo, algunas especies de plantas endémicas de suelos metalíferos han mostrado la capacidad de acumular altas concentraciones de metales pesados (Morrey et al., 1992).

Los suelos contaminados se cubrirían con plantas tolerantes a altas concentraciones de metales, lo que reduciría la erosión y filtración de contaminantes al agua subterránea. La movilidad de los contaminantes puede reducirse mediante la adsorción/acumulación en la superficie de las raíces, así como su precipitación en la rizosfera por los cambios de pH o por la oxidación del entorno de la raíz (Prasad, 2004; Domínguez et al., 2009; Antosiewicz, 2008). La fitoestabilización también puede ser promovida por plantas con capacidad de exudar grandes cantidades de sustancias quelantes (sustancias que forman complejos fuertes con iones de metales pesados).

La selección de plantas para la fitoestabilización de los residuos mineros debe ser específica del sitio, ya que también deben adaptarse al clima local. Es útil seleccionar plantas que hayan colonizado espontáneamente sitios con residuos mineros y que estén adaptadas a estos ambientes contaminados (Conesa et al., 2007).

Zonas contaminadas por altas concentraciones de metales pesados, como la bahía de Portman o los saladares situados en el Mar Menor (mencionados en el capítulo 2), han sido espontáneamente colonizadas por especies de plantas que muestran adaptación a la contaminación de metales y suelos salinos. Estas comunidades vegetales están formadas por especies halófitas, como las que han sido seleccionadas en este estudio, *Sarcocornia fruticosa* y *Arthrocnemum macrostachyum* (Conesa y Faz, 2009). En la tabla 1 se pueden observar las diferentes zonas contaminadas en las que se encuentran *Sarcocornia fruticosa* y *Arthrocnemum macrostachyum*, y su captación de metales pesados.

TABLA 1. Tabla adaptada de Conesa y Schulin, 2010. Las dos especies halófitas elegidas en este estudio y su captación de metales pesados en las diferentes ubicaciones (celdas en blanco son datos no disponibles).

Ubicación	Especie de planta	Concentración de metales (mg kg ⁻¹)		
		Cu	Pb	Zn
Saladares contaminados del Mar Menor	<i>Arthrocnemum macrostachyum</i>	—	100-320	160-390
	<i>Sarcocornia fruticosa</i>	—	165	110
Sedimentos de la bahía de Portman	<i>Sarcocornia fruticosa</i>	10	12	80
Alrededores de la bahía de Portman	<i>Arthrocnemum macrostachyum</i>	—	960	—
Cauce de la rambla del Beal	<i>Arthrocnemum macrostachyum</i>	—	60	—

Según Méndez y Maier (2008) también hay que tener en cuenta una evaluación de enmiendas adecuadas para facilitar el establecimiento de las plantas para fitorremediación.

Algunas enmiendas ya se han probado en condiciones de laboratorio para mejorar la revegetación en los relaves ácidos y neutros. Se encontró que en *Lygeum spartum* el encalado era necesario para aumentar su crecimiento en relaves ácidos (Conesa y Schulin, 2010). El encalado en combinación con estiércol de cerdo aumentó notablemente el establecimiento espontáneo de la vegetación, dando lugar a una cobertura vegetal de 25-40% en un año (Faz et al., 2008).

1.4.2 Biochar como enmienda

El biochar es un sustrato estable creado a partir de biomasa abandonada (madera, desechos agrícolas, tejidos vegetales y desechos animales) calcinada en ausencia de oxígeno a través de pirólisis lenta a altas temperaturas (generalmente <700 °C) (Atkinson et al., 2010; Karhu et al., 2011). El biochar mejora las propiedades químicas del suelo: puede aumentar el pH, la retención de nutrientes, la capacidad de intercambio catiónico y la biomasa de los cultivos (Schnell et al., 2012; Xu et al., 2012), además de un mayor secuestro de carbono en el suelo (Lehmann, 2007a). También mejora las propiedades físicas del suelo: la densidad aparente, la distribución del tamaño de partícula, la porosidad, la estructura y la textura (Ding et al., 2016; Manya, 2012; Xu et al., 2012).

Las propiedades del biochar hacen que sea un candidato ideal para la remediación de contaminantes orgánicos e inorgánicos en aguas y suelos, debido a su gran área superficial, microporosidad y las cargas positivas y negativas de los grupos funcionales de superficie (Ahmad et al., 2014).

La alcalinidad del biochar produce un aumento del pH del suelo, estabilizando los metales (excepto el arsénico) (Ahmad et al., 2014; Beesley et al., 2011). La alcalinidad también puede causar la precipitación de algunos metales fuera de la solución y sobre la superficie del biochar (Inyang et al., 2016), lo que reduciría la disponibilidad de estos metales para las plantas (Zhang et al., 2013).

Los diferentes tipos de biochar y la temperatura a la que han sido creados tienen diversas respuestas a los metales. Se ha observado que una temperatura alta de pirólisis y un biochar derivado de desechos animales tienden a ser los más eficaces (Higashikawa et al., 2016).

1.4.2.1 Mecanismos de sorción de metales

a) Intercambio iónico y adsorción de la función catiónica- π . Cuanto mayor es la capacidad de intercambio catiónico, mayor es la capacidad de adsorción de metales (Lehmann, 2006; Reesa et al., 2014). La función catiónica- π depende de la aromaticidad del biochar. Una estructura aromática conjugada provoca una mayor carga negativa por lo que el efecto de adsorción se vuelve más significativo (Li et al., 2017).

b) Coprecipitación. El biochar puede reducir eficazmente disponibilidad de los metales pesados por la adsorción y disolución-precipitación del constituyente mineral. La adición de biochar puede aumentar el pH del suelo (Reesa et al., 2014) y la reacción de los iones de metales pesados con $-\text{OH}$, PO_4^{3-} , CO_3^{2-} puede formar precipitación de hidróxido, carbonato o fosfato.

c) Complejación. Las reacciones de los iones de metales pesados con grupos funcionales oxigenados como el grupo hidroxilo ($-\text{OH}$), el grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) y el grupo amino ($-\text{NH}_2$) en la superficie del biochar contribuyen a la adsorción de metales pesados (Xu et al., 2012; Li et al., 2017).

d) Absorción electrostática. Un área de superficie más grande y la energía de superficie más alta son útiles para que el biochar absorba fuertemente los metales pesados y los eliminen del suelo (Li et al., 2017).

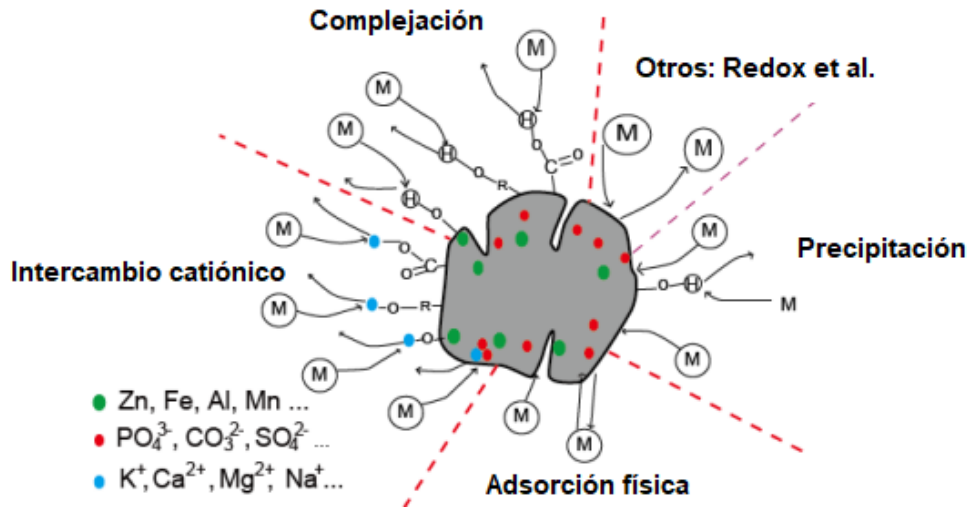


FIGURA 9. Esquema adaptado de Li et al., 2017. Mecanismos de retención de metales pesados por el biochar.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO E HIPÓTESIS DE PARTIDA

El objetivo del proyecto fue evaluar la eficiencia de biochar de lodos de depuradora y de podas de árboles urbanos como enmiendas para facilitar la colonización y desarrollo de plantas de *Sarcocornia fruticosa* y *Arthrocnemum macrostachyum* en residuos mineros ácidos y básicos sometidos a condiciones de hidromorfía variable. Dicha eficiencia se evaluó por medio de la respuesta germinativa y el vigor de plántulas de las dos especies citadas en contacto con agua de poro extraída de ambos tipos de residuos mineros con y sin adición de biochar, tras haber estado sometidos a fases de subidas y bajadas de nivel freático durante un periodo relativamente prolongado (303 días).

La hipótesis de partida fue que la respuesta de las semillas y plántulas de las dos especies puede variar en función del tipo de biochar y del tipo de residuo minero y que, por tanto, tanto el tipo de biochar como el parámetro elegido para evaluar la efectividad de los tratamientos deben ser seleccionados de manera específica para cada caso.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO, DISEÑO DEL EXPERIMENTO Y OBTENCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL AGUA DE PORO

El presente TFG se enmarca en el proyecto “Evaluación de la toxicidad de residuos mineros utilizando bioensayos con plantas e invertebrados edáficos: papel del biochar de RSU y de lodos de EDAR” financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad español (CGL2013-49009-C3-1-R), en el que participaron la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT), la Universidad de Almería (UAL) y el Centro tecnológico Leitat de Barcelona. El objetivo del mismo es valorar en qué medida los residuos mineros sometidos a diferentes condiciones biogeoquímicas son tóxicos para los organismos (invertebrados edáficos y plantas) y si el biochar elaborado a partir de podas de árboles urbanos (BRU) y lodos de depuradora (BED) es una enmienda efectiva para mejorar las condiciones de dichos residuos y reducir la movilidad y toxicidad de los metales/metaloideos que contienen, contribuyendo a la restauración del ecosistema y a la calidad ambiental. El proyecto comprendía dos experimentos en los que se enmendaron residuos mineros de pH ácido y pH básico con los dos tipos de biochar indicados. Uno de los experimentos se realizó en la UAL en ausencia de condiciones de hidromorfía y el otro en la UPCT simulando condiciones de hidromorfía. En el presente TFG se han utilizado muestras de agua de poro extraídas del experimento de la UPCT, tal como se explicará más adelante.

Para el proyecto se recogieron dos tipos de residuos mineros: ácido (A) y básico (B), procedentes de balsas mineras de la Sierra Minera de Cartagena-La Unión. Éstos se dejaron secar, se homogeneizaron y, con un tamiz de 2mm de granulometría, se tamizaron. Después se procedió al análisis y caracterización de los residuos (Tabla 2).

TABLA 2. Características del residuo ácido (A) y básico (B). Los valores son promedios \pm DE (n = 3). n.d. = no detectado; DA: densidad aparente; CE: conductividad eléctrica; CaCO₃: carbonato cálcico total; CO: carbono orgánico; CIC: capacidad de intercambio catiónico (Álvarez-Rogel et al., 2018).

	Residuo ácido (A)	Residuo básico (B)
DA (g cm ⁻³)	1,38 \pm 0,03	1,35 \pm 0,03
CE (dS m ⁻¹)	5,32 \pm 0,27	2,69 \pm 0,17
pH	4,69 \pm 0,13	7,43 \pm 0,15
CaCO ₃ (g kg ⁻¹)	n.d.	6,33 \pm 0,44
CO (g kg ⁻¹)	1,99 \pm 0,37	1,21 \pm 0,3
Arena (%)	72,1 \pm 2,4	88,0 \pm 1,4
Limo (%)	20,7 \pm 1,96	9,8 \pm 1,34
Arcilla (%)	7,17 \pm 0,59	2,17 \pm 0,15
CIC (cmol _c kg ⁻¹)	6,43 \pm 0,44	4,61 \pm 0,37
Ca ²⁺ (cmol _c kg ⁻¹)	2,74 \pm 0,14	3,46 \pm 0,24
Mg ²⁺ (cmol _c kg ⁻¹)	0,82 \pm 0,09	1,13 \pm 0,15
Na ⁺ (cmol _c kg ⁻¹)	0,06 \pm 0,02	0,12 \pm 0,02
K ⁺ (cmol _c kg ⁻¹)	0,03 \pm 0,01	0,1 \pm 0,02
N (g kg ⁻¹)	0,44 \pm 0,06	0,39 \pm 0,06
S (g kg ⁻¹)	43,7 \pm 2,7	34,1 \pm 3,7
P (g kg ⁻¹)	0,46 \pm 0,03	0,43 \pm 0,03
Al (g kg ⁻¹)	33,7 \pm 3,3	36,8 \pm 2,7
Fe (g kg ⁻¹)	159 \pm 12	183 \pm 8
Mn (g kg ⁻¹)	7,54 \pm 5,72	6,46 \pm 3,88
Si (g kg ⁻¹)	126 \pm 8	114 \pm 11
Ca (g kg ⁻¹)	34,4 \pm 2,6	64,5 \pm 2,5
Mg (g kg ⁻¹)	7,69 \pm 0,4	19,6 \pm 1,8
Na (g kg ⁻¹)	1,25 \pm 0,12	1,05 \pm 0,09
K (g kg ⁻¹)	4,11 \pm 0,23	4,93 \pm 0,25
Cu (mg kg ⁻¹)	203 \pm 19	88,5 \pm 6,9
Zn (mg kg ⁻¹)	13956 \pm 406	11784 \pm 404
Cd (mg kg ⁻¹)	16,7 \pm 0,4	30,9 \pm 2,2
As (mg kg ⁻¹)	975 \pm 56	611 \pm 27
Pb (mg kg ⁻¹)	16758 \pm 291	7354 \pm 210

El biochar BED procedía de los lodos de la estación de depuración de aguas residuales (EDAR) de Bobar, en Almería. Estos fueron estabilizados y desecados parcialmente. Se secaron a 100°C y se calentaron a 500°C durante una hora en un horno pirolítico en deficiencia de oxígeno. El biochar BRU procedía de los residuos de podas urbanas de los jardines de Cartagena. Los residuos se calentaron a 500 °C siguiendo el mismo proceso que en el biochar BED. La fabricación y caracterización de los dos tipos de biochar se realizaron en la Universidad de Almería (Simón et al., 2018). La tabla 3 muestra la caracterización de ambos tipos de biochar.

TABLA 3. Características del biochar de lodos de depuradora (BED) y de podas urbanas (BRU). Los valores son promedios \pm DE (n = 3). n.d.: no detectado; DA: densidad aparente; CE: conductividad eléctrica; CaCO₃: carbonato cálcico total; CO: carbono orgánico; COS: carbono orgánico soluble; AH: ácidos húmicos; AF: ácidos fúlvicos; CIC: capacidad de intercambio catiónico (Simón et al., 2018).

	BED	BRU
DA (g cm ⁻³)	0,63 \pm 0,04	0,32 \pm 0,02
CE (dS m ⁻¹)	0,18 \pm 0,03	0,52 \pm 0,04
pH	8,2 \pm 0,12	9,8 \pm 0,4
CaCO ₃ (g kg ⁻¹)	70,7 \pm 3,1	84,5 \pm 2,4
CO (g kg ⁻¹)	354 \pm 26	656 \pm 33
COS (g kg ⁻¹)	0,15 \pm 0,02	0,06 \pm 0,01
AH (g kg ⁻¹)	1,22 \pm 0,08	0,15 \pm 0,03
AF (g kg ⁻¹)	59,3 \pm 3,8	128 \pm 9
CIC (cmolc kg ⁻¹)	25,4 \pm 0,6	37,5 \pm 1,1
N (g kg ⁻¹)	4,56 \pm 0,33	0,68 \pm 0,07
S (g kg ⁻¹)	18,2 \pm 0,92	1,65 \pm 0,14
P (g kg ⁻¹)	58,6 \pm 4,7	5,8 \pm 0,42
Al (g kg ⁻¹)	25,2 \pm 2,3	2,06 \pm 0,2
Fe (g kg ⁻¹)	3,73 \pm 0,3	0,51 \pm 0,08
Mn (g kg ⁻¹)	0,53 \pm 0,19	1,81 \pm 0,7
Si (g kg ⁻¹)	54,7 \pm 5,3	7,38 \pm 0,63
Ca (g kg ⁻¹)	162 \pm 7	229 \pm 16
Mg (g kg ⁻¹)	11,9 \pm 0,4	5,62 \pm 0,38
Na (g kg ⁻¹)	3,65 \pm 0,35	n.d.
K (g kg ⁻¹)	9,22 \pm 0,32	31,9 \pm 1,6
Cu (mg kg ⁻¹)	435 \pm 14	39,5 \pm 3,0
Zn (mg kg ⁻¹)	1043 \pm 64	58,1 \pm 5,5
Cd (mg kg ⁻¹)	2,08 \pm 0,32	0,12 \pm 0,03
As (mg kg ⁻¹)	5,83 \pm 0,6	2,87 \pm 0,23
Pb (mg kg ⁻¹)	126 \pm 7	7,5 \pm 0,52

Los residuos mineros se mezclaron con el biochar en una dosis del 6% en peso. Una vez preparadas, se humedecieron y se dejaron reposar 20 días para favorecer su estabilización. Los tratamientos para los ensayos fueron los siguientes:

- Residuo minero ácido (A)
- Residuo minero básico (B)
- Residuo minero ácido con BED (A-BED)
- Residuo minero básico con BED (B-BED)
- Residuo minero ácido con BRU (A-BRU)
- Residuo minero básico con BRU (B-BRU)

Posteriormente se prepararon columnas experimentales fabricadas con tubos de PVC de 15 cm de ancho y 30 cm de alto (Figura 10). Estas columnas se rellenaron con los tratamientos y se insertaron electrodos de pH y potencial redox (Eh) así como sondas Rhizon® que permiten extraer el agua de poro. En la parte inferior se hicieron 4 orificios de 2 mm para la entrada de agua. Para cada tratamiento se prepararon cuatro columnas colocadas en el interior de cubos rellenos con agua corriente (pH≈7,5-8,0; CE≈0,45 dS m⁻¹; concentración de metales solubles < 2 µg L⁻¹ excepto para Zn que era ≈15 µg L⁻¹) para simular subidas y bajadas del nivel freático (Figura 10).

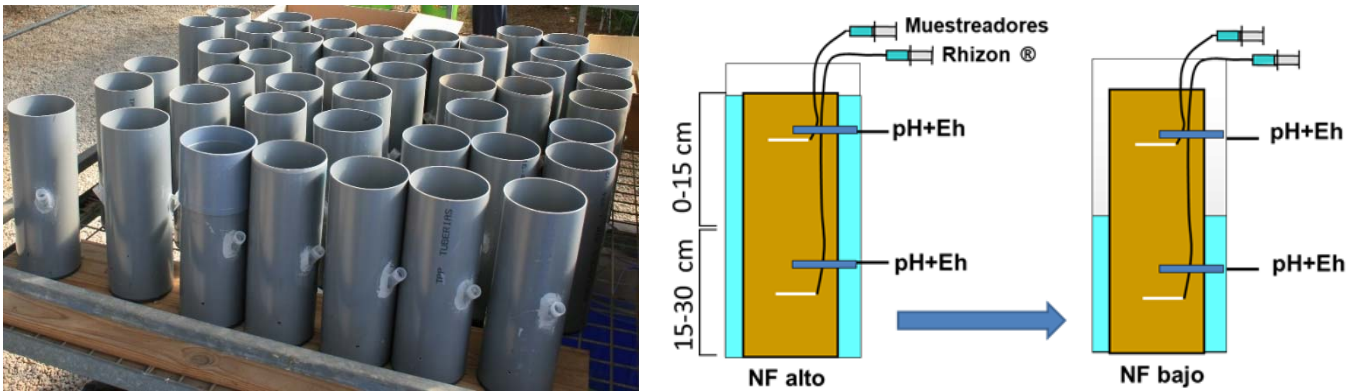


FIGURA 10. Derecha: Imagen de los tubos de PVC utilizados en el experimento. Izquierda: Esquema del diseño experimental.



FIGURA 11. Imagen de una columna experimental con los electrodos de pH y Eh y las sondas Rhizon® en el cubo con agua para simular el nivel freático.

El experimento se prolongó durante 303 días en los que se simularon cambios en el nivel freático (NF):

-1ª fase de NF alto (días 1-32): El NF se mantuvo \approx 5 cm por encima de la superficie del suelo, es decir la columna experimental bajo el agua.

-1ª fase de NF bajo (días 33-60): En el día 33 se eliminó la mitad del agua de los contenedores para alcanzar un NF \approx 15 cm por debajo de la superficie del suelo.

-Entre los días 61 y 105 se realizó un nuevo ciclo de NF alto (20 días) y NF bajo (25 días), pero no se recogieron datos y muestras de agua de poro.

-2ª fase de NF alto (días 106-135): En el día 106 el NF se elevó de nuevo.

-2ª fase de NF bajo (días 136-168): El día 136 el NF se redujo nuevamente.

-Entre los días 169 y 225 se realizó un nuevo ciclo de NF alto (25 días) y NF bajo (26 días) sin muestreo.

-3ª fase de NF alto (días 226-253): En el día 226 el NF se elevó por tercera vez.

-3ª fase de NF bajo (días 254-303): En el día 254 el NF se redujo por tercera vez y se mantuvo hasta el final del experimento.

Durante los 303 días se midió regularmente el pH y Eh en las cuatro columnas de cada tratamiento. Además, se extrajeron muestras de agua de poro los días 3, 22, 32, 39, 59, 106, 120, 135, 144, 157, 226, 240, 250, 254, 273 y 303 con las sondas Rhizon® de tres de las columnas por tratamiento, separando dos alícuotas: una para analizar CE y WSOC (TOC-VCSH Shimadzu Analyser) y la otra para medir concentraciones solubles de Zn, Cd y Pb (ICP-MS, Agilent 7500A; muestras acidificadas con una gota de HNO₃ concentrado). El WSOC solo se midió en las muestras recolectadas entre 0 y 15 cm.

Para los ensayos de germinación y vigor en plántulas de *Arthrocnemum macrostachyum* y *Sarcoconia fruticosa* del presente trabajo fin de grado se han utilizado las muestras de agua de poro obtenidas el día 303 del ensayo descrito.

Álvarez-Rogel et al., (2018) demostraron que ambos tipos de biochar fueron útiles para disminuir las concentraciones de metales solubles en el agua de poro en el residuo minero ácido tras los 303 días del experimento, pero no pudieron demostrar su efectividad en el residuo minero básico. Estos autores indicaron que el uso de biochar como enmienda en humedales afectados por elevadas concentraciones de metales pesados debe ser planificado para cada caso en particular a fin de optimizar su eficiencia y potenciar el papel del biochar como enmienda que mejore las condiciones de estos ambientes contaminados.

3.2 ENSAYOS DE GERMINACIÓN

3.2.1 MATERIALES

3.2.1.1 Material de laboratorio

Para llevar a cabo los ensayos se ha necesitado el siguiente material de laboratorio:

- Agitador magnético
- Agua destilada
- Bandejas de plástico
- Cámara de cultivo con control de fotoperiodo y temperatura
- Imanes para agitador
- Lejía
- Lupa con luz
- Papel de filtro
- Papel milimetrado
- Parafilm
- Pinzas con punta fina
- Pipetas de Pasteur
- Placas de Petri de plástico
- Tamices de diferentes granulometrías
- Tijeras
- Varilla para extraer imanes

3.2.1.2 Material vegetal

Se han utilizado semillas de dos plantas halófitas: *Sarcocornia fruticosa* y *Arthrocnemum macrostachyum*. Las ramillas con semillas de ambas plantas fueron recolectadas en los saladares cercanos al Mar Menor: Saladar de Lo Poyo y La Marina del Carmolí.

La recolección de semillas de *Sarcocornia fruticosa* se realizó en noviembre de 2016 y las de *Arthrocnemum macrostachyum* en febrero de 2018.

3.2.1.3 Aguas de poro utilizadas en los ensayos de germinación y vigor

Como ya se ha indicado, se utilizaron aguas de poro extraídas en el proyecto “Evaluación de la toxicidad de residuos mineros utilizando bioensayos con plantas e invertebrados edáficos: papel del biochar de RSU y de lodos de EDAR” tras los 303 días del experimento en columnas.

Para cada uno de los tratamientos anteriormente indicados se utilizaron las aguas de poro correspondientes a tres de las columnas experimentales. De esta forma, por cada tratamiento teníamos 3 réplicas de aguas de poro. La Tabla 4 recoge la conductividad eléctrica y las concentraciones de metales e iones mayoritarios de dichas aguas de poro.

TABLA 4. Características del agua de poro de los diferentes tratamientos, utilizadas en los ensayos de germinación y vigor. A: Residuo minero ácido; B: Residuo minero básico; A-BED: Residuo minero ácido con biochar de lodos de depuradora; B-BED: Residuo minero básico con biochar de lodos de depuradora; A-BRU: Residuo minero ácido con biochar de podas urbanas; B-BED: residuo minero básico con biochar de podas urbanas. CE: conductividad eléctrica

	A	A-BED	A-BRU	B	B-BED	B-BRU
CE (dS m ⁻¹)	4,51 ± 1,13	5,04 ± 0,2	3,83 ± 0,57	4,02 ± 0,12	3,56 ± 0,63	3,67 ± 0,3
pH	4,75 ± 0,25	5,69 ± 0,29	6,59 ± 0,39	7,57 ± 0,68	8,17 ± 0,12	8,24 ± 0,51
Mn (µg L ⁻¹)	78,5 ± 65,5	92,5 ± 12,4	6,3 ± 0,86	55,5 ± 5,32	9692 ± 2998	358 ± 424
Zn (µg L ⁻¹)	293 ± 205	15,3 ± 1,45	12,0 ± 1,39	306 ± 24,1	193 ± 48,1	402 ± 254
Fe (µg L ⁻¹)	68,4 ± 30,0	11856 ± 2949	68,8 ± 43,8	77,2 ± 39,5	97,1 ± 33,9	205 ± 54
Cd (µg L ⁻¹)	2044 ± 1421	43,8 ± 9,79	188 ± 15,2	4,28 ± 0,88	3,9 ± 1,66	4,52 ± 1,46
Pb (µg L ⁻¹)	2459 ± 401	647 ± 76	637 ± 93,0	35,7 ± 11,7	39,1 ± 5,45	40,2 ± 5,07
Na ⁺ (mEq L ⁻¹)	9,32±0,18	15,4±2,51	9,13±0,24	10,2±1,89	13,2±0,13	8,60±0,35
K ⁺ (mEq L ⁻¹)	0,75±0,1	1,28±0,21	3,91±0,22	0,57±0,14	0,97±0,06	3,12±0,12
Ca ²⁺ (mEq L ⁻¹)	28,8±1,17	31,2±2,79	29,2±0,14	31,4±4,04	34,7±0,48	31,7±1,04
Mg ²⁺ (mEq L ⁻¹)	20,1±3,08	26,0±2,54	19,3±3,53	11,1±0,74	14,0±0,29	12,8±0,39
Cl ⁻ (mEq L ⁻¹)	4,39±0,47	6,42±5,90	4,03±0,28	6,29±1,96	4,25±0,30	3,70±0,18
SO ₄ ²⁻ (mEq L ⁻¹)	73,8±7,91	62,8±4,30	51,6±4,36	35,3±4,50	41,4±0,31	42,9±0,72

3.2.2 METODOLOGÍA DE LOS ENSAYOS DE GERMINACIÓN

Para el ensayo de germinación se utilizaron semillas de *Arthrocnemum macrostachyum* y *Sarcoconia fruticosa*. Se recogieron directamente las ramillas que contienen las semillas y éstas fueron sacadas en laboratorio.

Para obtener las semillas se utilizaron tamices de diferente granulometría. Con ayuda de las manos se friccionaron las ramillas con el tamiz de mayor granulometría, permitiendo que las semillas encapsuladas (aquenios) pasaran al tamiz de menor granulometría. Después se friccionaron los aquenios cuidadosamente contra este otro tamiz para obtener directamente las semillas. Una vez obtenidas una buena cantidad de semillas de cada especie se procedió a la desinfección de éstas y posterior colocación en placas de Petri.



FIGURA 12. Tamices con varias granulometrías.

Para la desinfección de las semillas se utilizó hipoclorito sódico al 5%, sumergiendo las semillas en la solución durante unos 5 minutos.

Para cada una de las dos especies halófitas estudiadas utilizamos un total de 18 disoluciones de agua de poro procedentes de los residuos mineros básicos y ácidos enmendados y sin enmendar (6 tratamientos diferentes con 3 repeticiones por tratamiento, Tabla 4). Para ensayar la ecotoxicidad de cada disolución, disponíamos de 4 subréplicas (4 placas de Petri) con 25 semillas en cada una de ellas. Como tratamiento control, se utilizaron tres réplicas de agua destilada con 4 subréplicas (placas de Petri) por réplica. Así, se necesitaron un total de 84 placas de Petri para cada especie y 2.100 semillas de cada una de ellas.

Se prepararon las placas con una lámina circular de papel de filtro. Con ayuda de la lupa y unas pinzas se cogieron las semillas que estaban en perfecto estado y se pasaron a las placas de Petri (25 semillas en cada una). Seguidamente se regaron las placas con 5 ml de las correspondientes disoluciones de agua de poro o de agua destilada en el caso del tratamiento control. Las 18 disoluciones de agua de poro que se encontraban congeladas se sacaron para su descongelación un día antes de regar las placas.



FIGURA 13. Semillas de *Sarcoconia fruticosa* sobre papel de filtro en placa de Petri.

Cada uno de los botes que contenían la disolución de agua de poro se colocó sobre un agitador magnético y se introdujo un imán para conseguir la total homogeneización de la disolución tras su descongelación. Con una pipeta Pasteur se cogieron unos 5 ml de disolución y se humedeció bien el papel de filtro de la placa de Petri. Con la misma disolución de agua de poro se repitió el proceso para cada una de las cuatro subréplicas.

Debido a que las soluciones de agua de poro utilizadas, además de contener elevado contenido en metales solubles tenían alta salinidad (Tabla 4), el daño que podían provocar en las semillas y plántulas podía deberse a ambos factores. Esto llevó a que se preparasen soluciones de igual composición iónica que las aguas de poro pero sin metales (controles de salinidad) y se realizasen ensayos de germinación y vigor con ellas. De esta forma se podía tener una aproximación al efecto dañino que podían tener, por separado, los iones mayoritarios y los metales. Por supuesto, se asume que el efecto de la combinación de metales solubles con iones mayoritarios no es aditivo y que, por tanto, hacer ensayos por separado con los iones mayoritarios para evaluar el efecto de éstos es sólo una aproximación. No obstante, se consideró una aproximación aceptable. Estos ensayos se incluyeron en un proyecto anterior (Cañavate, 2017) en el que se evaluaron los efectos del agua de poro de los mismos tratamientos sobre la germinación y vigor de las mismas especies, pero en aquel caso se usó el agua extraída tras una semana de empezar el experimento de hidromorfía, mientras en este caso se ha usado el agua extraída tras 303 días de experimento. Debido a que la salinidad e iones mayoritarios en el agua de poro apenas variaron tras los 303 días de experimento en columnas (Álvarez-Rogel et al., 2018), no se repitieron los controles de salinidad para el presente proyecto, considerándose válidos los realizados inicialmente. En aquellos ensayos iniciales se atribuyó el daño provocado a la germinación de semillas y desarrollo radicular a los metales solubles y no a los iones mayoritarios (Cañavate, 2017), resultado que era esperable debido a que *Sarcocornia fruticosa* y *Arthrocnemum macrostachyum* son dos especies halófitas capaces de tolerar elevadas concentraciones de sales solubles.

Las placas fueron etiquetadas y selladas con parafilm para evitar la evaporación de los tratamientos. Éstas se almacenaron en una bandeja de plástico y se introdujeron en la cámara de cultivo con una temperatura de 20°C con luz y 12°C en oscuridad y con un fotoperiodo 12 h luz/12 h oscuridad.

Una vez se introdujeron todas las placas en la cámara de cultivo, cada dos días se procedió al conteo de las semillas germinadas. Como criterio de germinación se utilizó el crecimiento de la radícula en más de 1mm. El ensayo de germinación tuvo una duración de 30 días.

Por otra parte, para el ensayo de vigor que se explica con más detalle en el siguiente apartado, en los primeros días que se hizo el conteo de semillas germinadas, para cada agua de poro, las semillas que germinaron en cada una de las 4 placas de Petri se pasaron a una nueva placa de Petri regada con el mismo agua de poro. Esta nueva placa también se introdujo en la cámara de cultivo en las mismas condiciones de luz y temperatura donde permanecieron durante un periodo de 15 días. Esta operación se realizó cada día de conteo hasta completar un total de 30 semillas recién germinadas por cada agua de poro (un total de 18 aguas de poro diferentes), que fueron utilizadas para el estudio del vigor. Lo mismo se hizo para las semillas de cada una de las tres réplicas del tratamiento control, aunque en este caso las semillas recién germinadas se regaron con agua destilada.

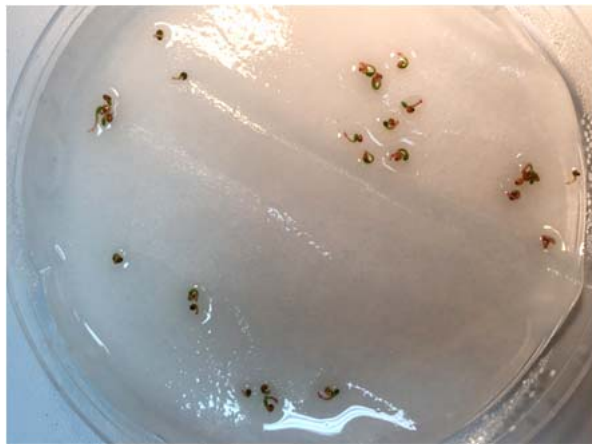


FIGURA 14. Semillas germinadas de *Sarcoconia fruticosa*.

Una vez terminados los ensayos de germinación se calculó el porcentaje de germinación obtenido en cada uno de los tratamientos ensayados y el tiempo medio de germinación (TMG) que nos indica la velocidad de germinación de las semillas y se calcula mediante la fórmula:

$$TMG = \frac{\sum n_i \cdot d_i}{N}$$

-TMG: Tiempo medio de germinación (días)

- n_i : Número de semillas germinadas en el día

- d_i : Número de días desde el inicio del ensayo

-N: Número total de semillas germinadas al final del ensayo

3.3 ENSAYOS DE VIGOR

3.3.1 METODOLOGÍA DE LOS ENSAYOS DE VIGOR

Tras 15 días en la cámara de cultivo desde su germinación, se procedió a la medición de las 30 plántulas crecidas en cada una de las 18 aguas de poro diferentes más las 3 réplicas del tratamiento control. Con ayuda de un papel milimetrado y una lupa se midió la longitud de los cotiledones, el hipocótilo y la raíz.



FIGURA 15. Plántulas de *Sarcoconia fruticosa* tras 15 días en cámara de cultivo.

Para ello, con unas pinzas de punta fina se cogía la plántula y se colocaba de forma que quedase estirada sobre el papel milimetrado. A través de la lupa se midieron los milímetros alcanzados por cada parte de la plántula.



FIGURA 16. Plántula de *Arthrocnemum macrostachyum* sobre papel milimetrado vista desde la lupa.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para cada una de las dos especies, se han hecho por separado los análisis estadísticos del residuo minero básico y ácido, ya que este estudio no trata de comparar la germinación de las semillas en ambos tipos de residuos, sino la efectividad de la adición de biochar para reducir la ecotoxicidad en cada residuo minero.

Los efectos de las soluciones de agua de poro sobre la germinación, el tiempo medio de germinación y el vigor de las plántulas se estudiaron mediante un análisis ANOVA unifactorial (tipo de tratamiento). Cuando existieron diferencias significativas, se utilizó la prueba de Tukey HSD. Se consideraron significativas las diferencias a $p \leq 0,05$. Los porcentajes de germinación se transformaron en la raíz cuadrada del arcoseno antes del estudio estadístico para asegurar la homogeneidad de varianzas.

Todos los gráficos se realizaron con el programa SigmaPlot 12.0.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DE *SARCOCORNIA FRUTICOSA*

4.1.1 Resultados de germinación de *S. fruticosa* en agua de poro de residuos mineros ácidos

El valor de los porcentajes de germinación que se muestran en la siguiente figura es la media de los porcentajes obtenidos en cada una de las tres réplicas que se han estudiado por tratamiento. Como se puede observar, en todos los tratamientos ensayados la germinación de las semillas de esta especie fue prácticamente del 100%. No hubo diferencias significativas entre los porcentajes de germinación obtenidos en cada uno de los tratamientos estudiados (Tabla 5).

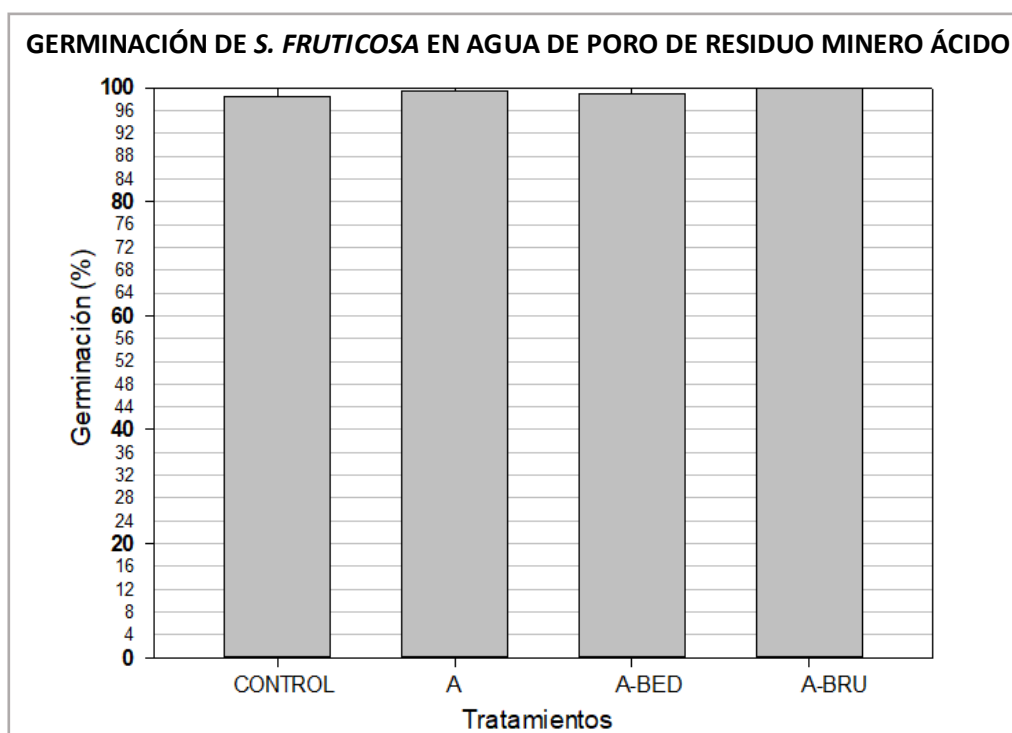


FIGURA 17. Germinación de *Sarcocornia fruticosa* expresada en porcentaje en cada uno de los tratamientos que contienen residuos mineros ácidos (A, A-BED y A-BRU) más el tratamiento control. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 5. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de los porcentajes de germinación de *Sarcocornia fruticosa* en residuos mineros ácidos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	0,299919	3	0,0999729	2,35	0,0856
Dentro de los grupos	1,87368	44	0,0425836		
Total (Corr.)	2,1736	47			

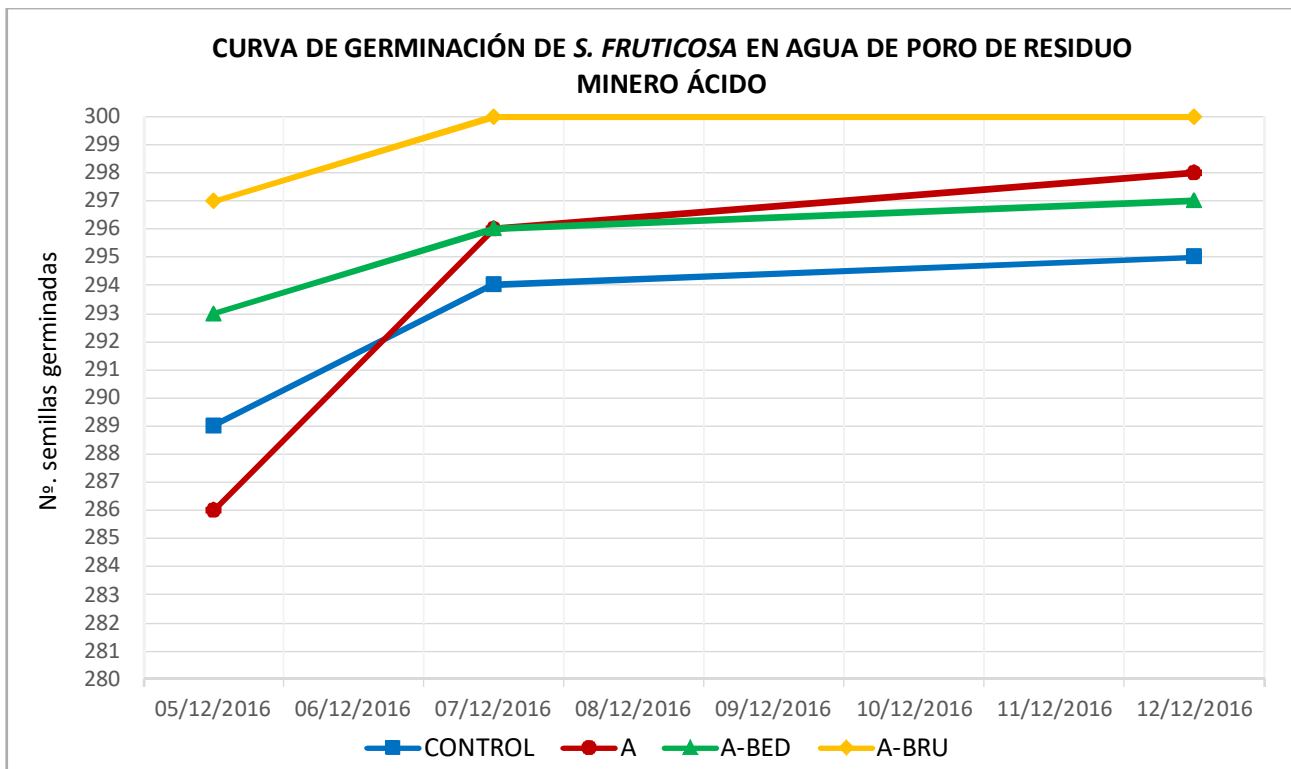


FIGURA 18. Curva de germinación de *Sarcocornia fruticosa* en agua de poro de residuo minero ácido.

Esta curva de germinación está realizada con los datos de germinación de las 300 semillas utilizadas para cada tratamiento. Como se ha explicado en el capítulo de Material y métodos, se tomaron datos de germinación 3 veces a la semana durante 4 semanas. Como se puede apreciar en la figura 18, en el primer día de toma de datos, el 5 de diciembre, tres días después de comenzar el ensayo la mayoría de las semillas habían germinado en todos los tratamientos, con una media de 292 semillas germinadas/tratamiento, lo que significa un 97,33% del total de semillas. Al final del ensayo, para el tratamiento A-BRU germinaron todas las semillas, es decir, 300, mientras que para los tratamientos A y A-BED germinaron 298 y 297 respectivamente. Esto muestra una diferencia mínima y poco relevante entre los distintos tratamientos.

En cuanto a la velocidad de germinación, en todos los tratamientos ensayados las semillas tuvieron un tiempo medio de germinación de unos 3 días, sin diferencias significativas entre tratamientos (Figura 19; Tabla 6).

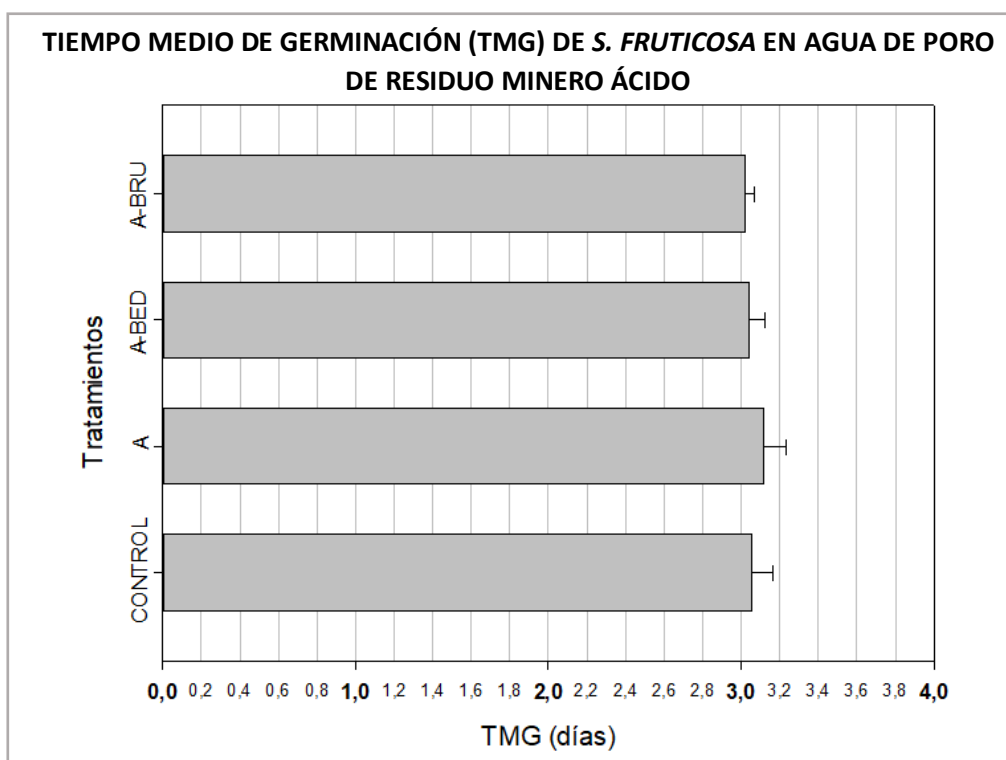


FIGURA 19. Tiempo medio de germinación (TMG) de *Sarcocornia fruticosa* en cada uno de los tratamientos que contienen residuos mineros ácidos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 6. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de los porcentajes de germinación en *Sarcocornia fruticosa* con residuos mineros ácidos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	0,057034	3	0,0190113	2,19	0,1023
Dentro de los grupos	0,381388	44	0,00866791		
Total (Corr.)	0,438422	47			

P-valor es mayor a 0,05, por lo que estadísticamente no hay una diferencia significativa entre los tiempos medios de germinación obtenidos en cada uno de los tratamientos estudiados.

4.1.2 Resultados de germinación de *S. fruticosa* en agua de poro de residuos mineros básicos

La germinación de *S. fruticosa* en todos los tratamientos procedentes de residuos mineros básicos también alcanzó prácticamente el 100% de las semillas, sin mostrar tampoco diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Figura 20; Tabla 7).

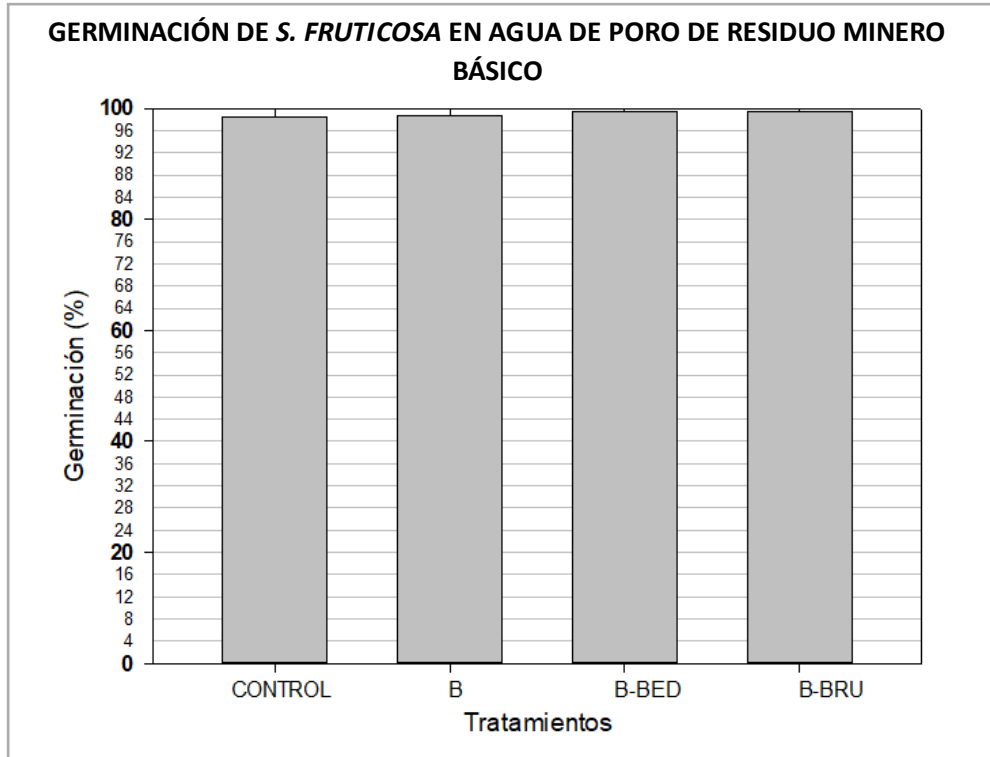


FIGURA 20. Germinación de *Sarcocornia fruticosa* expresada en porcentaje en cada uno de los tratamientos que contienen residuos mineros básicos (B, B-BED Y B-BRU) más el tratamiento control. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 7. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial del tiempo medio de germinación en *Sarcocornia fruticosa* con residuos mineros básicos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	0,159634	3	0,0532114	0,93	0,4365
Dentro de los grupos	2,5305	44	0,0575113		
Total (Corr.)	2,69013	47			

No hubo diferencias significativas entre los porcentajes de semillas germinadas de los diferentes tratamientos (Tabla 7).

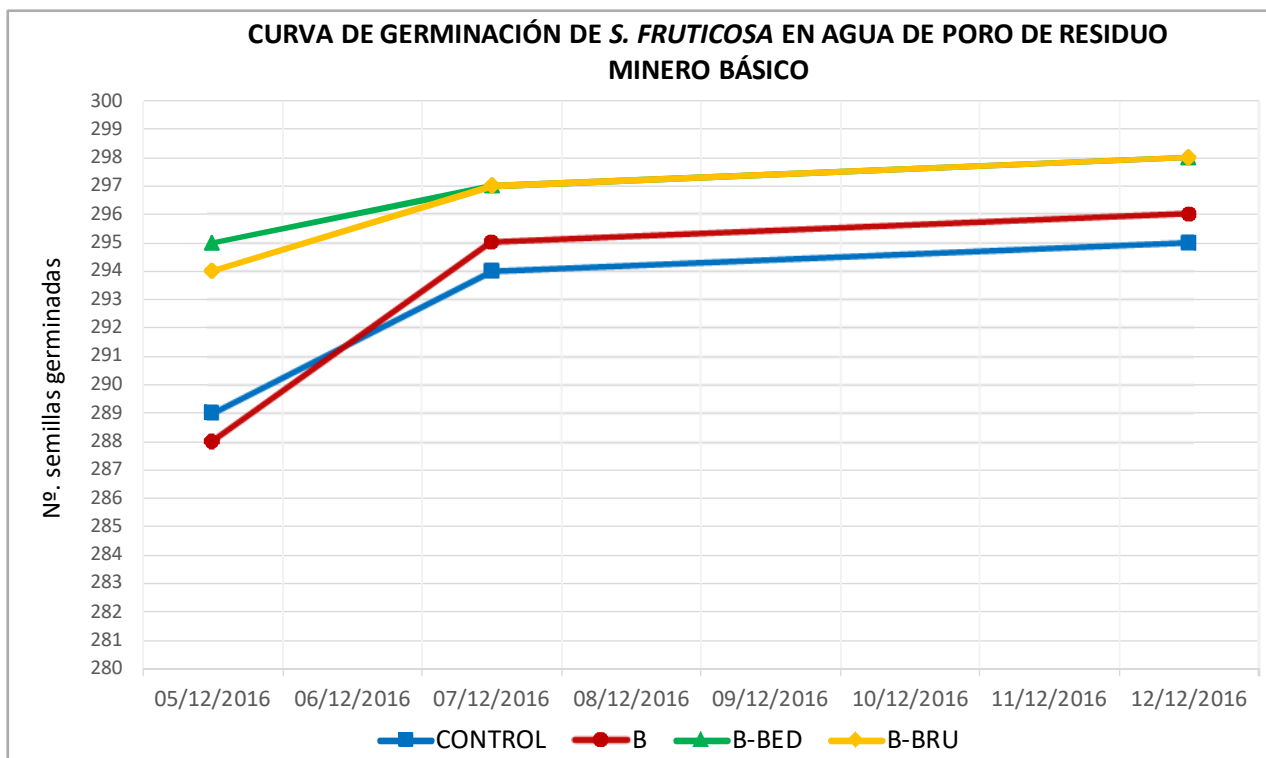


FIGURA 21. Curva de germinación de *Sarcocornia fruticosa* en agua de poro de residuo minero básico.

La mayor parte de las semillas habían germinado el primer día de toma de datos, 5 de diciembre (tras 3 días en la cámara de cultivo), con una media del 97,44% de las 300 semillas/tratamiento. Finalmente, los tratamientos con adición de biochar (B-BED y B-BRU) obtuvieron el mayor número de semillas germinadas, 298; y el tratamiento B, 296, aunque sin diferencias significativas.

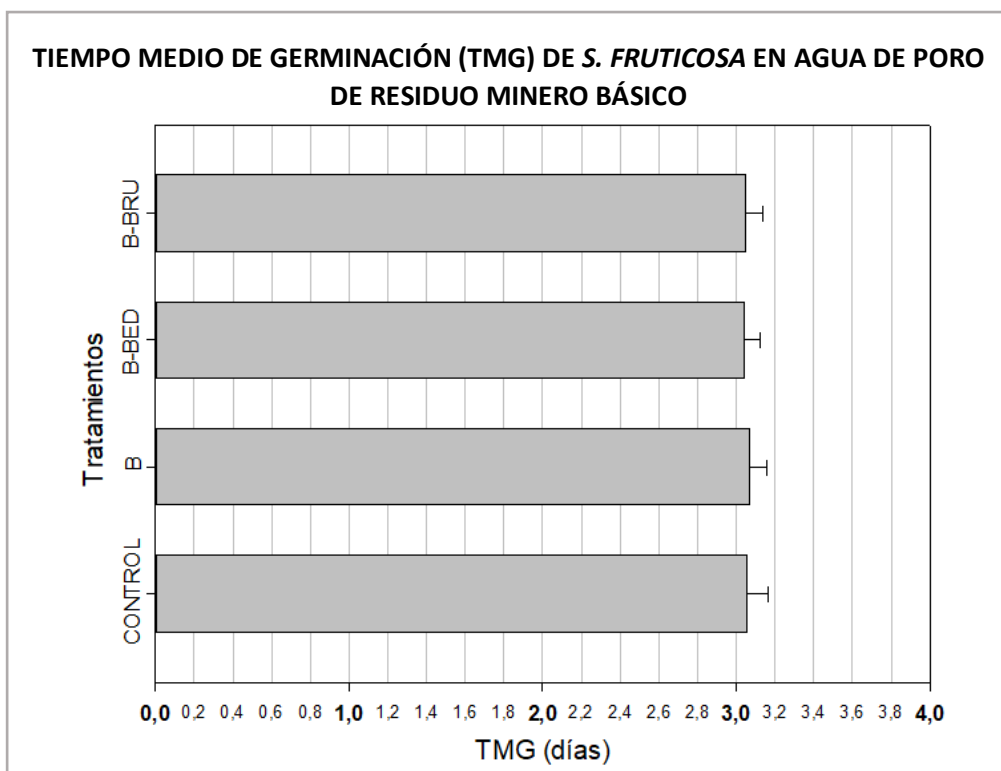


FIGURA 22. Tiempo medio de germinación (TMG) de *Sarcocornia fruticosa* en cada uno de los tratamientos que contienen residuos mineros básicos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 8. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial del tiempo medio de germinación en *Sarcocornia fruticosa* con residuos mineros básicos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	0,00794647	3	0,00264882	0,31	0,8186
Dentro de los grupos	0,37686	44	0,008565		
Total (Corr.)	0,384806	47			

Estadísticamente no hay una diferencia significativa entre los TMG obtenidos con los diferentes tratamientos (Tabla 8).

4.1.3 Resultados de vigor de *S. fruticosa* en agua de poro de residuos mineros ácidos

Para cada tratamiento disponíamos de 90 plántulas. Para obtener los resultados de vigor se procedió a la medición de cada parte de las plántulas: raíz, hipocótilo y cotiledones.



FIGURA 23. Plántulas de *Sarcocornia fruticosa* del tratamiento control.



FIGURA 24. Plántulas de *Sarcocornia fruticosa* del tratamiento A.



FIGURA 25. Plántulas de *Sarcocornia fruticosa* del tratamiento A-BED.



FIGURA 26. Plántulas de *Sarcocornia fruticosa* del tratamiento A-BRU.

RAÍZ

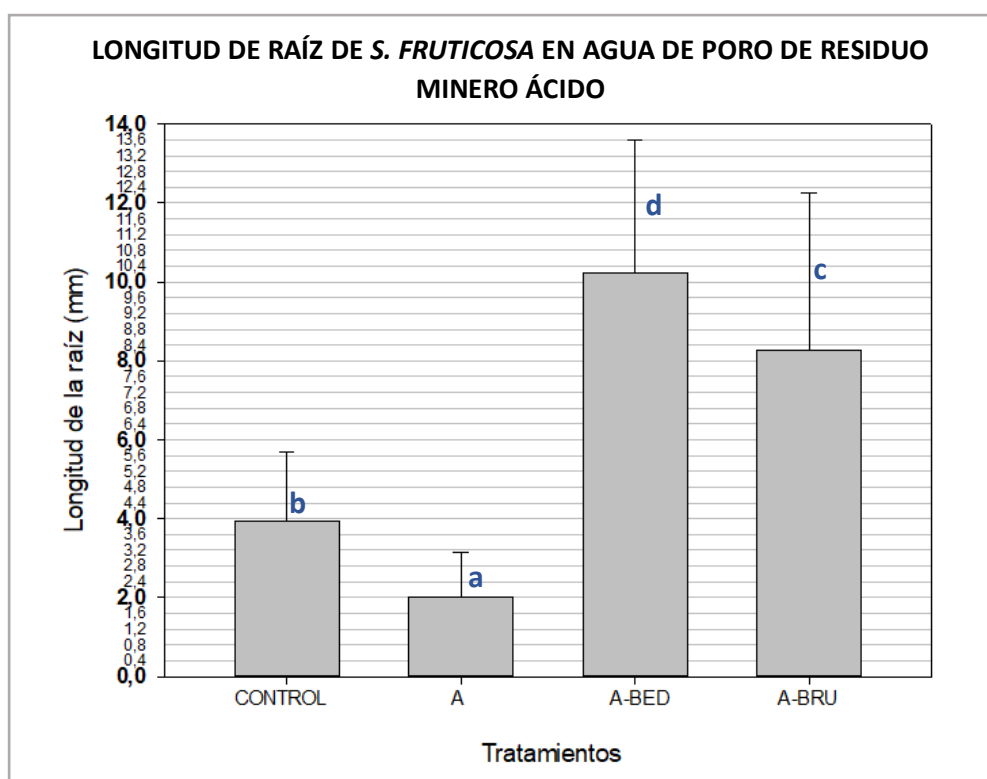


FIGURA 27. Longitud de la raíz de *Sarcocornia fruticosa* tras 15 días en agua de poro con residuos mineros ácidos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 9. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud de la raíz de *Sarcocornia fruticosa* con residuos mineros ácidos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	3899,71	3	1299,9	164,78	0,0000
Dentro de los grupos	2808,3	356	7,88848		
Total (Corr.)	6708,0	359			

Estadísticamente hay una diferencia significativa entre las longitudes de raíz que producen cada uno de los tratamientos (Tabla 9).

Destaca el tratamiento A, sin adición de biochar, por una longitud de raíz muy reducida. Pasa lo contrario con las raíces de las plántulas regadas con aguas de poro procedentes de residuos que fueron enmendados con biochar, A-BED y A-BRU, las cuales presentan una longitud bastante más grande, incluso mucho mayor que la longitud de la radícula alcanzada en el tratamiento control, destacando entre las dos enmiendas el tratamiento A-BED.

HIPOCÓTILO

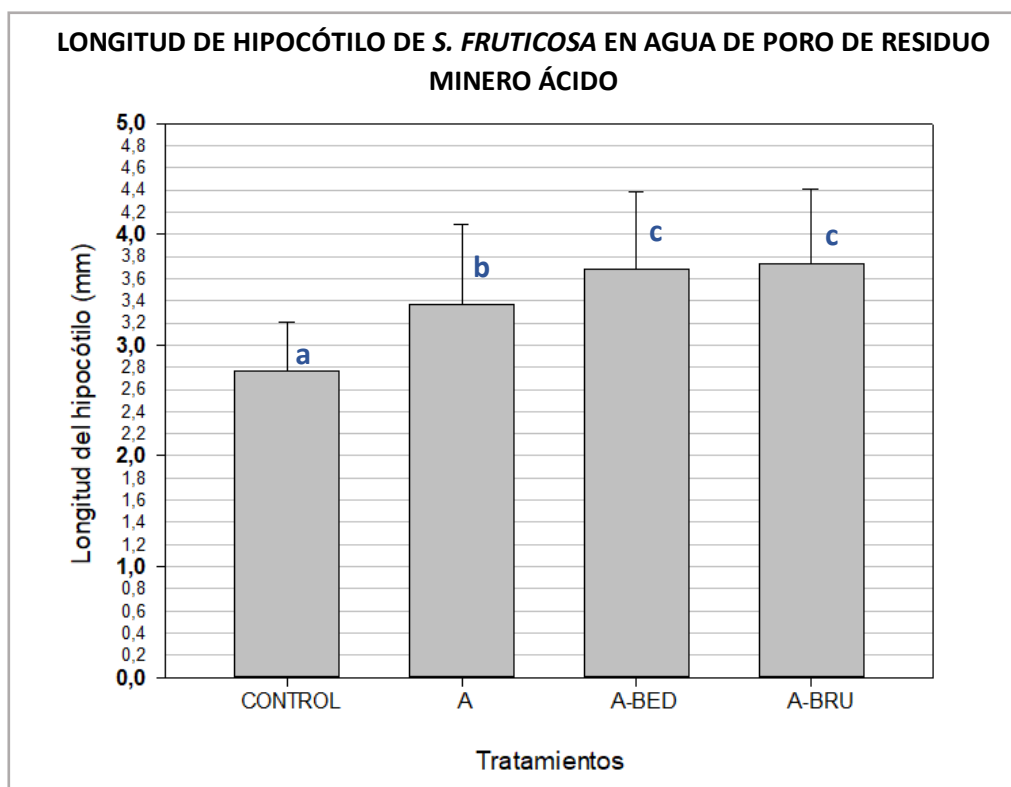


FIGURA 28. Longitud del hipocótilo de *Sarcocornia fruticosa* tras 15 días en agua de poro con residuos mineros ácidos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 10. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud del hipocótilo de *Sarcocornia fruticosa* con residuos mineros ácidos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	53,6856	3	17,8952	43,11	0,0000
Dentro de los grupos	147,792	356	0,415146		
Total (Corr.)	201,478	359			

Hay diferencias significativas entre las longitudes del hipocótilo obtenidas con los diferentes tratamientos (Tabla 10). La menor longitud se dio en el tratamiento control y la mayor en ambos tratamientos con residuos mineros ácidos enmendados, sin diferencias significativas entre ellos.

COTILEDONES

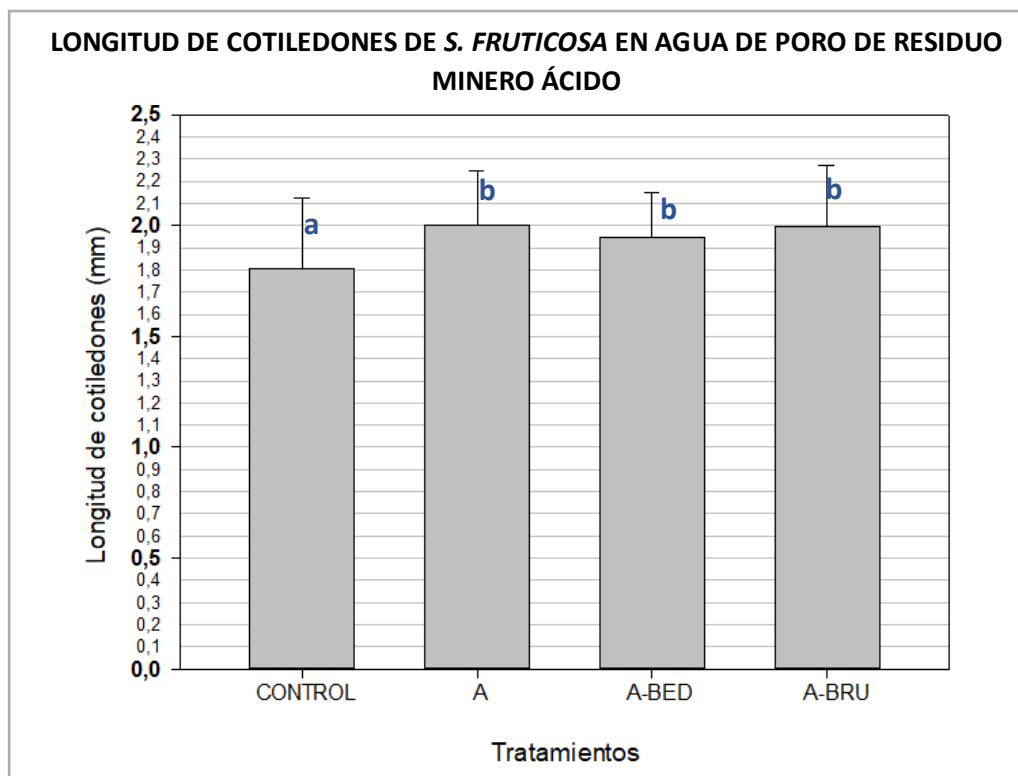


FIGURA 29. Longitud de los cotiledones de *Sarcocornia fruticosa* tras 15 días en agua de poro con residuos mineros ácidos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 11. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud de los cotiledones de *Sarcocornia fruticosa* con residuos mineros ácidos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	2,28475	3	0,761583	10,94	0,0000
Dentro de los grupos	24,7886	356	0,0696308		
Total (Corr.)	27,0733	359			

En las longitudes de los cotiledones obtenidas con los distintos tratamientos también hay estadísticamente una diferencia significativa (Tabla 11). En este caso la diferencia es apreciable entre el Control y los tratamientos A, A-BED y A-BRU. Por lo que no hay diferencias entre las soluciones que contienen residuos mineros ácidos.

4.1.4 Resultados de vigor de *S. fruticosa* en agua de poro de residuos mineros básicos



FIGURA 30. Plántulas de *Sarcocornia fruticosa* del tratamiento control.



FIGURA 31. Plántulas de *Sarcocornia fruticosa* del tratamiento B.



FIGURA 32. Plántulas de *Sarcocornia fruticosa* del tratamiento B-BED.



FIGURA 33. Plántulas de *Sarcocornia fruticosa* del tratamiento B-BRU.

RAÍZ

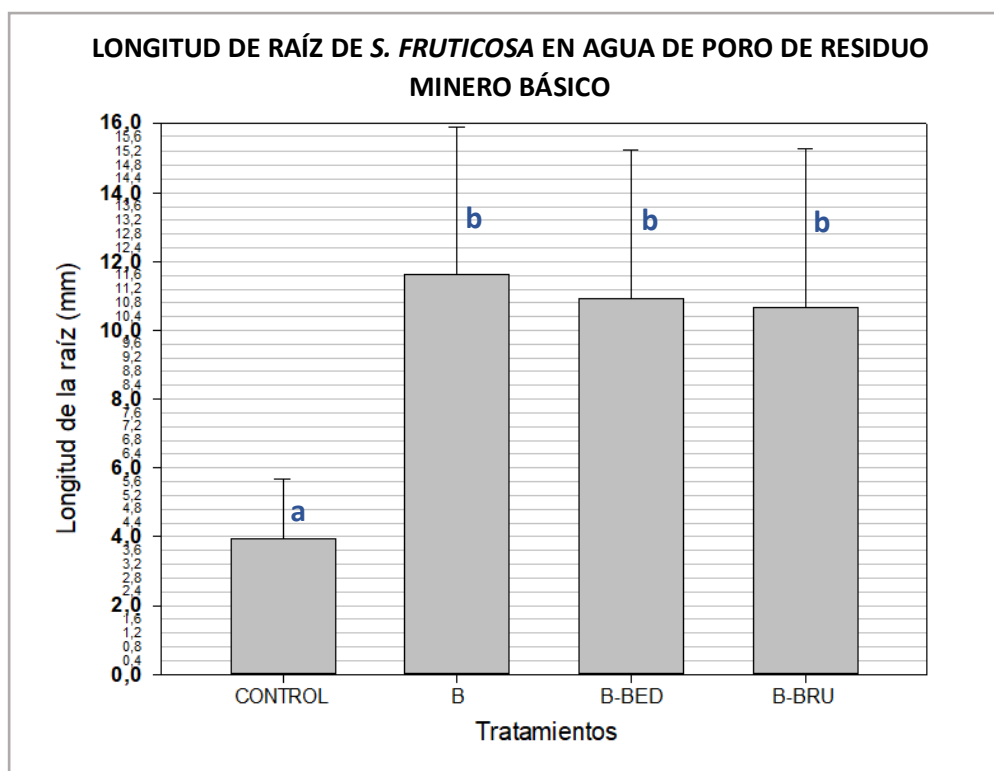


FIGURA 34. Longitud de la raíz de *Sarcocornia fruticosa* tras 15 días en agua de poro con residuos mineros básicos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 12. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud de la raíz de *Sarcocornia fruticosa* con residuos mineros básicos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	3484,99	3	1161,66	75,66	0,0000
Dentro de los grupos	5466,27	356	15,3547		
Total (Corr.)	8951,26	359			

Tenemos una diferencia significativa en la longitud de la raíz según el tratamiento utilizado (Tabla 12). Las diferencias se observan entre el tratamiento control y el resto de tratamientos con residuos mineros básicos. Entre las tres soluciones con residuos mineros básicos, por lo tanto, no hay diferencias significativas.

HIPOCÓTILO

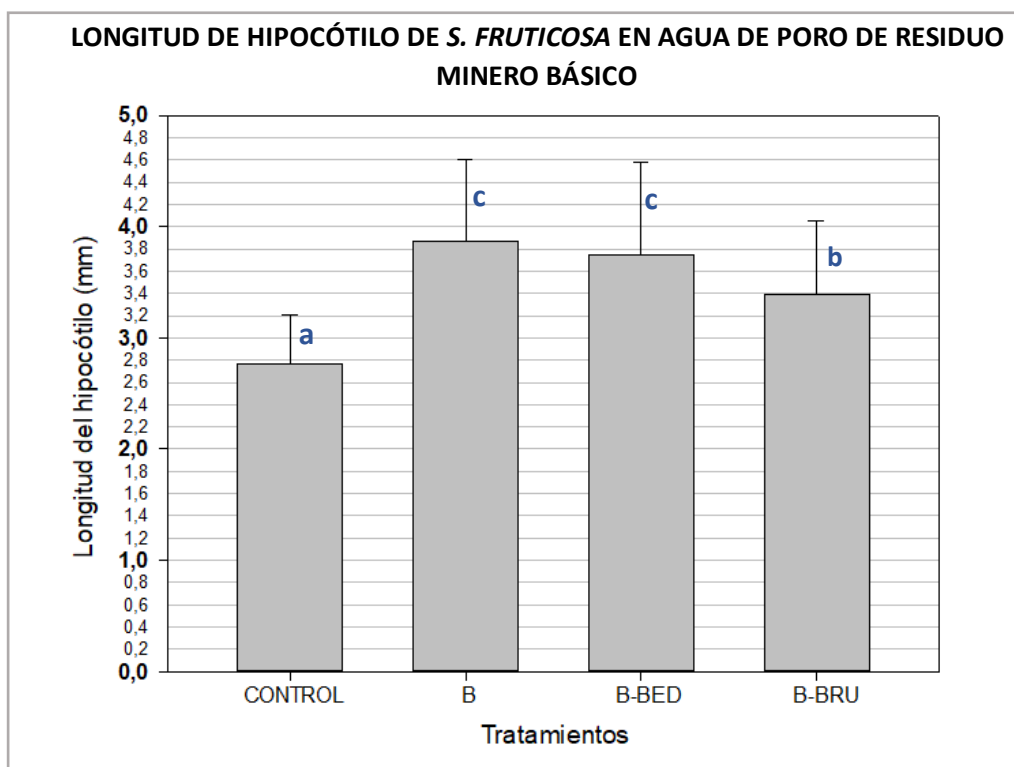


FIGURA 35. Longitud del hipocótilo de *Sarcocornia fruticosa* tras 15 días en agua de poro con residuos mineros básicos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 13. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud del hipocótilo de *Sarcocornia fruticosa* con residuos mineros básicos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	66,5267	3	22,1756	47,25	0,0000
Dentro de los grupos	167,085	356	0,46934		
Total (Corr.)	233,612	359			

Existen diferencias significativas entre la longitud que producen en el hipocótilo los distintos tratamientos (Tabla 13). La menor longitud se dio en el tratamiento control y la mayor en el residuo minero básico sin enmendar y enmendado con el biochar de lodos de depuradora (B-BED). Entre los tratamientos B y B-BED no hay diferencias, se han comportado de una manera similar en cuanto a la longitud del hipocótilo.

COTILEDONES

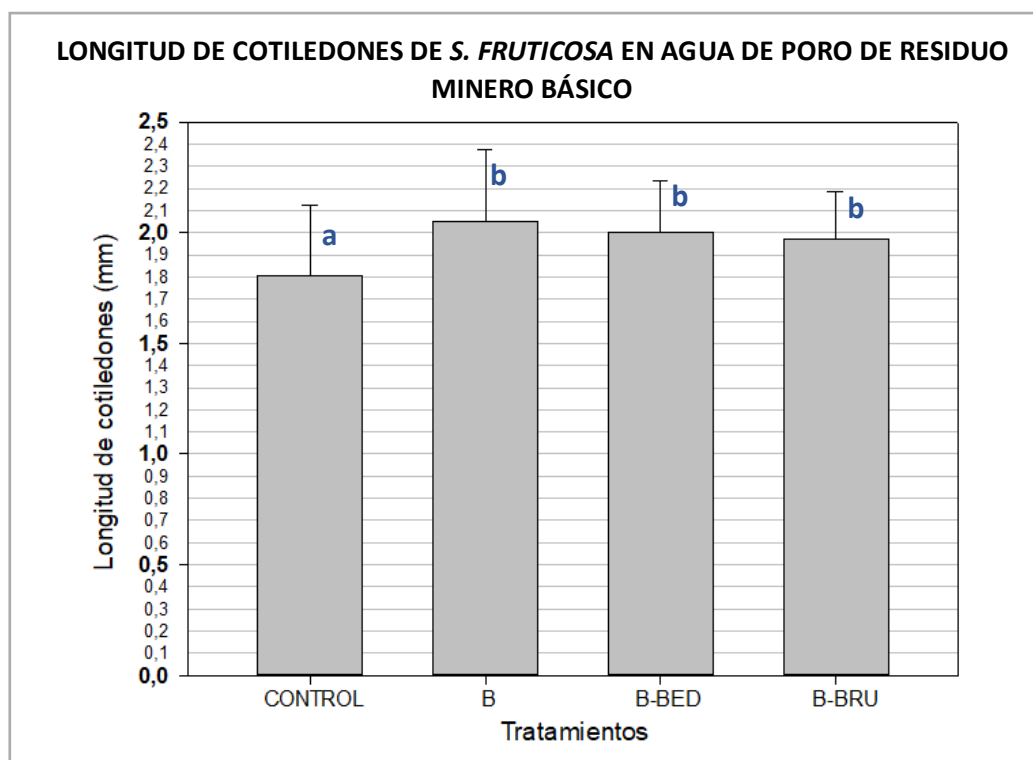


FIGURA 36. Longitud de los cotiledones de *Sarcocornia fruticosa* tras 15 días en agua de poro con residuos mineros básicos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 14. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud de los cotiledones de *Sarcocornia fruticosa* con residuos mineros básicos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	3,02333	3	1,00778	13,06	0,0000
Dentro de los grupos	27,4807	356	0,0771929		
Total (Corr.)	30,504	359			

Para la longitud de los cotiledones también hay una diferencia significativa según el tratamiento utilizado (Tabla 14). Entre las longitudes obtenidas en los tres tratamientos con residuos mineros básicos no se encuentra ninguna diferencia, pero sí que se aprecia entre éstos y control.

4.2 RESULTADOS DE *ARTHROCNEMUM MACROSTACHYUM*

4.2.1 Resultados de germinación de *A. macrostachyum* en agua de poro de residuos mineros ácidos

Como se puede observar (Figura 37), en todos los tratamientos ensayados el porcentaje de germinación de las semillas de esta especie también fue bastante alto, sin diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 15).

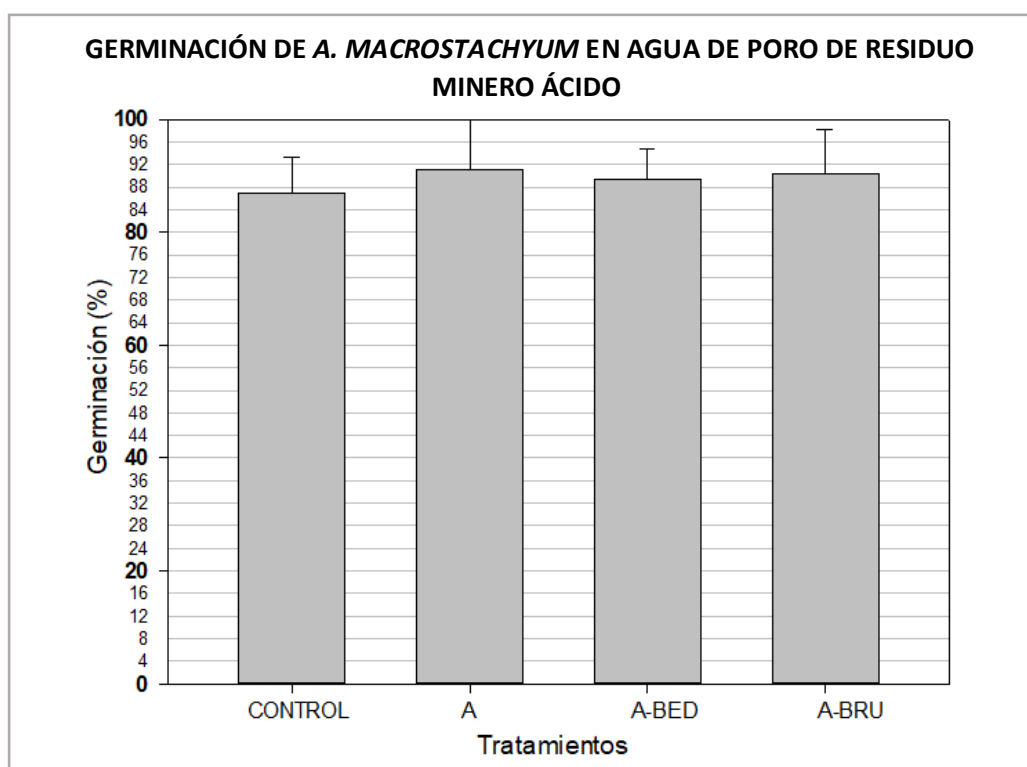


FIGURA 37. Germinación de *Arthrocnemum macrostachyum* expresada en porcentaje en cada uno de los tratamientos que contienen residuos mineros ácidos (A, A-BED Y A-BRU) más el tratamiento control. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 15. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de los porcentajes de germinación de *Arthrocnemum macrostachyum* en residuos mineros ácidos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	0,390473	3	0,130158	1,8	0,1619
Dentro de los grupos	3,18885	44	0,072474		
Total (Corr.)	3,57933	47			

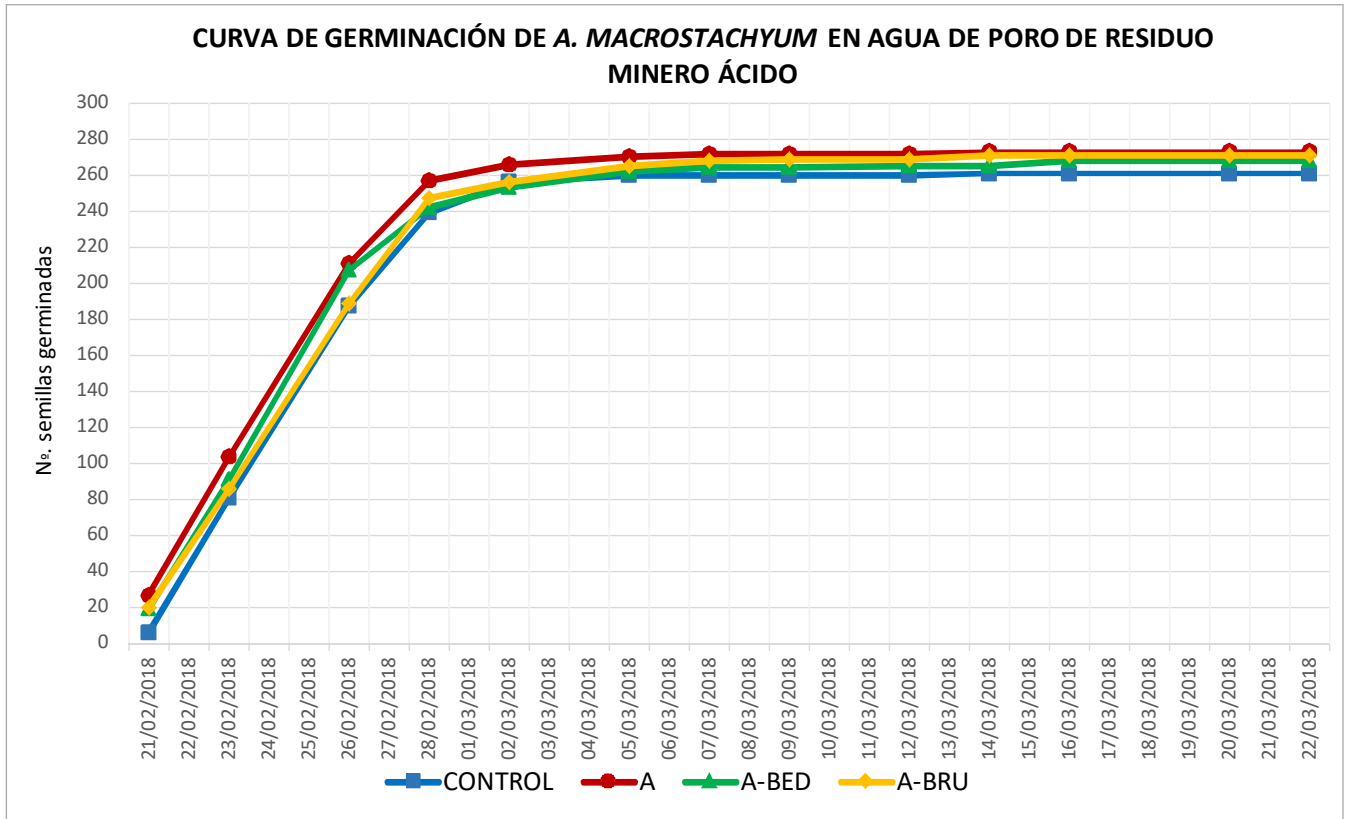


FIGURA 38. Curva de germinación de *Arthrocnemum macrostachyum* en agua de poro de residuo minero ácido.

Se hicieron 13 tomas de datos durante 1 mes. Se pueden apreciar resultados similares en los diferentes tratamientos. Sin embargo, los tratamientos de residuos ácidos a los que se le añadieron biochar (A-BED Y A-BRU) son sutilmente superados desde el primer día por el tratamiento que no contiene la enmienda (A). El 26 de febrero, tras una semana en la cámara de cultivo, fue el día en el que más semillas germinaron, 107 para A, 116 para A-BED y 103 para A-BRU. Esto supondría aproximadamente el 36 % del total de semillas por tratamiento.

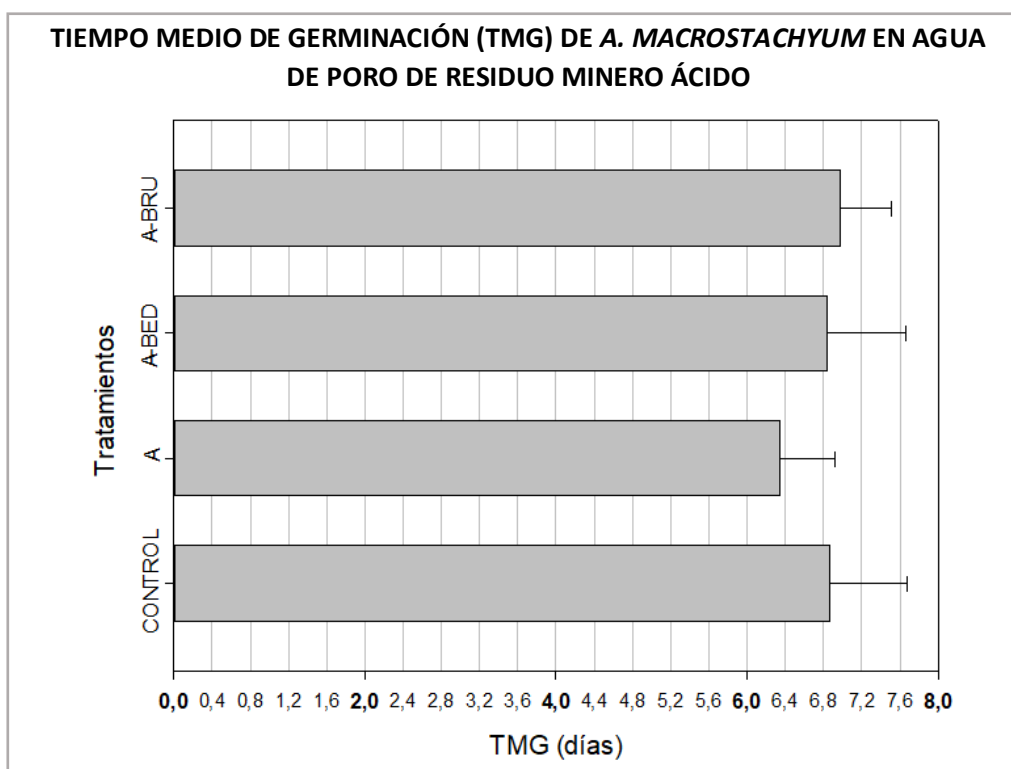


FIGURA 39. Tiempo medio de germinación (TMG) de *Arthrocnemum macrostachyum* en cada uno de los tratamientos que contienen residuos mineros ácidos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

El TMG para los residuos mineros ácidos tiene una media de 6,6 días aproximadamente, siendo el tratamiento con residuos mineros ácidos sin adición de biochar (A) el que ha obtenido un tiempo de germinación más bajo.

TABLA 16. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial del tiempo medio de germinación en *Arthrocnemum macrostachyum* con residuos mineros ácidos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	2,86971	3	0,956569	1,92	0,1405
Dentro de los grupos	21,9366	44	0,498559		
Total (Corr.)	24,8063	47			

Sin embargo, estadísticamente no hay diferencias significativas entre el tiempo que tardan en germinar las semillas que han sido regadas con los diferentes tratamientos (Tabla 16).

4.2.2 Resultados de germinación de *A. macrostachyum* en agua de poro de residuos mineros básicos

El porcentaje de germinación obtenido en todos los tratamientos ensayados de residuos mineros básicos y control fue bastante alto (Figura 40), sin diferencias significativas entre ellos (Tabla 17).

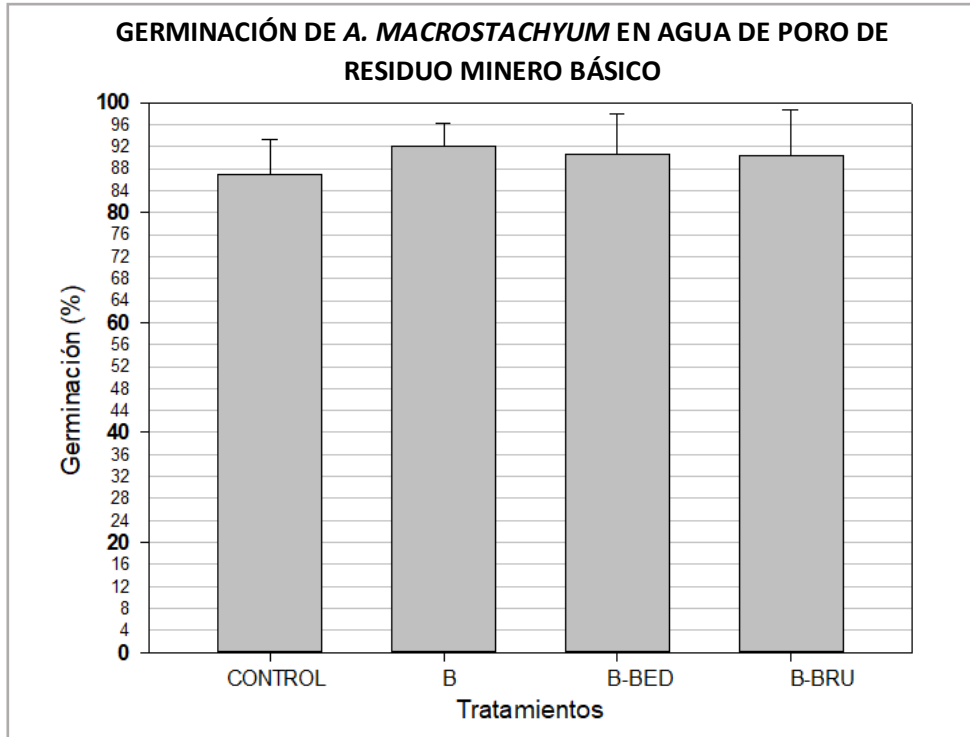


FIGURA 40. Germinación de *Arthrocnemum macrostachyum* expresada en porcentaje de cada uno de los tratamientos que contienen residuos mineros básicos (B, B-BED Y B-BRU) más tratamiento control. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 17. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de los porcentajes de germinación en *Arthrocnemum macrostachyum* con residuos mineros básicos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	0,191013	3	0,0636709	1,25	0,3019
Dentro de los grupos	2,23469	44	0,0507885		
Total (Corr.)	2,4257	47			

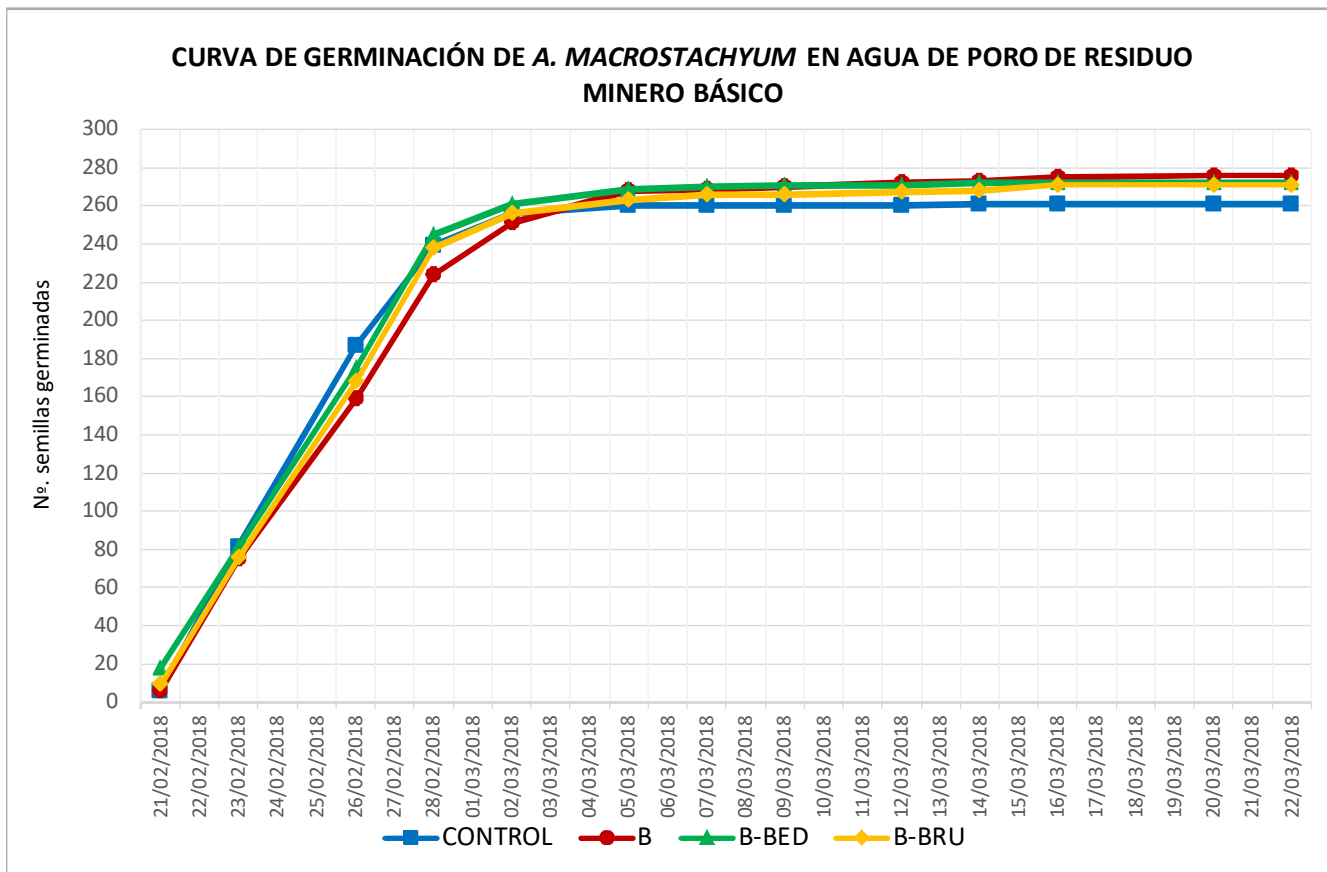


FIGURA 41. Curva de germinación de *Arthrocnemum macrostachyum* en agua de poro de residuo minero básico.

Durante las primeras dos semanas, la curva de germinación indica que el tratamiento B era superado por el resto de tratamientos, pero a partir del día 5 de marzo tuvo una pequeña crecida, siendo finalmente el tratamiento en el que germinó un mayor número de semillas. Al igual que con las disoluciones ácidas, el 26 de febrero fue el día en el que más semillas germinaron con un porcentaje del 30%.

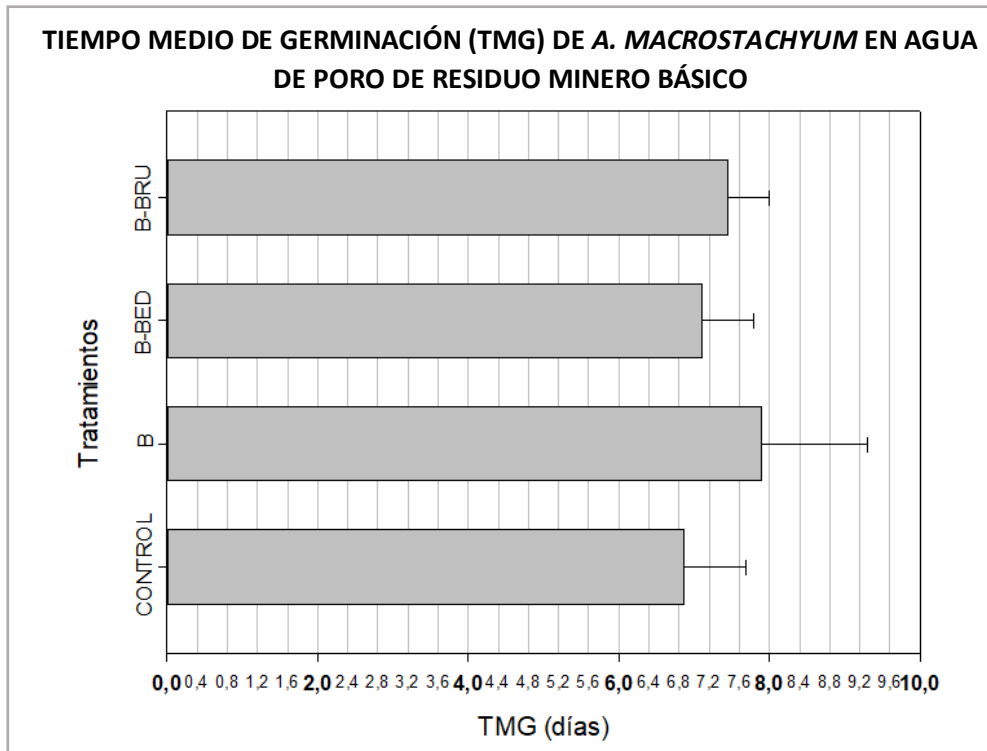


FIGURA 42. Tiempo medio de germinación (TMG) de *Arthrocnemum macrostachyum* en cada uno de los tratamientos que contienen residuos mineros básicos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

Las plántulas regadas con los dos residuos que contienen biochar muestran tiempos medios de germinación más bajos que para la solución sin adición de biochar.

TABLA 18. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial del tiempo medio de germinación en *Arthrocnemum macrostachyum* con residuos mineros básicos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	7,1901	3	2,3967	2,78	0,0522
Dentro de los grupos	37,9443	44	0,862371		
Total (Corr.)	45,1344	47			

Sin embargo, estadísticamente no hay una diferencia significativa entre los TMG obtenidos con los distintos tratamientos (Tabla 18).

4.2.3 Resultados de vigor de *A. macrostachyum* en agua de poro de residuos mineros ácidos



FIGURA 43. Plántula de *Arthrocnemum macrostachyum* del tratamiento control.



FIGURA 44. Plántula de *Arthrocnemum macrostachyum* del tratamiento A.



FIGURA 45. Plántula de *Arthrocnemum macrostachyum* del tratamiento A-BED.



FIGURA 46. Plántula de *Arthrocnemum macrostachyum* del tratamiento A-BRU.

RAÍZ

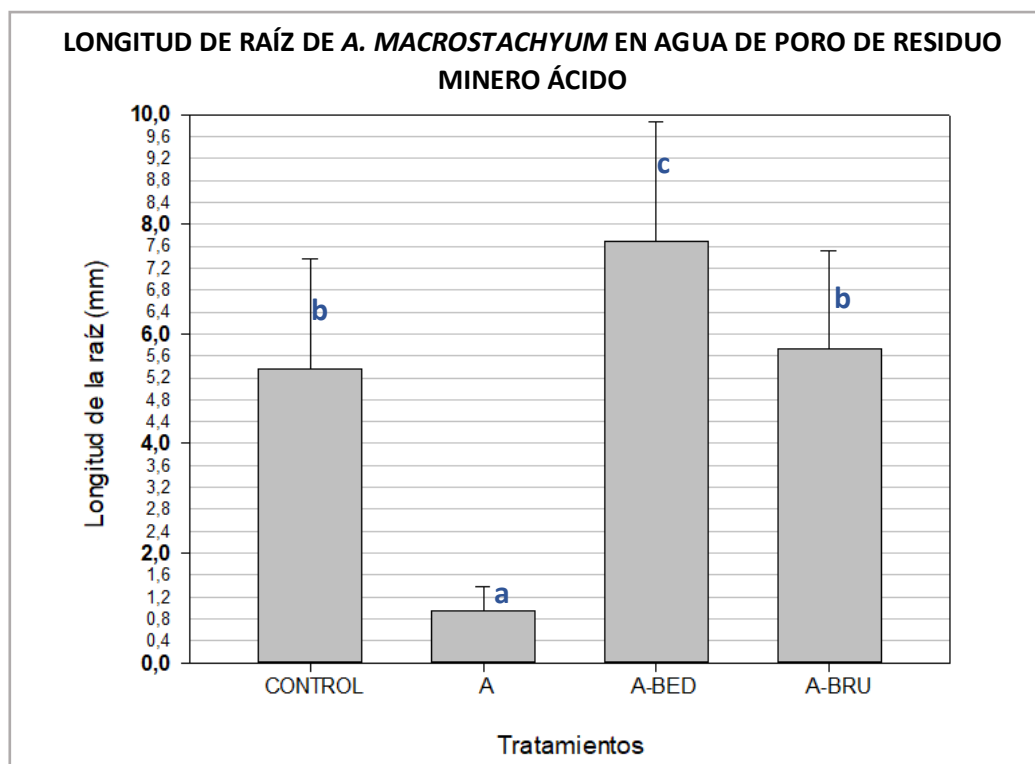


FIGURA 47. Longitud de la raíz de *Arthrocnemum macrostachyum* tras 15 días en agua de poro con residuos mineros ácidos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 19. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud de la raíz de *Arthrocnemum macrostachyum* con residuos mineros ácidos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	2190,01	3	730,002	238,46	0,0000
Dentro de los grupos	1089,81	356	3,06128		
Total (Corr.)	3279,82	359			

Como podemos observar (Tabla 19), existen estadísticamente diferencias significativas entre los resultados de vigor de la raíz obtenidos con los diferentes tratamientos. Estas diferencias se encuentran entre: A – Control y A-BRU; A – A-BED; A-BED – Control y A-BRU. Por lo que no hay diferencias entre los resultados obtenidos con el tratamiento A-BRU y el Control.

Se obtiene una raíz muy reducida en las plántulas regadas con el tratamiento A, mientras que con el tratamiento A-BED y A-BRU se obtienen longitudes en la raíz mucho mayores, destacando el tratamiento A-BED.

HIPOCÓTILO

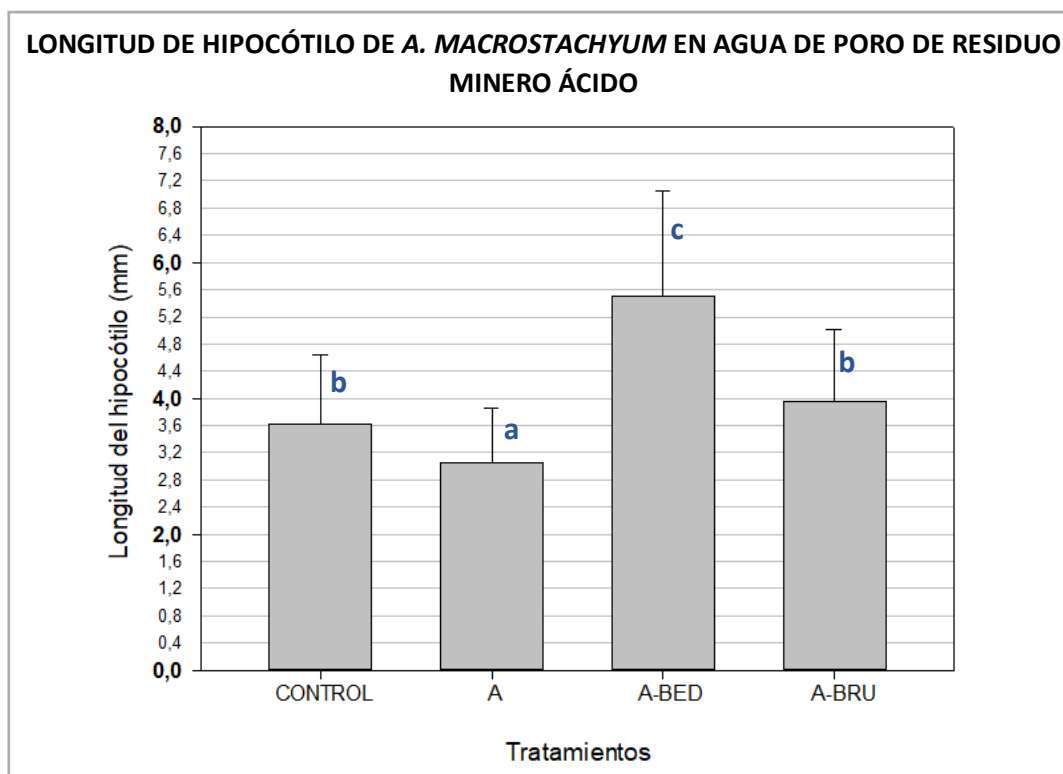


FIGURA 48. Longitud del hipocótilo de *Arthrocnemum macrostachyum* tras 15 días en agua de poro con residuos mineros ácidos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 20. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud del hipocótilo de *Arthrocnemum macrostachyum* con residuos mineros ácidos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	295,4	3	98,4667	75,96	0,0000
Dentro de los grupos	461,496	356	1,29634		
Total (Corr.)	756,896	359			

P-valor indica que hay diferencias significativas en los resultados de la longitud del hipocótilo para los diferentes tratamientos (Tabla 20). Estas diferencias se aprecian entre: A – Control y A-BRU; A – A-BED; A-BED – Control y A-BRU. En definitiva, se observan diferencias para todos los tratamientos entre sí, menos para A-BRU y Control, con resultados similares o que tienen, estadísticamente, diferencias insignificantes.

COTILEDONES

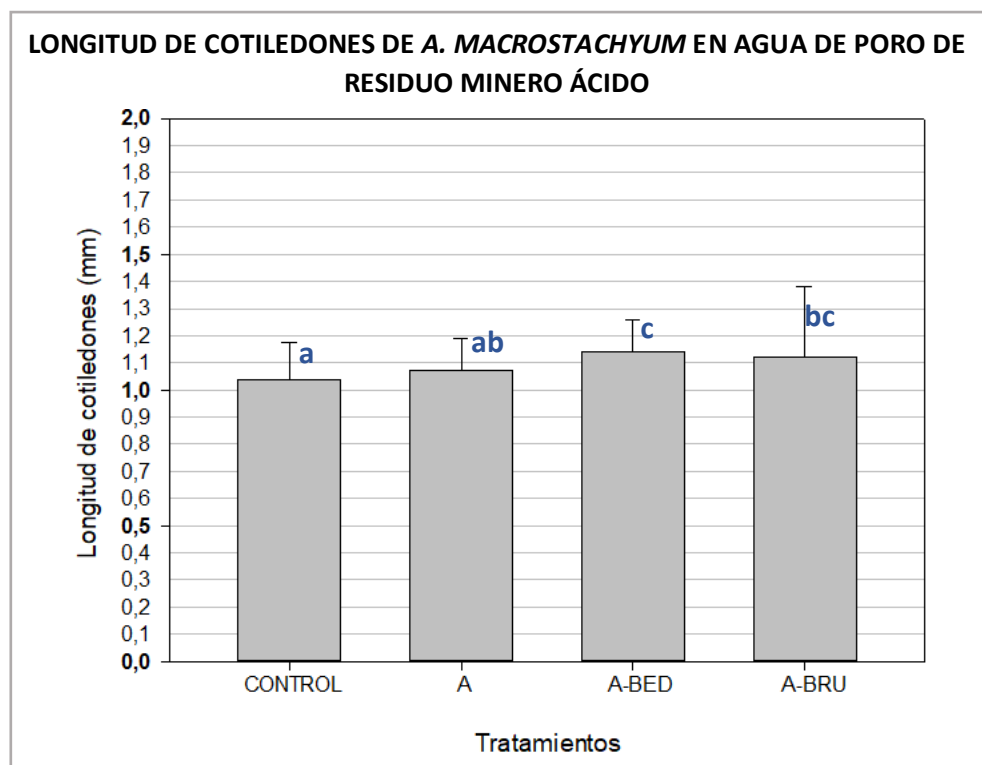


FIGURA 49. Longitud de los cotiledones de *Arthrocnemum macrostachyum* tras 15 días en agua de poro con residuos mineros ácidos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 21. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud de los cotiledones de *Arthrocnemum macrostachyum* con residuos mineros ácidos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	0,583194	3	0,194398	6,98	0,0001
Dentro de los grupos	9,91456	356	0,0278499		
Total (Corr.)	10,4978	359			

Existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos para la longitud de los cotiledones en los diferentes tratamientos utilizados (Tabla 21). Apreciamos estas diferencias entre: Control – A-BED; Control – A-BRU; A – A-BED. Según las estadísticas se perciben comportamientos similares entre Control – A, y a su vez, éste último, con A-BRU; y entre A-BRU – A-BED.

4.2.4 Resultados de vigor de *A. macrostachyum* en agua de poro de residuos mineros básicos



FIGURA 50. Plántula de *Arthrocnemum macrostachyum* del tratamiento control.

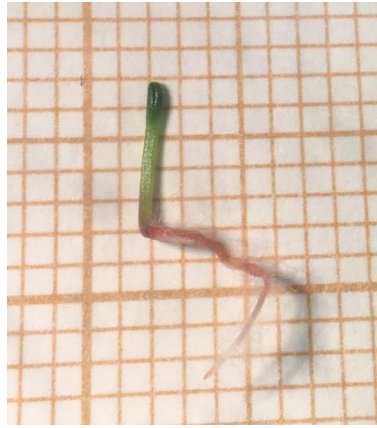


FIGURA 51. Plántula de *Arthrocnemum macrostachyum* del tratamiento B.



FIGURA 52. Plántula de *Arthrocnemum macrostachyum* del tratamiento B-BED.



FIGURA 53. Plántula de *Arthrocnemum macrostachyum* del tratamiento B-BRU.

RAÍZ

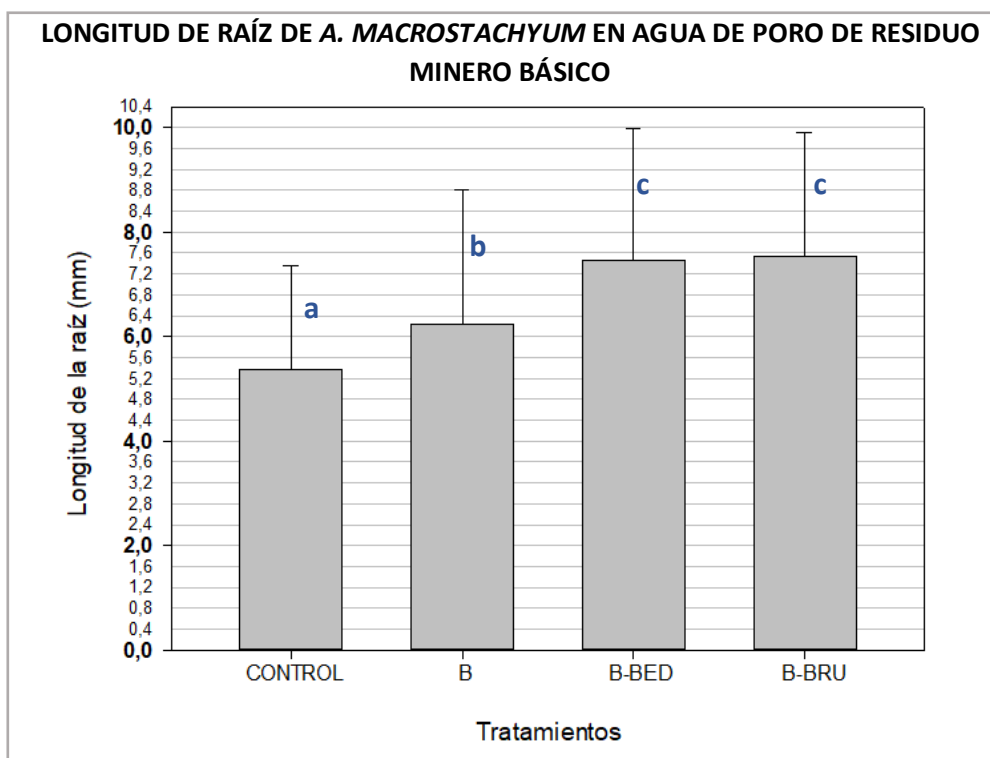


FIGURA 54. Longitud de la raíz de *Arthrocnemum macrostachyum* tras 15 días en agua de poro con residuos mineros básicos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 22. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud de la raíz de *Arthrocnemum macrostachyum* con residuos mineros básicos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	293,139	3	97,7129	17,42	0,0000
Dentro de los grupos	1996,97	356	5,60947		
Total (Corr.)	2290,11	359			

Obtenemos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la longitud de la raíz que produce cada uno de los tratamientos (Tabla 22). Estas diferencias se aprecian entre: Control – B; Control – B-BED y B-BRU; B – B-BED y B-BRU. Esto significa que para los dos tratamientos con residuos mineros básicos que han sido enmendados con dos clases de biochar se obtienen longitudes de raíz similares y que, por lo tanto, no presentan diferencias significativas.

HIPOCÓTILO

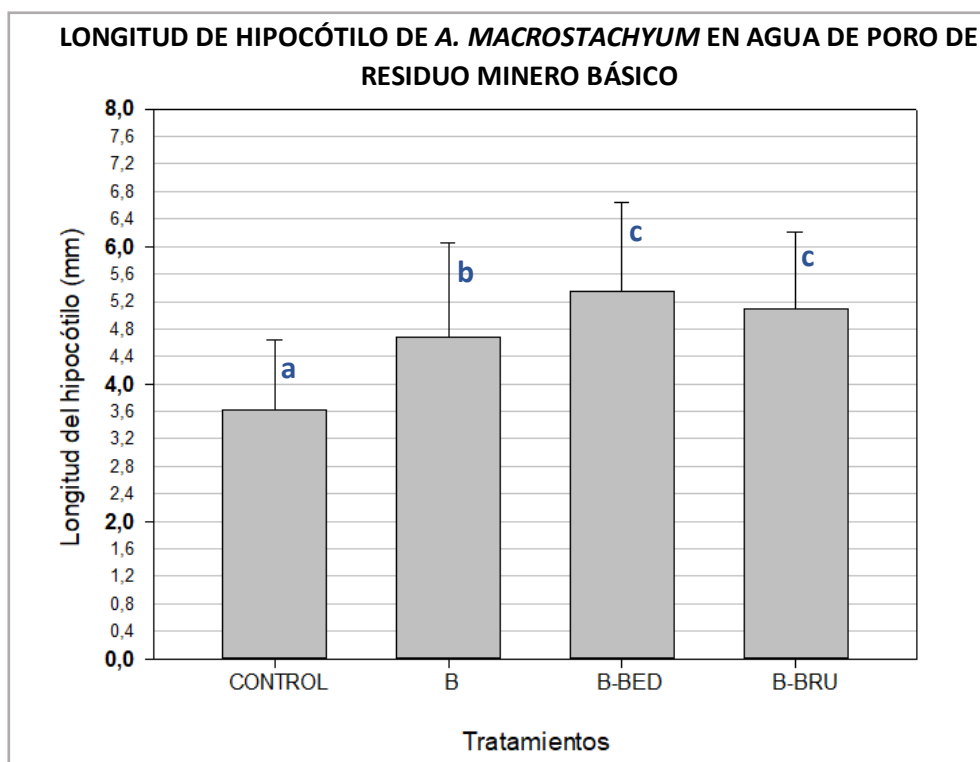


FIGURA 55. Longitud del hipocótilo de *Arthrocnemum macrostachyum* tras 15 días en agua de poro con residuos mineros básicos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 23. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud del hipocótilo de *Arthrocnemum macrostachyum* con residuos mineros básicos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	154,817	3	51,6056	35,57	0,0000
Dentro de los grupos	516,499	356	1,45084		
Total (Corr.)	671,316	359			

Hay estadísticamente diferencias significativas entre la longitud del hipocótilo obtenida para cada uno de los tratamientos (Tabla 23). Sin embargo, para los dos tratamientos en los que se ha utilizado biochar, se han producido longitudes de hipocótilo similares y que no han presentado diferencias significativas entre ellos. Por lo tanto, las diferencias se observan entre: Control – B; Control – B-BED y B-BRU; B – B-BED y B-BRU.

COTILEDONES

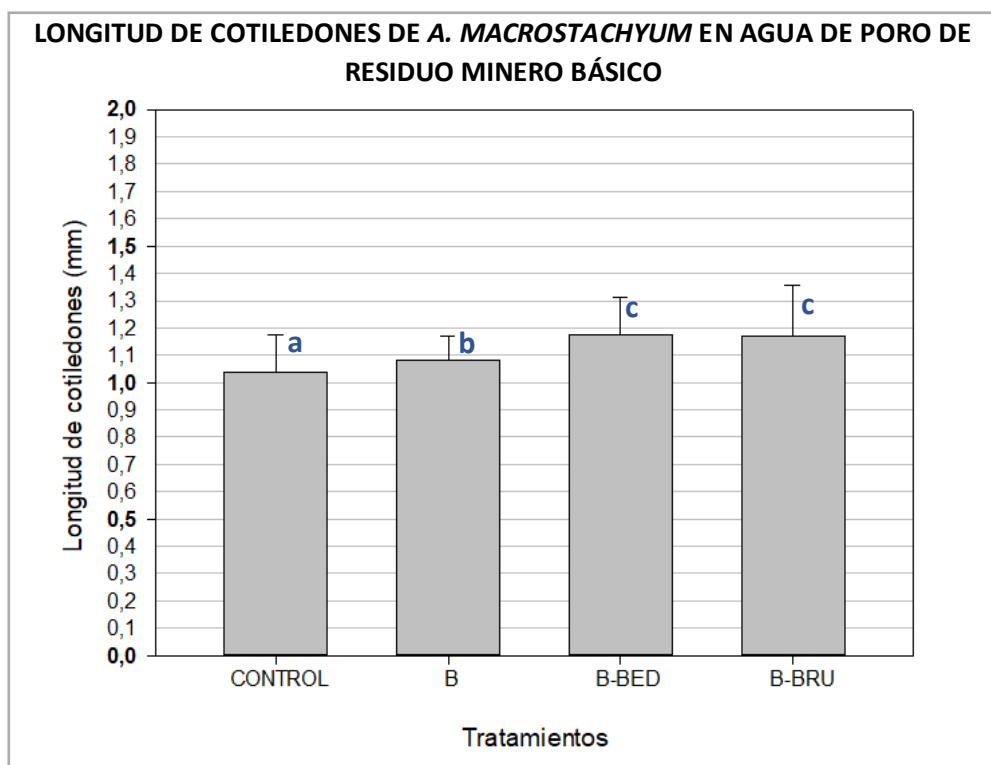


FIGURA 56. Longitud de los cotiledones de *Arthrocnemum macrostachyum* tras 15 días en agua de poro con residuos mineros básicos. Los valores son la media de los resultados obtenidos en las tres repeticiones \pm DE.

TABLA 24. Resultado del análisis de varianza ANOVA unifactorial de la longitud de los cotiledones de *Arthrocnemum macrostachyum* con residuos mineros básicos.

	Suma de cuadrados	Df	Media de cuadrados	F-ratio	P-valor
Entre grupos	1,17878	3	0,392926	19,46	0,0000
Dentro de los grupos	7,18778	356	0,0201904		
Total (Corr.)	8,36656	359			

Aunque la longitud de los cotiledones para los diferentes tratamientos parezca muy similar, el análisis de varianza nos indica que hay diferencias significativas (Tabla 24). Para los tratamientos con biochar (B-BED y B-BRU) sí que se han obtenido longitudes similares, y que según nos indica el análisis, no hay diferencias significativas entre ellos. Sí que las hay entre: Control – B; Control – B-BED y B-BRU; B – B-BED y B-BRU.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

5.1 DISCUSIÓN

Todas las plantas absorben metales del medio donde se encuentran pero en distinto grado dependiendo de la especie vegetal y de las características y contenido de metales pesados. Una vez absorbidos tienen efectos en el crecimiento y desarrollo de las mismas (Prieto et al., 2009). En este proyecto se ha estudiado de qué manera afectan las aguas de poro de residuos mineros ácidos y básicos (con y sin adición de biochar) al porcentaje de germinación, al tiempo medio de germinación y al vigor de cada parte de la plántula de dos especies halófitas: *Sarcocornia fruticosa* y *Arthrocnemum macrostachyum*.

Comenzando por *Sarcocornia fruticosa*, el porcentaje de germinación tanto con agua de poro de residuos mineros ácidos como básicos no ha presentado diferencias significativas respecto a las soluciones utilizadas. Por lo tanto, las soluciones con metales pesados y sales de distinto pH no han afectado al porcentaje de germinación. Estas soluciones, básicas y ácidas, tampoco han afectado al tiempo medio de germinación, ya que no hubo diferencias significativas del TMG entre ellas, ni respecto al control. Para los dos tipos de residuos sin enmendar y enmendados, el tiempo medio de germinación ha sido aproximadamente de 3 días.

En los resultados de vigor de *Sarcocornia fruticosa* para los residuos mineros ácidos se ha observado que la parte de la plántula que más se ha visto afectada según el tratamiento utilizado ha sido la raíz. Wang (1991) propuso el crecimiento de la raíz como punto final de lectura (endpoint) ya que es el marcador fenotípico más sensible (Guillén et al., 2008).

Se obtuvieron raíces muy cortas con el tratamiento no enmendado con biochar (A). Esto se atribuye al papel que ejercen los metales pesados sobre la raíz, disminuyendo su crecimiento. Lerda (1992) encontró que el Pb reduce el crecimiento radicular y la frecuencia de células mitóticas y produce un incremento de la frecuencia de células aberrantes en *Allium cepa*. Sabiendo que la raíz es una parte fundamental de la planta, un desarrollo escaso de ésta implicaría una menor absorción de agua y minerales, un menor anclaje de las plantas al suelo, menor almacenamiento de sustancias, etc. Por lo tanto, además de la fitotoxicidad que podría sufrir la plántula, el escaso desarrollo radicular haría muy improbable que la planta se desarrollase correctamente en suelos con residuos mineros ácidos sin enmendar. Pasa lo contrario con las plántulas en contacto con aguas de poro de residuos mineros ácidos que sí fueron enmendados con biochar (A-BED y A-BRU), cuya longitud de raíz se ha visto favorecida por el uso de dichos tratamientos. Entre éstos destaca A-BED por una longitud de raíz mayor, con aproximadamente 10 mm. Esto se debe a las propiedades que tiene el biochar frente a los metales pesados que contienen los residuos mineros.

El biochar mejora las propiedades químicas del suelo: puede aumentar el pH, la retención de nutrientes, la capacidad de intercambio catiónico y la biomasa de los cultivos (Schnell et al., 2012; Xu et al., 2012), además de un mayor secuestro de carbono en el suelo (Lehmann, 2007a). Algunos de estos efectos de la adición de biochar se observan con claridad en los tratamientos ensayados (tabla 4). El pH del suelo, es considerado uno de los principales factores que afectan a la disponibilidad de los metales pesados al afectar el equilibrio entre la especiación metálica, solubilidad, adsorción e intercambio de iones en el suelo (McBride et al., 1997; Kabata-Pendias, 2000; Riechman, 2002). El aumento de pH debido a la adición de biochar puede causar la precipitación de algunos metales fuera de la solución y sobre la superficie del propio biochar (Inyang et al., 2016), lo que reduciría la disponibilidad de estos metales pesados para las plantas (Zhang et al., 2013). Con excepción del Mo, Se y As, la biodisponibilidad de los metales pesados disminuye con el aumento del pH del suelo debido a su precipitación como

hidróxidos insolubles, carbonatos y complejos orgánicos (Basta y Tabatabai, 1992; Alloway, 1995; Silveira *et al.*, 2003). Además, el pH afecta a la entrada del metal a las raíces de las plantas (Rieuwerts *et al.*, 1998). Por estas razones, vemos como en los resultados de la longitud de la raíz obtenidos con las aguas de poro de residuos mineros ácidos sin enmendar (A) se producen raíces muy cortas, cuyo crecimiento parece estar casi inhibido.

La toxicidad por metales pesados, que se inicia en la raíz, y alcanza los cotiledones en concentraciones más bajas, se atenúa gracias los mecanismos de compartimentación extracelular o extracitosólica o por mecanismos de secuestro e inactivación en el propio citosol (Barceló y Poschenrieder, 1992). Por ello, el vigor del hipocótilo y de los cotiledones se ha visto menos influenciado por los tratamientos utilizados. Los resultados de vigor del hipocótilo nos indican que la solución de agua de poro de residuo minero ácido sin enmendar (A) ha producido una menor longitud que con las otras aguas de poro con biochar. Sin embargo, las longitudes obtenidas en las plántulas regadas con los tres tipos de tratamientos ácidos, con y sin enmendar, han sido mayores que las obtenidas con el control. Cabe destacar, que los dos tratamientos que contienen biochar (A-BED y A-BRU) han producido, de la misma manera, una mayor longitud en el hipocótilo que el resto de soluciones.

Los resultados de la longitud de los cotiledones obtenidos en los tres tratamientos ácidos han sido muy similares, sin diferencias significativas entre ellos. Además, se han producido cotiledones más grandes utilizando dichas soluciones que con el control. Con esto, podríamos decir, que las soluciones obtenidas de aguas de poro de residuos mineros ácidos contribuyen a un mayor crecimiento de los cotiledones.

En el caso de las soluciones con residuos mineros básicos hemos visto que la raíz de *Sarcocornia fruticosa* se ha comportado de la misma manera con los tres tratamientos. Las semillas que han sido regadas con las soluciones de residuos mineros básicos, con y sin adición de biochar, han obtenido raíces mucho más largas que con el control. Por lo tanto, el uso de estas soluciones que contienen residuos mineros básicos favorece el crecimiento de la raíz de *Sarcocornia fruticosa*.

En los resultados de la longitud del hipocótilo también se han visto diferencias significativas según el tratamiento utilizado. Se han obtenido longitudes similares (y sin diferencias significativas) en plántulas regadas con los tratamientos B y B-BED, además de ser los que han producido hipocótilos más largos. Aunque las tres soluciones de agua de poro de residuos mineros básicos han originado una mayor longitud que el control. Por lo tanto podremos afirmar que estas soluciones producen hipocótilos más largos.

En cuanto a la longitud de los cotiledones, pasa lo mismo que con las soluciones de agua de poro de residuos mineros ácidos. Se originan cotiledones más grandes en las plántulas regadas con los tratamientos con residuos mineros básicos que en las regadas con el tratamiento control. Además, no hubo diferencias significativas entre las longitudes obtenidas para los diferentes tratamientos con residuos mineros básicos.

La estimulación de crecimiento que se produjo en algunos de los tratamientos con soluciones de agua de poro de los residuos mineros en relación a los obtenidos en los controles concuerdan con la estimulación de desarrollo obtenida por Cañavate (2017) en los controles de salinidad. Este mayor desarrollo en presencia de sales se debe a la capacidad de los halófitos de ver estimulado su desarrollo en presencia de sales (Flowers *et al.*, 1977).

El porcentaje de semillas germinadas de *Arthrocnemum macrostachyum* no se vio afectado por los distintos tratamientos básicos y ácidos, puesto que no se han encontrado diferencias entre éstos ni entre éstos y el control.

El tiempo medio de germinación no ha presentado diferencias significativas según el tratamiento utilizado, es decir, si la solución había sido enmendada con biochar, si contenía biochar de lodos de depuradora o si contenía biochar procedente de podas urbanas. Así que se podría decir que este factor tampoco se ha visto influenciado por los metales pesados que contienen las soluciones. Sin embargo, aunque comprar entre los dos tipos de residuos mineros no era el objetivo de este trabajo, sí se han visto diferencias entre ellos. Para las soluciones que contenían residuos mineros ácidos, el TMG ha sido de entre 6,3 – 7 días, mientras que para las soluciones con residuos mineros básicos las semillas han tardado en germinar entre 6,9 – 7,9 días. Por lo tanto, sabemos que las plántulas que han sido regadas con los residuos mineros básicos tardaron más tiempo en germinar.

En cuanto a los resultados de vigor para los tratamientos con residuos mineros ácidos, al igual que ocurría con *Sarcocornia fruticosa*, se ha observado una longitud de raíz muy reducida para las plántulas que han sido regadas con el tratamiento ácido sin biochar (A). Sin embargo, las raíces han alcanzado longitudes muy superiores con el tratamiento que contenía biochar procedente de lodos de depuradora (A-BED). También se ha observado que el control y el tratamiento con residuos mineros ácidos con biochar procedente de podas urbanas se han comportado de igual forma, produciendo longitudes de raíz muy similares y sin diferencias significativas. Vemos como, tras la adición de biochar a los residuos mineros ácidos, se redujo la concentración de metales pesados disponibles, sobre todo, en Cd, Pb y Zn (Tabla 4). En definitiva, el biochar que procedía de lodos de depuradora y que ha sido utilizado como enmienda de los residuos mineros ácidos ha servido para estimular un mayor crecimiento en la raíz. Según la bibliografía, la adición de biochar implica un estímulo de la biomasa radicular y el desarrollo de la zona del meristemo (Lehmann et al., 2011).

En los resultados de longitud del hipocótilo se ha podido observar que el tratamiento que produce hipocótilos más largos ha sido el que contenía agua de poro de residuos mineros ácidos enmendados con biochar de lodos de depuradora (A-BED). El que ha producido los hipocótilos más cortos ha sido el agua de poro de residuos mineros ácidos que no fueron enmendados con biochar (A); mientras que la solución de residuos mineros ácidos que contenía biochar de podas urbanas (A-BRU) ha originado longitudes de hipocótilo semejantes a las del control, sin diferencias significativas entre ellos. Por lo tanto ocurre lo mismo que para la longitud de la raíz, el tratamiento A-BED provoca un mayor crecimiento en el hipocótilo.

En los resultados de la longitud de los cotiledones no se han observado tantas diferencias como en las otras dos partes de la plántula, sin embargo, el estudio estadístico nos ha revelado que sí que hubo diferencias significativas entre las longitudes obtenidas con los diferentes tratamientos. Los cotiledones más grandes se han producido en plántulas que fueron regadas con el tratamiento que contenía biochar de lodos de depuradora (A-BED), aunque los resultados obtenidos con el tratamiento A-BRU presentó similitudes con el anterior.

En el caso de los residuos mineros básicos, la longitud de la raíz de *Arthrocnemum macrostachyum*, no se ha visto tan afectada como con los residuos ácidos. Para los tres tratamientos se han obtenido longitudes superiores a las obtenidas con el control. Sin embargo, las soluciones que más han ayudado al crecimiento de la raíz han sido las que fueron enmendadas con biochar (B-BED y B-BRU).

Con la longitud del hipocótilo ocurrió lo mismo que con la raíz. Las soluciones con residuos mineros básicos enmendados con biochar son los que han producido una mayor longitud. También se observa, que el tratamiento sin adición de biochar ha producido longitudes de hipocótilo más grandes que el control. Esto nos indica que los tres tipos de tratamientos que contienen metales pesados provocan un mayor crecimiento en el hipocótilo, destacando aquellos que sí poseían biochar.

Vuelve a suceder lo mismo con los resultados de longitud de los cotiledones. Aquellas soluciones que provenían de tratamientos con biochar (B-BED y B-BRU) han dado lugar a cotiledones más grandes, y además sin diferencias significativas para ambos tratamientos. Aun así, el tratamiento que no poseía biochar (B) ha producido también longitudes mayores que las obtenidas con el tratamiento control. Por lo tanto, las soluciones salinas con metales pesados ayudan a un mayor crecimiento de los cotiledones.

Como se ha mencionado anteriormente, la disponibilidad de los metales pesados para las plantas depende de una serie de factores, entre ellos el pH. Por lo tanto, si tenemos un pH alcalino, los metales formarán carbonatos o fosfatos minerales insolubles que no estarán disponibles para las plantas. De ahí que tengamos aguas de poro de residuos mineros básicos con concentraciones más bajas de Cd y Pb (tabla 4) que en las aguas de poro con residuos mineros ácidos. Y por ello, las plántulas no se ven tan afectadas por los tratamientos básicos. Ya que los metales pesados mencionados inhiben o reducen el crecimiento en la plántula, sobre todo el crecimiento radicular.

En síntesis, los resultados mostraron que el agua de poro procedente de residuos mineros ácidos, tanto con adición de biochar como sin él, no influyó en la respuesta germinativa de ninguna de las dos especies (*Sarcocornia fruticosa* y *Arthrocnemum macrostachyum*).

El agua de poro procedente de residuos mineros ácidos sin adición de biochar inhibió el crecimiento radicular tanto en *Sarcocornia fruticosa* como en *Arthrocnemum macrostachyum*. Sin embargo, el agua de poro de residuos mineros enmendados con biochar favoreció el crecimiento radicular, siendo el que contenía biochar de lodos de depuradora el que más aumentó la longitud de la raíz en las dos especies halófitas. La longitud del hipocótilo de *Sarcocornia fruticosa* no quedó reducida con ninguno de los 3 tratamientos de residuos mineros ácidos, ya que para éstos se produjeron longitudes mayores que las obtenidas con el tratamiento control. No obstante, la longitud del hipocótilo en las plántulas de *Arthrocnemum macrostachyum* regadas con agua de poro procedente de los residuos mineros ácidos sin enmendar fue más reducida que las que fueron regadas con el tratamiento control, siendo la procedente del residuo minero ácido con biochar de lodos de depuradora la que favoreció el crecimiento del hipocótilo. La longitud de los cotiledones de *Sarcocornia fruticosa* y *Arthrocnemum macrostachyum* no se vio reducida por ninguno de los 3 tratamientos de residuos mineros ácidos (con y sin biochar).

El agua de poro procedente de residuos mineros básicos, tanto con adición de biochar como sin él, tampoco influyó en la respuesta germinativa de las dos especies.

El agua de poro procedente de residuos mineros básicos incrementó la longitud de la raíz en ambas especies. En *Sarcocornia fruticosa* los 3 tratamientos de residuos mineros básicos se comportaron de la misma manera, pero para *Arthrocnemum macrostachyum* fueron los tratamientos con biochar los que produjeron raíces más largas. La longitud del hipocótilo también se vio favorecida por los 3 tratamientos en ambas especies. En *Sarcocornia fruticosa* los tratamientos que produjeron hipocótilos más largos fueron el que no contenía biochar y el

que contenía biochar de lodos de depuradora, sin embargo, para *Arthrocnemum macrostachyum* los que más favorecieron el crecimiento del hipocótilo fueron los dos tratamientos que contenían biochar. En ambas especies, también, el crecimiento de los cotiledones se vio favorecido por los 3 tratamientos, no habiendo diferencias entre ellos en *Sarcocornia fruticosa*, pero sí en *Arthrocnemum macrostachyum*, donde se produjeron cotiledones más grandes con el uso de biochar.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

6.1 CONCLUSIONES

1. El agua de poro procedente de residuos mineros ácidos y básicos enmendados con biochar y sometidos a condiciones de hidromorfía variable durante 303 días no afectaron la respuesta germinativa de *Sarcocornia fruticosa* ni de *Arthrocnemum macrostachyum*.

2. Los datos mostraron que la longitud de la raíz es un buen parámetro de partida para medir la respuesta de las plántulas en medios que contienen metales pesados, así como su respuesta a los tratamientos que contienen dichos metales y que han sido enmendados, en este caso, con biochar de lodos de depuradora y de podas de árboles urbanos.

3. La adición de ambos tipos de biochar fue más efectiva para favorecer el vigor de las plántulas de *Sarcocornia fruticosa* y *Arthrocnemum macrostachyum* en residuos mineros ácidos que en básicos.

4. Para optimizar la efectividad de los tratamientos de adición de biochar de lodos de depuradora y podas de árboles urbanos como enmiendas a residuos mineros ácidos y básicos, deberían seleccionarse específicamente éstos en función de la especie que se pretenda implantar, al menos con *Sarcocornia fruticosa* y *Arthrocnemum macrostachyum*, ya que cada especie puede tener un comportamiento diferente en cuanto al vigor que se produce en cada parte de las plántulas para un mismo tratamiento.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

7.1 BIBLIOGRAFÍA

- AHMAD, M., RAJAPAKSHA, A.U., LIM, J.E., ZHANG, M., BOLAN, N., MOHAN, D., VITHANAGE, M., LEE, S.S. & OK, Y.S. (2014). Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review. *Chemosphere*, 99: pp. 19–33.
- ALLOWAY, B.J. (1995b). Chapter 2: Soil process and the behavior of the heavy metals. In: Alloway, B.J. (ed.). *Heavy metals in soils*. Blackie Academic and Professional: pp.11-37.
- ÁLVAREZ-ROGEL, J., TERCERO, MC, CONESA, H., PÁRRAGA-AGUADO, I. & GONZÁLEZ-ALCARAZ, MN. (2018). Biochar from sewage sludge and pruning trees reduced porewater Cd, Pb and Zn concentrations in acidic, but not basic, mine soils under hydric conditions. *Journal of Environmental Management*, 223: pp. 554–565. ISSN: 0269-7491. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.06.055>.
- ANTOSIEWICZ, D.M., ESCUDÉ-DURAN, C., WIERZBOWSKA, E. & SKŁODOWSKA, A. (2008). Indigenous plant species with the potential for the phytoremediation of arsenic and metals contaminated soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 193: pp. 197-210.
- Arthrocnemum macrostachyum* (Moric.) K.Koch. The encyclopedia of succulents. Recuperado de <http://www.llifile.com>
- ATKINSON, C.J., FITZGERALD, J.D. & HIPPS, N.A. (2010). Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: *Plant and Soil*, 337(1–2): pp. 1–18.
- BARCELÓ, J & POSCHENRIEDER, C. (1992). Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. *Suelo y planta*, 2: pp. 345-361.
- BASTA, N.T. & TABATABAI, M.A. (1992). Effect of cropping systems on adsorption of metals by soils: II. Effect of pH. *Soil Science*, 153: pp. 195–204.
- BEESLEY, L., MORENO-JIMÉNEZ, E., GOMEZ-EYLES, J.L., HARRIS, E., ROBINSON, B. & SIZMUR, T. (2011). A review of Biochar's potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils. *Environmental Pollution*, 159 (12): pp. 3269–3282.
- BELMONTE SERRATO, F., ROMERO DÍAZ, A. & MORENO BROTONS, J. (2010). Contaminación ambiental por estériles mineros en un espacio turístico en desarrollo, la Sierra minera de Cartagena-La Unión (Sureste de España). *Universidad de Murcia; Cuadernos de Turismo*, 25; pp. 11-24.
- Biosalinity Awareness Project, Understanding the impact of salinization and implications for future agricultura. Halophytes, What, Why & How? Recuperado de <http://www.biosalinity.org>
- CAÑAVATE, MD. (2017). Comportamiento de las semillas de dos especies halófitas en soluciones acuosas extraídas de residuos mineros: efectos del biochar para mejorar la respuesta germinativa y los primeros estadios del desarrollo de plántulas. Trabajo fin de Grado, ETSIA-UPCT.
- CASHA, A. (2017). *Flora of the Maltese Islands*: pp. 93.

- CASTROVIEJO, S., LAÍNZ, M., LÓPEZ GONZÁLEZ, G. MONTERRAT, P., MUÑOZ GARMENDIA, F., PAIVA, J., VILLAR, L., PEDROL, J. & SORIANO, C. (1990). Flora ibérica 2. *Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid*.
- CHANG-QUAN, W., ZHAO, J.-Q., CHEN, M. & WANG, B.-S. (2006). Identification of betacyanin and effects of environmental factors on its accumulation in halophyte *Suaeda salsa*. *J. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 32: pp. 195–201.
- CHEN, Z.S., LEE, G.J. & LIU, J.C. (2000). The effects of chemical remediation treatments on the extractability and speciation of cadmium and lead in contaminated soils. *Chemosphere*, 41: pp. 235-242.
- CHERIAN, S. & OLIVEIRA, M. (2005). Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environmental Science & Technology*, 39: pp. 9377-9390.
- CHO, C., YAVUZ-CORAPCIOGLU, M., PARK, S. & SUNG, K. (2008). Effects of Grasses on the Fate of VOCs in Contaminated Soil and Air. *Water, Air, & Soil Pollution*, 187: pp. 243-250.
- CONESA, H.M., FAZ, A. & ARNALDOS, R. (2006). Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailings of the semiarid Cartagena–La Unión mining district (SE Spain). *Science of the Total Environment*, 366: pp. 1-11.
- CONESA, H.M. & FAZ, A. (2009). Advances in geoecology, ed. A. Faz-Cano, A. R. Mermut, J. M. Arocena and R. Ortiz, Catela-Verlag, Germany, Vol. 40: pp. 287–294.
- CONESA, H.M., GARCÍA, G., FAZ, A. & ARNALDOS, R. (2007). Dynamics of metal tolerant plant communities development in mine tailings from the Cartagena-La Unión Mining District (SE Spain) and their interest for further revegetation purposes. *Chemosphere*, 68: pp. 1180-1185.
- CONESA, H.M. & SCHULIN, R. (2010). The Cartagena–La Unión mining district (SE Spain): a review of environmental problems and emerging phytoremediation solutions after fifteen years research. *Journal of Environmental Monitoring*, 12: pp. 1225-1233.
- DEEM, L.M. & CROW, S.E. (2017). Biochar.
- DING, Y., LIU, Y., LIU, S., LI, Z., TAN, X., HUANG, X., ZENG, G., ZHOU, L. & ZHENG, B. (2016). Biochar to improve soil fertility. *Agronomy for Sustainable Development*, 36 (2): pp. 36.
- DOMÍNGUEZ, M.T., MADRID, F., MARAÑÓN, T. & MURILLO, J.M. (2009). Cadmium availability in soil and retention in oak roots: potential for phytostabilization. *Chemosphere*, 76: pp. 480-486.
- DUARTE, B., CAÇADOR, I. & SLEIMI, N. (2014). Biophysical and biochemical constraints imposed by salt stress: Learning from halophyte. *Frontiers in Plant Science*.
- EAPEN, S., SINGH, S. & D'SOUZA, S. F. (2007). Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. *Biotechnology Advances*, 25: pp. 442-451.
- EC (European Commission) (2002). Guide to Cost-Benefit analysis of investment projects. Evaluation Unit DG Regional Policy European Commission. Structural Fund-ERDF, Cohesion Fund and ISPA.
- ESTEVAN SENÍS, M.T. La explotación minera de La Sierra de Cartagena: pp. 1840-1919.

- ESTEVAN SENÍS, M.T. (1966): “La minería cartagenera, 1840-1919. Aspectos económicos y sociales”. *Hispania*, 101: pp. 61-95.
- FAZ, A., CARMONA, D.M., ZANUZZI, A. AND MERMUT, A.R. (2008). *The Scientific World Journal*, 8: pp. 819–827.
- FLOWERS, T.J. & COLMER, T.D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol*, 179: pp. 945–963.
- FLOWERS, T.J., TROKE, P.F. & YEO, A.R. (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 28: pp. 89–121.
- GARCÍA GARCÍA, C. (2004). Impacto y Riesgo Ambiental de los Residuos Minero-metalúrgicos de La Sierra de Cartagena-La Unión (Murcia-España). Tesis doctoral UPCT.
- GLENN E.P., BROWN J.J & BLUMWALD E. (1999). Salt tolerance and crop potencial of halophytes. *Journal of Critical Reviews in Plant Sciences*, 18: pp. 227-255.
- GREENWAY, H. & MUNNS R (1980). Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 31: 149–190.
- GRIGORE M.N. & TOMA C. (2017). Anatomical adaptations of halophytes: A review of classic literature and recent findings.
- GUILLÉN, J.N., ABUD, Y.C., MADRIGAL, F.H. & TRUJILLO, M.M. (2008). Efecto de níquel, plomo y zinc, en el desarrollo de la raíz de *Nicotiana tabacum* L. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 10: pp. 39–48.
- HIGASHIKAWA, F.S., CONZ, R.F., COLZATO, M., CERRI, C.E.P. & ALLEONI, L.R.F. (2016). Effects of feedstock type and slow pyrolysis temperature in the production of biochars on the removal of cadmium and nickel from water. *Journal of Cleaner Production*, 137: pp. 965–972.
- INYANG, M.I., GAO, B., YAO, Y., XUE, Y., ZIMMERMAN, A., MOSA, A., PULLAMMANAPPALLIL, P., OK, Y.S. & CAO, X. (2016). A review of biochar as a low-cost adsorbent for aqueous heavy metal removal. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46 (4): pp. 406–433.
- KABATA-PENDIAS, A. (2000). Trace elements in soils and plants. Third Edition. CRC Press, Inc. Boca Raton. USA: pp. 365-413.
- KABATA-PENDIAS, A. & PENDIAS, H. (1992). Trace Elements in Soils and Plants, CRC Press, New York.
- KARHU, K., MATTILA, T., BERGSTROM, I. & REGINA, K. (2011). Biochar addition to agricultural soil increased CH₄ uptake and water holding capacity—Results from a short-term pilot field study. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 140 (1–2): pp. 309–313.
- KELLEY, C., GAITHER, K.K., BACA-SPRY, A. & CRUICKSHANK, B.J. (2000). Incorporation of phytoremediation strategies into the introductory chemistry laboratory. *Chem Educator*, 5: pp. 140-143.
- LEHMANN, J. (2007a). A handful of carbon. *Nature*, 447 (7141): pp. 143–144.
- LEHMANN, J., GAUNT, J. & RONDON, M. (2006). Bio-char sequestration in terrestrial ecosystems: A review. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 11 (2): pp. 395–419.

- LEHMANN J., MATTHIAS C. RILLIG, JANICE THIES, CAROLINE A. MASIELLO, WILLIAM C. HOCKADAY & DAVID CROWLEY. (2011). Biochar effects on soil biota- a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 43: pp. 1812-1836.
- LEON, V.M. & J.M. BELLIDO (2016). Mar Menor: una laguna singular y sensible. Evaluación científica de su estado. *Temas de Oceanografía*, 9: 255-256.
- LERDA, D. 1992. The effect of lead on *Allium cepa* L. *Mutation Research*, 281: pp. 89-92.
- LI, H. B., XIAO, L., EVANDRO, B. ET AL. (2017). Mechanisms of metal sorption by biochars: Biochar characteristics and modifications. *Chemosphere*, 178: pp. 466-478.
- LIETH, H., M. MOSCHENKO, M. LOHMANN, H.-W. KOYRO & A. HAMDT (1999). Halophyte uses in different climates I. Leiden, Germany: Backhuys Publishers
- LÓPEZ GONZÁLEZ, G.A (2007). Guía de los árboles y arbustos de la Península Ibérica y Baleares (especies silvestres y las cultivadas más comunes): pp. 662-663.
- MANYA, J.J. (2012). Pyrolysis for biochar purposes: A review to establish current knowledge gaps and research needs. *Environmental Science & Technology*, 46(15): pp. 7939–7954.
- MARTOS MIRALLES, P. (2007). Patrimonio Cultural y Yacimientos de Empleo en La Sierra Minera de Cartagena-La Unión. 2ª Edición. Fundación Sierra minera. La Unión.
- MCBRIDE, M.B., SAUVE, S. & HENDERSHOT, W. (1997). Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *European Journal of Soil Science*, 48: pp. 337– 346.
- MÉNDEZ, M.O. & MAIER, R.M. (2008). Phytoestabilisation of mine tailings in arid and semiarid environments: an emerging remediation technology. *Environmental Health Perspective*, 116: pp. 278-283.
- MIRETZKY, P., SARALEGUI, A. & FERNÁNDEZ-CIRELLI, A. (2004). Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals. *Chemosphere*, 57: pp. 997-1005.
- MORREY, D.R., BALKWILL, K., BALKWILL, M.J. & WILLIAMSON, S. (1992). A review of some studies of the serpentine flora of South Africa. A.J.M. Baker, J. Proctor and R.D. Reeves (eds.), *The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils*: pp. 147-157.
- NAVARRO DE LA TORRE, S. (2017). *Arthrocnemum macrostachyum* y su microbioma como herramienta para la recuperación de suelos degradados. Tesis doctoral Universidad de Sevilla.
- PÁRRAGA-AGUADO, I., GONZÁLEZ-ALCARAZ, M.N., ÁLVAREZ-ROGEL, J. & CONESA, H.M. (2014). Assessment of the employment of halophyte plant species for the phytomanagement of mine tailings in semiarid areas. *Ecological Engineering*, 71: pp. 598-604.
- PRASAD, M.N.V. (2004). Phytoremediation of metals and radionuclides in the environment: the case for natural hyperaccumulators, metal transporters, soil-amending chelators and transgenic plants. *Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems*, Second Edition, pp: 345-391.
- PRIETO, J., GONZÁLEZ, C., ROMÁN, A. & PRIETO, F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10: pp. 29-44.

- Proyecto Araar, (2009). El paisaje vegetal de Cartagena, fruto de un largo proceso de degradación. Recuperado de <http://www.asociacionanse.org>
- REESA, F., SIMONNOTB, J. & MORELA, L. (2014). Short-term effects of biochar on soil heavy metal mobility are controlled by intra-particle diffusion and soil pH increase. *European Journal of Soil Science*, 65 (1): pp. 149-161.
- RIECHMAN, M.S. (2002). The responses of plants to metals toxicity: A review focusing on copper, manganese and cinc. *Australian Minerals and Energy Environment Foundation*, 54.
- RIEUWERTS, J.S., AUSTIN, S. & HARRIS, E.A. (2009). Contamination from historic metal mines and the need for non-invasive remediation techniques: a case study from Southwest England. *Environmental Monitoring and Assessement*, 148: pp. 149-158.
- RIEUWERTS, J.S., THONTON, I., FARAGO, M.E & ASHMORE, M.R. (1998). Factors influencing metals bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 10(2): pp. 61- 75.
- ROBINSON, B.H., BAÑUELOS, G., CONESA, H.M., EVANGELOU, M.W.H. & SCHULIN, R. (2009). The phytomanagement of trace elements in soil. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 28: pp. 240-266.
- SCHNELL, R.W., VIETOR, D.M., PROVIN, T.L., MUNSTER, C.L. & CAPAREDA, S. (2012). Capacity of biochar application to maintain energy crop productivity: Soil chemistry, sorghum growth, and runoff water quality effects. *Journal of Environmental Quality*, 41 (4): pp. 1044.
- SILVEIRA, M.L.A., L.R.G. ALLEN & L.R.G. GUILHERME (2003). Biosolids and heavy metals in soils. *Scientia Agricola*, 60 (4): pp. 793-806.
- SIMÓN, M., GARCÍA, I., DIEZ-ORTIZ, M. & GONZÁLEZ, V. (2018). Biochar from Different Carbonaceous Waste Materials: Ecotoxicity and Effectiveness in the Sorption of Metal(loid)s. *Water Air Soil Pollut.*, 229: pp. 224. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3860-8>
- VILAR, J.B & EGEA BRUNO, P.M. Minería y ecología en la Sierra de Cartagena-La Unión.
- WAISEL Y. (1972). Biology of halophytes.
- WANG, S., XU, Y., NORBU, N. & WANG, Z. (2017). Remediation of biochar on heavy metal polluted soils. *Earth and Environmental Science*, 108.
- WANG, W. (1991). Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water Air Soil Pollution*, 59: pp. 381-400.
- XU, G., LV, Y., SUN, J., SHAO, H. & WEI, L. (2012). Recent advances in biochar applications in agricultural soils: Benefits and environmental implications. *Clean: Soil, Air, Water*, 40 (10): pp. 1093–1098.
- ZHANG, X., WANG, H., HE, L., LU, K., SARMAH, A., LI, J., BOLAN, N.S., PEI, J. & HUANG, H. (2013). Using biochar for remediation of soils contaminated with heavy metals and organic pollutants. *Environmental Science and Pollution Research*, 20 (12): pp. 8472–8483.