

Evaluación de la capacidad fitorremediadora de una especie nativa sudamericana (*Discaria americana*) en un suelo enmendado con lodos de depuradora

Autora: Silvana Irene Torri

Tesis doctoral UDC / Año 2021

Director: Marcos Lado Liñares

Programa de Doctorado en Investigación Agraria y Forestal



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Programa Oficial de Doctorado en Investigación Agraria y Forestal

Tesis Doctoral

Evaluación de la capacidad fitorremediadora de una especie nativa sudamericana (*Discaria americana*) en un suelo enmendado con lodos de depuradora

Silvana Irene Torri

Julio 202

*A mi familia,
mi logro máspreciado,
a mis hijos Sol, Ariel, Hernán y Lautaro
y a mi esposo Jorge, por alentarme constantemente.*

*A mis padres,
por inculcarme el amor al estudio.*

AGRADECIMIENTOS

A mi director, Marcos Lado Liñares, por la minuciosa lectura y aportes al manuscrito.

A Antonio Paz González, por su constante presencia a lo largo de esta etapa, facilitándome todos los trámites relacionados con la presentación de esta Tesis.

A Martha Cusato, por su generosidad en proveerme material botánico y conocimiento de la *Discaria americana*.

A María Mabel Puelles, por haberse interesado siempre en mis líneas de investigación, y haber colaborado en cada ocasión con mucho entusiasmo. ¡Gracias por tantas determinaciones!

A mi becario Pierre Davadant, a los tesisistas de grado Franco Cosentino, María Julia Santoro, Mariana Valdez y Ian Muller, por su invaluable ayuda y entusiasmo durante las tareas de conducción y mantenimiento de los ensayos, y posteriores determinaciones.

A la Universidad de Buenos Aires, que financió parcialmente esta Tesis.

Y por supuesto, a mi familia, por ser mi apoyo constante, y lo más lindo que me regaló la vida.

RESUMEN

Los lodos o biosólidos son residuos orgánicos de origen biológico, que se originan en los procesos de depuración de los efluentes domiciliarios. Su correcta gestión es, en la actualidad, uno de los mayores desafíos en el marco del desarrollo sustentable de las grandes ciudades. Desde el punto de vista ecológico y económico, el aprovechamiento agrícola de biosólidos es uno de los destinos más aceptables, pero pueden presentar concentraciones variables de ciertos elementos traza (ET) potencialmente tóxicos, que reaccionan con los componentes del suelo, distribuyéndose entre fracciones con distinta disponibilidad. El objetivo general de este trabajo fue determinar la capacidad fitorremediadora de Cu y Zn que presenta una especie nativa sudamericana, la *Discaria americana*, en un Hapludol típico de textura arenosa enmendado con biosólido (SB) o biosólido enriquecido con sus propias cenizas (SZ). Se analizó el efecto de dosis crecientes de B o Z sobre parámetros de germinación de *D. americana* comparado con raigrás (*Lolium perenne* L.), sin observarse efectos fitotóxicos en ninguna de las dos especies. Al evaluar la influencia de la actividad radical de la *D. americana* y del raigrás sobre la distribución de Cu y Zn entre las distintas fracciones edáficas en un suelo de textura arenosa enmendado con biosólidos o biosólido enriquecido con sus propias cenizas, se observó una redistribución de ambos elementos al cabo de 180 días. La actividad radical de ambas especies favoreció el pasaje de ambos elementos a formas de menor biodisponibilidad, estrechamente relacionado con el pH edáfico. La *D. americana* presentó síntomas de fitotoxicidad en SB entre los días 120-130, presentando una elevada concentración de Cu tanto en biomasa aérea como radical. Estos resultados pueden estar relacionados con las elevadas dosis de enmienda utilizada. Dichos síntomas no se manifestaron en SZ, evidenciando que la matriz inorgánica de los biosólidos fue capaz de retener ET en formas de menor biodisponibilidad. En relación al Zn, la *D. americana* se comportó como especie excluyente.

RESUMO

Os lodos ou biosólidos son residuos orgánicos de orixe biolóxica, orixinados nos procesos de depuración dos efluentes domiciliarios. A súa correcta xestión é, na actualidade, un dos maiores desafíos no marco do desenvolvemento sostible das grandes cidades. Dende o punto de vista ecolóxico e económico, o aproveitamento agrícola dos biosólidos é un dos destinos máis aceptables, pero poden presentar concentracións variables de certos elementos traza (ET) potencialmente tóxicos, que reaccionan cos compoñentes do solo, distribuíndose entre fraccións con distinta dispoñibilidade. O obxectivo xeral deste traballo foi determinar a capacidade fitorremediadora de Cu e Zn que presenta unha especie nativa sudamericana, a *Discaria americana*, nun Hapludol típico de textura areosa enmendado con biosólido (SB) ou biosólido enriquecido coas súas propias cinzas (SZ). Analizouse o efecto de doses crecentes de B ou Z sobre parámetros de xerminación de *D. americana* comparado co raigrás (*Lolium perenne* L.), sen observarse efectos fitotóxicos en ningunha das dúas especies. Ó evaluar a influencia da actividade radical da *D. americana* e do raigrás sobre a distribución de Cu e Zn entre as distintas fraccións edáficas nun solo de textura areosa enmendado con biosólidos ou biosólido enriquecido coas súas propias cinzas, observouse unha redistribución de ambos elementos ó cabo de 180 días. A actividade radical de ambas especies favoreceu a pasaxe de ambos elementos a formas de menor biodispoñibilidade, estreitamente relacionada co pH edáfico. A *D. americana* presentou síntomas de fitotoxicidade en SB entre os días 120-130, presentando unha elevada concentración de Cu tanto en biomasa aérea como radical. Estes resultados poden estar relacionados coas elevadas doses de enmenda utilizada. Estes síntomas non se manifestaron en SZ, evidenciando que a matriz inorgánica dos biosólidos foi quen de reter ET en formas de menor biodispoñibilidade. En relación ó Zn, a *D. americana* comportouse como especie exclusora.

SUMMARY

Biosolids are an organic waste of biological origin, produced in domestic wastewater treatment plants. At present, their correct management is one of the biggest challenges in the framework of the sustainable development of big cities. Its agricultural use is one of their most accepted fates from an ecological and economic point of view. However, they may have varying concentrations of certain potentially-toxic trace elements (TE), which react with the soil components, being distributed within fractions with different bioavailability. The general objective of this work was to determine the phytoremediation capacity of Cu and Zn of a South American native species, the American Discaria (*Discaria americana*), in a typic Hapludol with sandy texture amended with biosolids (SB) or biosolids enriched with their own ashes (SZ). The effect of increasing doses of B or Z on germination parameters of *D. americana* compared with ryegrass (*Lolium perenne* L.) was analysed, without observing phytotoxic effects in either of the two species. After 180 days, a redistribution of Cu and Zn between the different edaphic fractions in a sandy soil amended with biosolids or biosolid enriched with its own ashes as a result of the radical activity of *D. americana* and ryegrass was observed. The radical activity of both species favoured the passage of both elements to lower bioavailability forms, closely related to soil pH. Between days 120-130, *D. americana* presented symptoms of phytotoxicity in SB, and a high concentration of Cu in both aerial and radical biomass. These results may be related to the high dose of amendment used. These symptoms did not manifest in SZ, indicating that biosolids' inorganic matrix was capable of retaining ET in less bioavailable forms. *D. Americana* behaved as an exclusion species for Zn.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Residuos	1
1.2 Los elementos traza y los agroecosistemas	4
1.3 El suelo, un recurso no renovable	6
1.4 Aprovechamiento agrícola de biosólidos	8
CAPÍTULO II	13
POTENTIAL OF <i>DISCARIA AMERICANA</i> FOR TRACE ELEMENT STABILIZATION IN BIOSOLDS-AMENDED SOILS	13
2.1 Introduction	13
2. 2 Materials and Methods	16
Soils, biosolids and ash-spiked biosolids characterization	16
Amendments	16
Seed germination test	17
Analytical procedure	18
Statistical analysis	18
2.3 Results and Discussion	19
Phytotoxicity assays	24
2.4. Conclusions	27
CAPÍTULO III	29
INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD RADICAL DE LA <i>DISCARIA AMERICANA</i> Y DEL RAIGRÁS (<i>LOLIUM PERENNE</i> L.) SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE CU Y ZN ENTRE LAS DISTINTAS FRACCIONES EDÁFICAS	29
3.1 Introducción	29
Factores del suelo que afectan la disponibilidad de los elementos traza.	31
Formas analíticas de evaluar la disponibilidad de elementos traza	36
3.2 Materiales y Métodos	38
Suelos y enmiendas	38
Especies vegetales	40
Ensayo	40
Determinaciones	42
Análisis estadístico	45

3.3 Resultados y Discusión	46
pH	51
Conductividad Eléctrica (CE)	59
Distribución de Cu entre diferentes fracciones del suelo	62
Distribución de Zn entre diferentes fracciones del suelo	77
3.4 Conclusiones	90
CAPÍTULO IV	92
4.1 Introducción	92
4.2 Materiales y Métodos	97
Muestreo de biomasa	97
Determinaciones	98
Análisis estadístico	98
4.3 Resultados y Discusión	99
Biomasa aérea	99
Concentración de Cu en biomasa vegetal	105
Concentración de Zn en biomasa vegetal.	109
4.4 Conclusiones	112
CAPÍTULO V	114
CONSIDERACIONES FINALES	114
CAPITULO VI	117
REFERENCIAS	117
ANEXO	147

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Composición típica de las excretas provenientes de caballo, pollo y vaca comparada con los biosólidos

Tabla 1.2: Concentración promedio (mg kg^{-1}) de elementos traza inorgánicos presentes en biosólidos, normativa nacional e internacional.

Table 2.1: Selected properties (mean values, $n=4$) of the Typic Hapludoll, pure biosolids (B) and ash-spiked biosolids (AB).

Table 2.2: Cu and Zn mean concentrations in control soils and soil-amendment mixtures, and chemical characterization of 1:2.5 extracts from control soils and soils amended with increasing doses of biosolids (BS) or ash-spiked biosolids (ABS). Different letters in the same column indicate significant differences at the 0.05 probability level ($n = 4$).

Table 2.3: Multiple linear regression coefficients for soluble Cu and Zn in the extracts of substrates under assessment: BS: soil amended with biosolids ($n=4$ per treatment, 16 samples), ABS: soil amended with ash-spiked biosolids ($n=4$ per treatment, 24 samples).

Table 2.4: Percentages of relative seed germination (RSG), relative root growth (RRG) and germination index (GI) of ryegrass (*Lolium perenne* L.) and discaria (*Discaria Americana*). Different letters in the same column indicate significant differences at the 0.05 probability level based on Tukey test.

Tabla 3.1: Relación entre la forma de retención en el suelo y la disponibilidad relativa de elementos traza para las plantas

Tabla 3.2: Características analíticas y contenido total de elementos traza en el Hapludol típico, biosólido puro (B) y el biosólido adicionado con 30 % de sus propias cenizas (Z). Los datos presentados corresponden a la media de tres muestras compuestas.

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Vista aérea de **A.** Planta de pretratamiento, ubicada en la localidad de Berazategui, **B.** planta Depuradora Norte, ubicada en San Fernando, Buenos Aires, Argentina. 3
- Figura 1.2.** Ciclo de los elementos traza en los suelos
- Figura 3.2:** Esquema de adsorción no específica y específica de un elemento traza catiónico (M) sobre la materia orgánica edáfica. 33
- Figura 3.3:** Diagrama de difracción de rayos X (XRD) para el suelo Hapludol típico (A), biosólido (B) y los biosólidos + 30% de sus propias cenizas (C) en muestras de polvo aleatoriamente orientados. 47
- Figura 3.4:** Micrográficas de microscopio electrónico de barrido (SEM) de las muestras de biosólidos (A) y de cenizas de biosólidos (B) con magnificación de 318X y 640X respectivamente. 48
- Figura 3.5:** Espectros EDS de las muestras biosólidos (A) y cenizas (B), provenientes del barrido de un haz de electrones en su superficie. 49
- Figura 3.6:** Variación del pH en un Hapludol Típico. A, al finalizar el periodo de estabilización (45 días); B, al finalizar el ensayo (180 días) 53
- Figura 3.7:** Variación en la CE de un Hapludol Típico. A, al finalizar el periodo de estabilización (45 días); B, al finalizar el ensayo (180 días). Tratamientos: ST, suelo testigo; SB, suelo enmendado con biosólidos; SZ, suelo enmendado con biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas. 60
- Figura 3.8:** Concentración de Cu en las fracciones intercambiable (Cu-INT), orgánica (Cu-MO), precipitados inorgánicos (Cu-INOR) y residual (Cu-RES) en Hapludol típico en condiciones prístinas, enmendado con biosólido (B) o biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas (Z) en día 1. 64
- Figura 3.9:** Concentración de Cu en las fracciones intercambiable (Cu-INT), orgánica (Cu-MO), precipitados inorgánicos (Cu-INOR) y residual (Cu-RES) en Hapludol típico en condiciones prístinas, enmendado con biosólido (B) o biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas (Z) en día 45. 66

- Figura 3.10:** Esquema de posibles configuraciones de enlace en complejos húmico-arcilloso (goetita): complejo de esfera interna entre Cu (II) y goetita, y complejos ternarios de tipo A y B. Adaptado de Alcacio et al. (2001). 69
- Figura 3.11:** Concentración de Cu en la fracción orgánica (Cu-MO) a los 180 días de iniciado el ensayo. Tratamientos: ST, suelo testigo; SB, suelo enmendado con biosólidos; SZ, suelo enmendado con biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas; P1, raigrás; P2, *Discaria americana*. 73
- Figura 3.12:** Relación entre formas orgánicas de Cu (Cu-MO) y pH en un Hapludol típico a los 180 días de la incorporación de ambas enmiendas, biosólidos o biosólidos más 30% de sus propias cenizas. 74
- Figura 3.13:** Concentración de Cu en la fracción inorgánica (Cu-INOR) a los 180 días de iniciado el ensayo. Tratamientos: ST, suelo testigo; SB, suelo enmendado con biosólidos; SZ, suelo enmendado con biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas; P1, raigrás; P2, *Discaria americana*. 75
- Figura 3.14:** Relación entre formas inorgánicas de Cu (Cu-INOR) y pH en un Hapludol típico a los 180 días de la incorporación de ambas enmiendas, biosólidos o biosólidos más 30% de sus propias cenizas. 77
- Figura 3.15:** Concentración de Zn en las fracciones intercambiable (Cu-INT), orgánica (Cu-MO), precipitados inorgánicos (Cu-INOR) y residual (Cu-RES) en Hapludol típico en condiciones prístinas, enmendado con biosólido (B) o biosólidos adicionados con 30 % de sus propias cenizas (Z) en día 1. 78
- Figura 3.16:** distribución de Zn entre las fracciones intercambiable (Zn-INT), orgánica (Zn-MO) y precipitados inorgánicos (Zn-INOR) en todos los tratamientos al finalizar el periodo de estabilización (45 días). 81
- Figura 3.17:** Relación entre formas orgánicas de Zn (Zn-MO) y pH en un Hapludol típico a los 45 días de la incorporación de ambas enmiendas, biosólidos o biosólidos más 30% de sus propias cenizas. 82

Figura 3.18: Relación entre formas inorgánicas de Zn (Zn-INOR) y pH en un Hapludol típico a los 45 días de la incorporación de ambas enmiendas, biosólidos o biosólidos más 30% de sus propias cenizas	84
Figura 3.19: Concentración de Zn en la fracción intercambiable (Zn-INT) a los 180 días de iniciado el ensayo.	
Figura 3.20: Concentración de Zn en la fracción orgánica (Zn-MO) a los 180 días de iniciado el ensayo.	87
Figura 3.21: Concentración de Zn en la fracción inorgánica (Zn-INOR) a los 180 días de iniciado el ensayo.	88
Figura 3.22: Relación entre formas inorgánicas precipitadas de Zn (Zn-INOR) y pH en los suelos enmendados a los 180 días de la incorporación de ambas enmiendas, biosólidos o biosólidos más 30% de sus propias cenizas.	89
Figura 4.1: Modelo conceptual de los tres principales mecanismos que presentan las especies vegetales frente a un aumento de ET en los suelos.	93
Figura 4.2: Biomasa aérea de raigrás (base seca, g) en los cortes efectuados los días 105, 140 y 180.	101
Figura 4.3: Producción total de BMA (base seca) en cada tratamiento: suelo testigo (ST), suelo enmendado con biosólido (SB), suelo enmendado con biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas (SZ).	102
Figura 4.4: Biomasa aérea y radical de <i>Discaria americana</i> (base seca, g).	103
Figura 4.5: Concentración de Cu total en biomasa aérea de raigrás en los cortes efectuados los días 105, 140 y 180 en el suelo Hapludol típico.	106
Figura 4.6: Concentración de Cu total en biomasa aérea (BMA) y biomasa radical (BMR) de <i>Discaria americana</i> cultivada en el suelo Hapludol típico..	108
Figura 4.7: Concentración de Zn total en biomasa aérea de raigrás en los cortes efectuados los días 105, 140 y 180 en el suelo Hapludol típico.	110
Figura 4.8: Concentración de Zn total en biomasa aérea y radical de <i>Discaria americana</i> cultivada en el suelo Hapludol típico.	111

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Residuos

El manejo sustentable de residuos adquirió una destacada importancia en los últimos años a nivel mundial (Carvalho *et al.*, 2012; Mirdar Harijani *et al.*, 2017). La acumulación incontrolada de residuos de distinto origen es una problemática urbana y pecuaria, que no solo constituye un problema de disposición, sino que puede provocar problemas en el medio ambiente al favorecer la existencia y propagación de vectores, a la vez de producir contaminación de suelos, aire y cuerpos de agua (Rangel, 2011; Singh *et al.*, 2018).

El término residuo se aplica a todo aquel material generado por las actividades de producción y consumo, que no presenta ningún valor económico en las condiciones particulares de tiempo y lugar en el que se han producido, y que es preciso recoger y tratar por razones de salud o de contaminación ambiental para evitar ocupaciones innecesarias de espacio o, simplemente, por motivaciones estéticas (Pírez y Gamallo, 1994). Esta definición hace un claro énfasis en su falta de valor económico. Sin embargo, los residuos pueden considerarse desde dos ópticas diferentes: como desechos que deben ser eliminados ó como fuente de materiales potencialmente reciclables. La tendencia mundial es considerar a los residuos como un recurso del que se pueden extraer materiales para el reciclado o para obtener energía. En los últimos años, los países más desarrollados impulsaron nuevas tecnologías y procesos que transformen los residuos en materia prima secundaria o nuevos productos en vez de ser enterrados en rellenos sanitarios.

Los residuos urbanos son aquellos residuos que se generan debido a las actividades desarrolladas en los núcleos urbanos o en sus zonas de influencia. Entre los residuos

urbanos se encuentran los efluentes domiciliarios, que están constituidos por una mezcla variada de sustancias y microorganismos que provienen de los sanitarios, piletas de cocina, y lavarropas, entre otros. Alrededor del 10% de los efluentes domiciliarios es tratado en plantas depuradoras. El resto es vertido a cuerpos de agua sin tratamiento previo, originando su contaminación.

Los efluentes domiciliarios generados en el Área Metropolitana de Buenos Aires (AMBA), compuesto por la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y el Gran Buenos Aires, Argentina, confluyen a la Planta de Pretratamiento ubicada en la localidad de Berazategui y a la planta depuradora ubicada en San Fernando, provincia de Buenos Aires (Figura 1.1).

La mayoría de los procesos de depuración de efluentes producen partículas sólidas sedimentables y decantables, constituidas por minerales inertes y materia orgánica (lábil y estable) sobre los que se adsorben sales minerales y algunos patógenos (bacterias, parásitos, etc.) presentes en los efluentes (Wang *et al.*, 2021). Estas partículas se separan del agua y forman un lodo biológicamente inestable, con alto contenido de humedad, denominado barro. La estabilización de los barros mediante procesos físicos, químicos o biológicos y/o higienización genera un subproducto orgánico denominado biosólidos. La creciente producción de estos residuos orgánicos presenta una especial relevancia tanto por su volumen como por la incomodidad y dificultad de su manejo.

Como principal característica, los biosólidos presentan una elevada concentración de materia orgánica estable (Torri *et al.*, 2003), macro y micronutrientes (Sharma *et al.*, 2017; Athamenh *et al.*, 2018; Torri *et al.*, 2017) en concentraciones muchas veces superiores a los tradicionales abonos orgánicos (Wang, 1997). La búsqueda de un destino sustentable para estos residuos representa hoy un importante desafío ecológico a nivel mundial.



A



B

Figura 1.1: Vista aérea de **A.** Planta de pretratamiento, ubicada en la localidad de Berazategui, **B.** planta Depuradora Norte, ubicada en San Fernando, Buenos Aires, Argentina.

Es esperable que, como en el resto del mundo, el número de plantas depuradoras y de domicilios conectados a la red cloacal se incremente en la Argentina en un futuro cercano. Debido a que los volúmenes de biosólidos se incrementarán con el aumento poblacional atendido por redes cloacales, la incineración sería un método alternativo de tratamiento, siendo su característica principal la reducción de volumen y la obtención de energía

(Wang, 1997). Sin embargo, el residuo inorgánico obtenido no es apropiado para ser aplicado directamente a sistemas agrícolas. Numerosos trabajos revelaron ciertas desventajas que surgen del uso de cenizas puras como enmiendas. La más comúnmente citada es la toxicidad salina, ya que en el residuo se concentran elementos traza y halógenos (Bache y Lisk, 1990; Carlson y Adriano, 1993, Kelessidis y Stasinakis, 2012) y se pierden los beneficios aportados por la materia orgánica.

Una alternativa de uso agrícola de estas cenizas sería su mezcla con biosólidos. La matriz del biosólido actúa como una superficie adsorbente de los elementos traza en los suelos que han sido adicionados con dicha enmienda (Corey *et al.*, 1987; Hooda y Alloway, 1993; Torri, 2001), reteniendo estos elementos en formas de baja biodisponibilidad (Torri y Lavado, 2008 a y b). Cabe destacar que la incineración de biosólidos sólo se realiza en Argentina con fines científicos.

1.2 Los elementos traza y los agroecosistemas

Los elementos traza (ET) se definen como aquellos elementos que se encuentran en baja concentración en la naturaleza, en general, y en los tejidos vegetales, en particular, usualmente en concentraciones inferiores a 100 mg kg⁻¹ (Hooda, 2010; Kabata-Pendias, 2011). Según su actividad biológica, los elementos traza se pueden dividir en esenciales y no esenciales.

Los micronutrientes son elementos traza esenciales para el crecimiento y la reproducción. Hasta el momento, se ha demostrado la esencialidad de ocho micronutrientes en todas las especies vegetales: boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni) y cinc (Zn) (Torri *et al.*, 2005). Existen otros elementos traza que actúan en el metabolismo vegetal de manera no específica, denominados nutrientes funcionales debido a que no intervienen en reacciones bioquímicas conocidas. Entre ellos se puede mencionar el cadmio (Cd), plomo (Pb), silicio (Si) y vanadio (V). Otros elementos traza, como sodio (Na) o silicio (Si), únicamente cumplen funciones en ciertas especies vegetales, mientras que otros ET son esenciales para los animales, como el cobalto (Co), iodo (I), Mo y selenio (Se). Por otro lado, elementos como arsénico (As), bismuto (Bi), Cd,

Cu, cromo (Cr), estaño (Sn), mercurio (Hg), Pb y Zn, entre otros, son tóxicos para los vegetales y los animales cuando se encuentran por encima de determinados niveles (Torri *et al.*, 2015).

El contenido total de elementos traza en los suelos prístinos depende de la naturaleza de los procesos geoquímicos, de las características del material parental y su pedogenénesis (Adriano, 2001). Existe asimismo un ingreso neto de elementos traza al sistema suelo-planta a través de diversos procesos naturales (emisiones volcánicas, aerosoles marinos, deposición de polvo atmosférico) o antropogénicos (fertilización, aplicación de abonos orgánicos, productos fitosanitarios, residuos y vertidos industriales, contaminación industrial, minera y urbana, entre otros). Cuando el origen de los ET es antropogénico, el principal problema es su acumulación en los primeros cm de profundidad de los suelos, donde las interacciones con las raíces de las especies vegetales son máximas.

Cuando los elementos traza ingresan al suelo, sufren una serie de reacciones, básicamente disolución/precipitación, adsorción/desorción, complejación, e inclusión en minerales a través de la formación de soluciones sólidas, que determinan su distribución entre los diversos compartimentos edáficos (Parkpain *et al.*, 1998; Madrid, 1999). A su vez, ciertas propiedades del suelo como el pH, la textura y el contenido y calidad de la materia orgánica son factores que determinan las formas y la biodisponibilidad de estos elementos en los suelos (Alloway, 1995; Weng *et al.*, 2001). Las formas químicas de los ET en el material incorporado también pueden determinar su destino en los suelos (Luo y Christie, 1998). En la Figura 1.2 se presenta el ciclo de los elementos traza en los suelos.

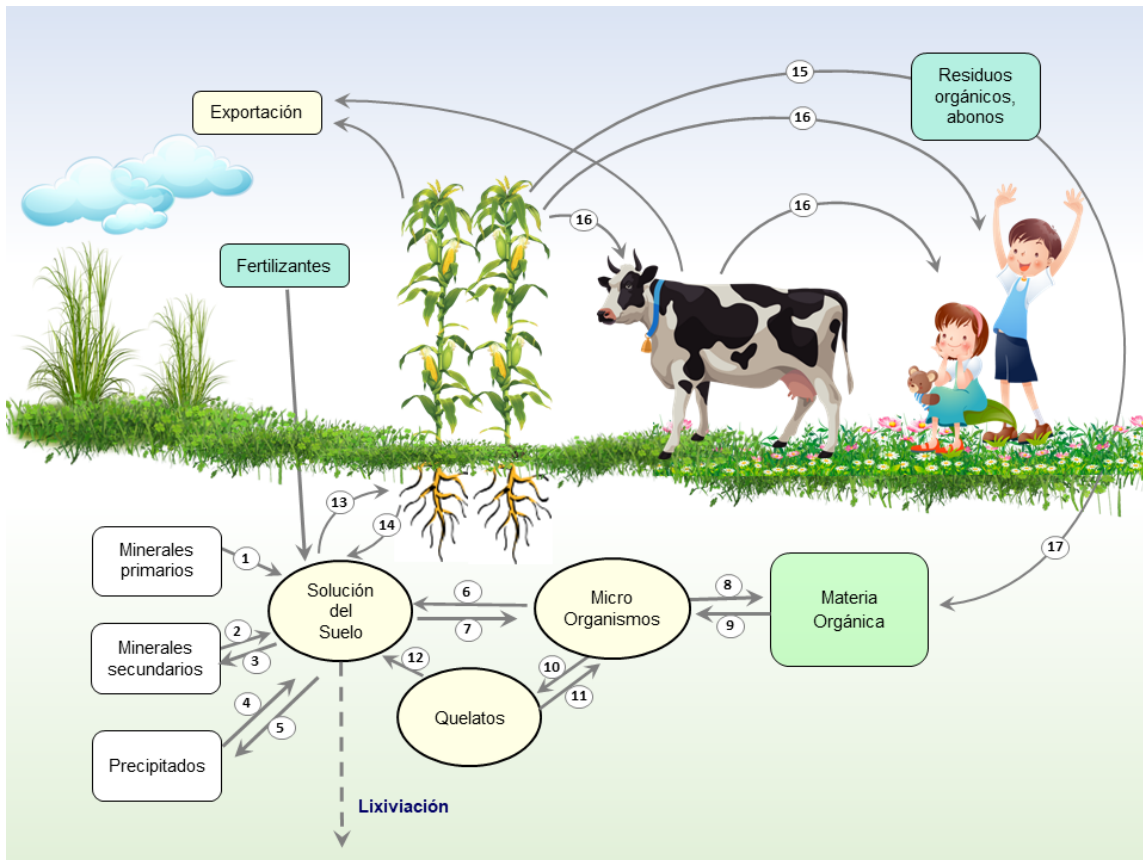


Figura 1.2. Ciclo de los elementos traza en los suelos (adaptado de Torri *et al.*, 2015). Procesos: 1- meteorización, 2- desorción, 3- adsorción, 4- disolución, 5- precipitación, 6- mineralización, 7- metabolización/inmovilización, 8- adsorción, 9- mineralización, 10- complejación, 11- metabolización, 12- disociación, 13- absorción, 14- mineralización, 15- incorporación, 16- ingreso a la cadena trófica, 17- descomposición y mineralización.

Si la biodisponibilidad edáfica de ciertos ET es elevada, podría afectar la población o actividad de los microorganismos edáficos (McGrath *et al.*, 1995) y la productividad de los suelos, al producir la inhibición de ciertos procesos metabólicos, llegando inclusive a alcanzar niveles fitotóxicos (Berti y Jacobs, 1996).

1.3 El suelo, un recurso no renovable

El suelo es una parte fundamental del ecosistema, ya que es el hábitat de los seres humanos, flora y fauna. Forma parte del ciclo biogeoquímico de los nutrientes y del ciclo

hidrológico; es fuente de materias primas en explotaciones agrícolas, ganaderas y forestales, y es el medio sobre el que se asientan viviendas, distintas infraestructuras y áreas recreativas. Constituye la interfase entre la atmósfera, la litosfera, la biosfera y la hidrosfera, sistemas con los que mantiene un continuo intercambio de materia y energía. Esta característica le confiere al suelo una importancia particular para una serie de funciones esenciales de carácter ambiental y ecológico.

Desde el punto de vista edáfico, el suelo es un cuerpo natural tridimensional formado por la progresiva alteración física y química del material original o roca madre a lo largo del tiempo, bajo ciertas condiciones climáticas y topográficas, sometido a la actividad de organismos vivos (Joffe, 1949; Russell, 1973). Es un medio heterogéneo complejo, constituido por minerales, materia orgánica y una fase porosa (ocupada por la solución y el aire del suelo). Los componentes del suelo interactúan entre ellos y con los elementos que ingresan al sistema (Alloway, 1995), modulados por los factores climáticos. La proporción relativa de estos componentes confieren al suelo sus propiedades y su productividad.

El suelo no es un medio estático, sino que es un sistema abierto en el espacio y en el tiempo, que evoluciona hasta alcanzar el equilibrio con las condiciones ambientales imperantes (Heredia y Fernández Cirelli, 2008). A partir de ese momento, tiende a permanecer estable siempre que no se produzca una perturbación. En caso de producirse, el suelo evoluciona hasta alcanzar un nuevo equilibrio. Debido a que su regeneración es muy lenta, el suelo suele considerarse un recurso finito no renovable. En el contexto de la producción agrícola-ganadera, el uso sustentable del suelo implica preservar y/o mejorar la capacidad productiva del sistema desde el punto de vista agronómico, económico y ambiental.

La materia orgánica del suelo (MOS) influye en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Se origina a partir del carbono atmosférico fijado a través de las reacciones de fotosíntesis, que es incorporado al suelo fundamentalmente a través de restos vegetales y exudados radicales; mientras que otras fuentes de menor importancia cuantitativa incluyen restos de origen animal y microbiano. La MOS contribuye a la

estabilización de la estructura del suelo al facilitar la formación de macroagregados, aumenta su capacidad de retención hídrica, mejorando la porosidad y la permeabilidad. Además, mejora las propiedades químicas del suelo, al aumentar la capacidad de intercambio catiónico (CIC), la reserva de nutrientes y la capacidad tampón. En cuanto a su efecto sobre las propiedades biológicas, favorece los procesos de mineralización, el desarrollo de la cubierta vegetal, sirve de sustrato para una multitud de microorganismos, y estimula el crecimiento de las especies vegetales en un sistema ecológico equilibrado (Rabot *et al.*, 2018; Cotching, 2018). Una de las causas de la degradación del suelo es la pérdida de materia orgánica (Gomiero, 2016).

Los suelos degradados se caracterizan por presentar escasa vegetación, por una disminución de las poblaciones de microorganismos simbioses, por una pérdida de suelo por erosión que deja con frecuencia capas compactas muy superficiales, por un escaso contenido en materia orgánica, y por unas pobres propiedades hidrológicas, que confiere a estos suelos escasas similitudes con el suelo original inalterado (Marx *et al.*, 1995).

1.4 Aprovechamiento agrícola de biosólidos

El aprovechamiento agrícola de residuos orgánicos constituye su destino más aceptable desde el punto de vista ecológico y económico. Numerosas prácticas de manejo agrícolas favorecen la degradación de la MOS, afectando su estructura y reserva de nutrientes (Thomas *et al.*, 2006). Bajo condiciones adecuadas de manejo, los residuos orgánicos presentan un alto valor como enmienda y/o fertilizantes. La incorporación de residuos orgánicos a los suelos mejora ciertas propiedades físicas, químicas y biológicas, reflejándose en un incremento en el rendimiento de los cultivos, a la vez de permitir el reciclado de materia orgánica y nutrientes (Torri y Lavado, 2009 b; Baldivieso-Freitas *et al.*, 2018).

La materia orgánica estable de los biosólidos (Torri *et al.*, 2003) mejora ciertas propiedades físicas del suelo como retención hídrica, aireación, densidad aparente, población total de microorganismos, porcentaje de agregación y porcentaje de agregados estables al agua, reflejándose en un incremento en el rendimiento de cultivos y pasturas

(Broderick y Evans, 2017; Torri y Lavado, 2009 a; Sharma *et al.*, 2017). Por estas razones, los biosólidos fueron y son utilizados en distintas regiones del mundo para la recuperación y revegetación de suelos disturbados y para el mejoramiento de suelos marginales, restaurando su productividad y calidad (Oberle y Keeney, 1994; Wijesekara *et al.*, 2017).

Los biosólidos poseen macro y micronutrientes en concentraciones similares a los tradicionales abonos orgánicos (Broderick y Evans, 2017; Torri *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2017; Athamenh *et al.*, 2018). En la Tabla 1.1 se presenta el contenido promedio de macronutrientes en muestras de estiércol de caballo, pollo y vaca en forma comparativa con una muestra de biosólidos. Se observa que los contenidos de nitrógeno, fósforo y magnesio son similares en los cuatro abonos orgánicos. El biosólido presenta una concentración más elevada de calcio y azufre, pero menores concentraciones de potasio. Además, por su aporte de N orgánico, aumenta el contenido de N mineral disponible en los suelos, e incrementa la concentración de P, Ca, K, Mg, Zn, B y Cu del suelo.

Tabla 1.1: Composición típica de las excretas provenientes de caballo, pollo y vaca comparada con los biosólidos (Lavado y Taboada, 2002).

Macronutriente (%)	caballo	pollo	vaca	biosólidos
Nitrógeno	2.23	2.54	2.18	2.56
Fósforo	0.43	0.87	0.8	0.77
Potasio	1.35	1.37	2.38	0.14
Azufre	0.21	0.14	0.19	0.40
Calcio	0.89	1.20	1.98	2.82
Magnesio	0.23	0.26	0.76	0.27

Aunque las ventajas agronómicas de los biosólidos como fuente de nutrientes se demostraron a nivel nacional e internacional (Basta, 2000; Sloan y Basta, 1995), existe preocupación por la presencia en los biosólidos de una variada concentración de elementos traza (ET). Entre los elementos de mayor relevancia desde el punto de vista

nutricional y toxicológico se encuentran el Cu y el Zn (Li *et al.*, 2005; Tarakci y Kucukoner, 2008; Torri y Lavado, 2002). Ambos elementos poseen valor agronómico como micronutrientes (Luo *et al.*, 1988). Si bien estos dos elementos son requeridos para el crecimiento de las especies vegetales, existe un creciente interés acerca de su impacto en el medio ambiente como elementos potencialmente tóxicos cuando son aplicados al suelo (Luo y Christie, 1995; McGrath *et al.*, 1995). En la Tabla 1.2 se presenta el contenido promedio de elementos traza inorgánicos en los biosólidos generados en Planta Depuradora Norte, junto con los valores máximos indicados por la normativa nacional e internacional.

Tabla 1.2: Concentración promedio (mg kg^{-1}) de elementos traza inorgánicos presentes en biosólidos, normativa nacional e internacional.

Elemento	Planta Norte	Resolución Nacional Nº 97/2001	USEPA 1993	Unión Europea 1986
Cd	1.25	20 - 40	39 - 85	20 - 40
Zn	1467	2500 - 4000	2800 - 7500	2500 - 4000
Cr	87	1000 - 1500	1200 - 3000	1000 - 1750
Cu	374	1000 - 1750	1500 - 4300	1000 - 1750
Hg		16 - 25	17 - 57	16 - 25
Ni	<25	300 - 400	420	300 - 400
Pb	275	750 - 1200	300 - 840	750 - 1200

Cabe destacar que, en Argentina, el uso de biosólidos y otros residuos orgánicos en la agricultura o en prácticas de restauración de suelos degradados no es una práctica común. A nivel nacional, la Norma IRAM 29559 recientemente aprobada en diciembre 2017 contempla el uso de barros o lodos tratados provenientes de plantas de tratamiento de efluentes cloacales como enmienda orgánica, aunque se requiere un estudio específico para cada caso.

Los biosólidos presentan altos contenidos de materia orgánica y nutrientes que, a priori, les confieren un alto potencial para su utilización en la restauración de suelos degradados. Sin embargo, el uso de estas enmiendas orgánicas puede implicar el ingreso de elementos traza a los suelos naturales, lo que podría ocasionar diversos riesgos ambientales si su biodisponibilidad en los suelos es elevada.

En las últimas décadas, surgieron distintas tecnologías de estabilización o reducción de ET en los suelos. Entre ellas se destaca la fitorremediación, que utiliza especies vegetales y los microorganismos asociados a la zona rizosférica para absorber, acumular, metabolizar, volatilizar o estabilizar los ET presentes en los suelos. Esta tecnología se presenta como una alternativa sustentable, de bajo costo y con una elevada aplicabilidad para la rehabilitación de ambientes afectados por contaminación natural y antropogénica, o para estabilizar ET en los suelos (Raffa *et al.*, 2021).

De hecho, la fitoestabilización consiste la inmovilización de los ET en los suelos a través de su absorción y acumulación en las raíces de las plantas o por precipitación en la zona de la rizosférica. La fitoestabilización se aplica principalmente a grandes extensiones de suelo donde existe una elevada disponibilidad de ET y presenta la ventaja de ser fácil de aplicar, tiene bajo costo y además es estéticamente agradable, con muy poco riesgo asociado a la ingesta animal (Gupta *et al.*, 2019). Recientemente, se manifestó un creciente interés por el uso de plantas nativas para estas fitotecnologías, con el fin de reducir cualquier efecto negativo originado por la introducción de especies exóticas en el ecosistema (Oyuela Leguizamo *et al.*, 2017; El Alaoui *et al.*, 2021).

La *Discaria americana* es una planta nativa de Sudamérica, arbustiva, que crece en una amplia zona desde el SE de Brasil, Uruguay, hasta el norte de la Patagonia argentina. Esta especie vive en simbiosis con un actinomiceto del género *Frankia*, formando nódulos radiculares que fijan nitrógeno atmosférico (Huss-Danell, 1997). Las plantas actinorrícicas son, desde un punto de vista ecológico, especies importantes por formar parte de comunidades pioneras en la colonización de los suelos, para su recuperación y estabilización. Además, este actinomiceto es resistente al Cu (Richards *et al.*, 2002). Cusato *et al.* (2007) observaron que *D. americana* es tolerante a altas

concentraciones de Zn, presentando un enorme potencial para el desarrollo de fitotecnologías como la fitoestabilización o la fitoextracción.

En este marco, el objetivo general de este trabajo de tesis doctoral fue determinar la capacidad que presenta la *Discaria americana* para fitorremediar Cu y Zn en suelos enmendados con biosólidos.

La Hipotesis general es que la *D. americana* modifica la distribución de Cu y Zn en las fracciones edáficas, facilitando su pasaje hacia formas de menor biodisponibilidad, siendo una especie adecuada para tecnologías de remediación de suelos.

Como objetivos particulares se plantearon:

1. Evaluar los efectos de dosis crecientes de biosólido puro y biosólido enriquecido con sus propias cenizas sobre parámetros de germinación de *Discaria americana* comparado con raigrás (*Lolium perenne* L.).
2. Determinar la biodisponibilidad de Cu y Zn inicial y a los 180 días en un suelo arenoso tras la adición de biosólido puro y biosólido enriquecido con sus propias cenizas.
3. Examinar la capacidad de la *D. americana* para extraer Cu y Zn en un suelo arenoso enmendado con biosólido puro y biosólido enriquecido con sus propias cenizas, y compararlo con la misma del raigrás (*Lolium perenne* L.).
4. Analizar la influencia de la actividad radical de la *D. americana* y raigrás (*Lolium perenne* L.) sobre la distribución de Cu y Zn entre las distintas fracciones edáficas en un suelo agrícola enmendado con biosólidos o biosólido enriquecido con sus propias cenizas.

CAPÍTULO II

POTENTIAL OF *Discaria americana* FOR TRACE ELEMENT STABILIZATION IN BIOSOLIDS-AMENDED SOILS

El trabajo que se presenta en este capítulo ha sido publicado en la revista International Journal of Phytoremediation, doi:10.1080/15226510802378475. El artículo se incluye en esta tesis como anexo A

2.1 Introduction

Land application of biosolids is a feasible way for restoring degraded or marginal soils. Amelioration of soil properties is related to the increase of organic carbon provided by the stable organic matter pool of biosolids (Torri *et al.*, 2003). Agricultural application of biosolids also offers the possibility for recycling N, P, and other plant nutrients (Wong *et al.*, 2001). However, concentration and availability of potentially toxic elements (PTE) in biosolids represent a risk of soil contamination. Cu and Zn are the most important PTE found in biosolids of Buenos Aires City (Torri and Lavado, 2002). Agricultural land application of sewage sludge is not a common practice in Argentina, where it is discarded in non-agricultural soils as landfarming after aerobic stabilization, and to a minor extent as land filling.

Biosolids production as a result of waste water treatment is worldwide rapidly increasing. Therefore, incineration is being used in some other countries for volume reduction and energy recovery (Bierman and Rosen, 1994). This practise results in a sterile ash in which organic compounds have been destroyed, removing unpleasant odour, reducing the original volume, and thus facilitating handling of waste. The liming potential of incinerated biosolids is derived from the hydrolysis of Na_2O , K_2O and CaO and losses of acidic anions

accompanied with emissions of acidic gases (Zang *et al.*, 2001). Nonetheless, disposal of the resulting ash still poses an important waste-management problem, because non-volatile elements such as PTE are concentrated in ash and thus, they cannot be applied directly to soils. Mixing biosolids with its own ash may offer a potential viable utilization of both wastes as a soil amendment, since organic compounds in biosolids may act as an adsorptive medium for PTE concentrated in the ash, decreasing their availability (Torri, 2001). Moreover, studies performed on three soil samples of representative soils of the Pampas Region, Argentina, showed that the use of biosolids mixed with 30% dry matter (DM) of its own incinerated ash (ash-spiked biosolids) as a soil amendment may not pose a significant risk of contamination with Cd, Cu, Pb or Zn to soils, water or plants (Torri and Lavado 2008, Torri and Lavado, *in press*), providing supporting evidence for the protection theory (McBride, 1995).

Ash-spiked biosolids may also be an alternative for rehabilitating massive wastes from metal mining such as tailings. Mine tailings are generally deficient in plant nutrients and have a low water holding capacity (Forsberg and Ledin, 2003). Moreover, weathering factors may produce intense leaching of PTE from these materials, resulting in the migration of metals to the surrounding environment, and contributing to soil contamination and groundwater pollution. These heavy metals may be stabilized as non available forms within the organic and inorganic matrix of ash-spiked biosolids. In this way, metal toxicity is reduced, and at the same time the amendment may improve physical characteristics of tailings and act a slow-release nutrient source (Wong, 2003). Nevertheless, ash spiked biosolids have to be carefully tested before their large-scale application, even in marginal or degraded soils, due to its high metal content.

Plants have been used in recent years for clean-up and/or in situ immobilization of available PTE from biosolids-amended soils (Mc Grath *et al.*, 2001). Rhizosphere-induced adsorption and precipitation reduce PTE availability (Vangronsveld *et al.*, 1991; Vangronsveld *et al.*, 1993), and the plant cover prevents dispersion of PTE by water or wind erosion. It has been suggested that soil application of biosolids might provide PTE in potentially toxic, labile forms (McBride, 1995) which can inhibit or delay seed germination

and plant growth. Another problem arising from land application of non-digested biosolids is the potentially phytotoxic nature of the compounds generated as a result of the intense organic matter mineralization (Zucconi *et al.*, 1985), such as ammonia (Britto and Kronzucker, 2002), ethylene oxide (Wong *et al.*, 1983), low molecular weight organic acids (Chaney, 1983), or organic pollutants such as phenolic compounds (Polymenakou and Stephanou, 2005).

Seed germination is the first step in plant development, and any adverse effect at this stage will have a direct impact on the plant survival (Wang, 1992). Bioassays based on seed germination and primary root growth are simple and rapid methods to assess phytotoxicity (Zucconi *et al.*, 1985), and present several advantages like sensitivity, simplicity and low cost (Wang *et al.*, 2001, Munzuroglu and Geckil, 2002). These bioassays are also useful for selecting species that are tolerant to contaminants and for screening the dose of biosolids for land application. Ryegrass (*Lolium perenne* L.) has been extensively used in biosolids-amended soils (Pascual *et al.*, 2004) and for revegetation of metalliferous waste (Arienzo *et al.*, 2004). This species produces high dry matter yields and accumulates elevated amounts of PTE. Discaria (*Discaria americana*) is an actinorhizal xerophytic shrub widely distributed from south-eastern Brazil to north Patagonia in Argentina (Tortosa, 1983). This species lives in symbiosis with an actinomycete of the genus *Frankia*. The symbiosis occurs in root nodules and biological nitrogen fixation takes place, making actinorhizal plants ecologically important as pioneer community plants in land reclamation, reforestation and soil stabilization (Richards *et al.*, 2002). Discaria has been recently found to tolerate Zn concentrations up to 2000 mg Zn²⁺ kg⁻¹ dry soil (Cusato *et al.*, 2007), but its behaviour when grown on sludge-amended soils is still unknown.

The objective of the present study was to investigate the effect of aqueous extracts of different soil application rates of biosolids or ash-spiked biosolids on seed germination and primary root growth of discaria (*Discaria americana*) compared with ryegrass (*Lolium perenne* L.), with the aim of evaluating the potential use of discaria for metal stabilization in biosolids-amended soils.

2. 2 Materials and Methods

Soils, biosolids and ash-spiked biosolids characterization

Non-digested biosolids from the SW outskirts of Buenos Aires City was provided by the local water operator Aguas Argentinas S.A. Biosolids were dried at 60°C before grinding and sieving (<2 mm), and split into two portions. One portion was incinerated at 500° C in a muffle furnace. The obtained ash was thoroughly mixed with a portion of the sieved biosolids, resulting in a mixture of 70% biosolids plus 30% of its own incinerated ash (ash-spiked biosolids).

The soil used in the study was a Typic Hapludoll (U.S. Soil Taxonomy, 1999) of the Pampas Region, Argentina. Composite soil samples (10 sub-samples, 0-15 cm depth) were collected near Carlos Casares town. The soil was air-dried, ground, and passed through a 2-mm sieve.

Amendments

Increasing application rates of biosolids (B) or ash-spiked biosolids (AB) were evaluated, until a maximum field equivalent of 156 t·ha⁻¹ or 267 t·ha⁻¹, respectively. The highest dose of AB was calculated so the amount of organic matter applied was the same as in the highest B treatment dose. Both amendments were mechanically mixed with the soil. Four replicates were prepared for each treatment, which included the following doses (w/w):

- 1.** Control: soil without amendment
- 2.** BS 2: soil amended with 2% of B
- 3.** BS 4: soil amended with 4% of B
- 4.** BS 6: soil amended with 6% of B
- 5.** ABS 2: soil amended with 2% of AB

6. ABS 4: soil amended with 4% of AB
7. ABS 6: soil amended with 6% of AB
8. ABS 8: soil amended with 8% of AB
9. ABS 10: soil amended with 10% of AB

Seed germination test

A germination bioassay based on the standard procedure developed by Zucconi *et al.* (1981) was carried out. Water extracts of the nine treatments were prepared by mixing 5 g of dry control or amended soils with 50 ml of distilled water. The suspensions were stirred mechanically for 30 min, stored 60 hours at 60°C, centrifuged at 3600 rpm for 45 min, and filtered through Whatman N° 42 filter paper. Seeds of discaria (*Discaria americana*) were collected in its natural habitat, on coastal dunes in La Lucila del Mar, Buenos Aires, Argentina (36° 22'S, 56° 43'W). Forty seeds of ryegrass (*Lolium perenne* L) or discaria were placed on two layers of sterile filter paper in 10 cm Petri dishes and 6 ml aliquot of the corresponding extract was added. The Petri dishes were placed in a germination chamber and maintained in the dark at 27 °C and 75% of humidity. Distilled water was added to prevent seeds from drying when necessary. Seeds were considered germinated when primary roots reached 5 mm in length (USEPA, 1982). Germinated seeds were counted and roots length was measured. Percentages of relative seed germination (RSG), relative root growth (RRG) and germination index (GI) after exposure to B or AB extracts were calculated according to the formula proposed by Zucconi *et al.* (1985) and Hoekstra *et al.* (2002):

$$\text{RSG (\%)} = \frac{\text{number of seeds germinated in extract of amended soil}}{\text{number of seeds germinated in control}} \times 100$$

$$\text{RRG (\%)} = \frac{\text{mean root lenght in extract of amended soil}}{\text{mean root lenght in control}} \times 100$$

$$\text{GI (\%)} = \frac{\text{RSG} \times \text{RRG}}{100}$$

Analytical procedure

Soil and amendments

Total organic carbon (TOC) content in the soil and amendments was determined by wet oxidation (Amato, 1983), total N was measured using the Kjeldhal method (Bremner and Mulvaney, 1982), and total P was determined as described by Blakemore *et al.* (1987). Cation exchange capacity (CEC) was determined using the sodium acetate method (Chapman, 1965). Soil particle-size distribution was determined with the pipette method (Miller and Miller, 1987). pH and EC were measured using a 1:2.5 sample/water ratio. Total Zn, Cd, Cu and Pb in the soil, B and AB were solubilised by acid digestion with a 2:5 mixture of hydrofluoric and nitric acids (Shuman, 1985) and determined with a flame atomic absorption spectrophotometer (FAAS). The detection limits for Cd, Cu, Pb and Zn were 0.5, 0.1, 0.5 and 0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectively. A standard biosolids, codified as CRM 145 and certified by the BCR, was used as a reference material to test the reliability of the acid digestion procedure. Results showed a good agreement between the obtained and the certified values for the metals analysed (accuracy >90%).

Water extracts

Total N, dissolved organic carbon (DOC), pH and electrical conductivity (EC) were determined in the water extracts of the nine treatments. DOC in the water extracts was measured immediately after centrifugation and filtering of the suspensions, using a Shimadzu TOC-5000 analyzer. Total Cd, Cu, Pb and Zn were also determined in all extracts by flame atomic absorption spectrophotometer (FAAS) as described above.

Statistical analysis

The effects of the amendments on RSG, RRG and GI were analysed using the Statistics package (Statistics 7.0, 2000). One-way ANOVA was carried out to compare the means of

different treatments; where significant F-values were obtained, differences between individual means and control mean were tested using the Tukey's test at a 0.05 level of probability. Correlations among variables were analysed by linear regression and stepwise linear regression.

2.3 Results and Discussion

Characterisation of soil, biosolids and ash-spiked biosolids.

Properties of the Typic Hapludoll, biosolids (B) and the ash-spiked biosolids (AB) are presented in Table 2.1. Total N contents in B or AB were moderate. Argentine regulations for land application of biosolids are similar to USEPA 503 rule (USEPA, 1993). These regulations apply to any biosolids containing material and would therefore limit the use of biosolids or ash-spiked biosolids mixtures for land application. As trace elements (TE) do not degrade, they concentrate in the ash or in the particulate matter that is contained in the exhaust gases generated by the incineration process (Stasta *et al.*, 2006). As a result, TE's concentration in AB was higher than in B.

Cd and Cu in both amendments were below the maximum permissible concentration of PTE, since the "exceptional quality" biosolids (EQ) limit is 39 mg kg⁻¹ for Cd and 1500 mg kg⁻¹ for Cu (US EPA 1992 - 40-CFR 503.13 and Res 97/2001). Total Zn concentration in B was 2500 mg kg⁻¹, very close to the EQ limit of 2800 mg kg⁻¹, but Zn in AB was higher than the EQ limit. On the other hand, Pb concentration in both amendments was higher than the EQ concentration of 200 mg kg⁻¹ (Res 97/2001). Based on these analyses, it would appear that large applications of these amendments would have the greatest potential to increase Pb and Zn concentrations in soils and plant tissues, although in this last case it would depend on metal bioavailability. Therefore, if biosolids do not meet all of the EQ criteria on PTE concentrations, cumulative loading restrictions apply (US EPA 1992 - 40-CFR 503.13 and Res 97/2001).

Table 2.1: Selected properties (mean values, n=4) of the Typic Hapludoll, pure biosolids (B) and ash-spiked biosolids (AB).

	Typic Hapludoll	B	AB
Clay (%)	19.2	nd ^d	nd
Silt (%)	23.2	nd	nd
pH	5.12	5.82	6.17
TOC (g kg ⁻¹) ^a	28.6	251	176
Total N (mg g ⁻¹)	2.62	19.3	21.3
Total P (mg g ⁻¹)	1.07	7.2	8.6
EC (dS m ⁻¹) ^b	0.61	0.9	0.89
CEC (cmol _(c) kg ⁻¹) ^c	22.3	12.0	nd
Total Cd (mg kg ⁻¹)	< 0.5	10.1	13.1
Total Cu (mg kg ⁻¹)	22	490.6	662.8
Total Pb (mg kg ⁻¹)	18	407.6	554.4
Total Zn (mg kg ⁻¹)	55	2500	3150

^a TOC= Total organic carbon

^b EC = electrical conductivity

^c CEC = Cation exchange capacity

^d nd = not determined

Electrical conductivity (EC), pH, total N, DOC, and total Cu and Zn concentration in the extracts from the 9 soil-amended treatments are shown in Table 2.2. Cd and Pb were in all cases below analytical detection limits. Increasing application rates of B or AB resulted in significantly higher total N and EC values in the extracts compared to the control. The EC was related to the amounts of soluble salts in the biosolids which accumulated during the treatment of sewage sludge with chemicals such as Ca(OH)₂ as flocculating and conditioning agents (AGN, 2006). Higher levels of B or AB in soils resulted in higher EC values. However, no significant differences in EC were observed between BS 2 and ABS 2 or BS 4 and ABS 4. Salinity from unweathered ash is usually considered as the most

important limiting factor for plant production (Paramasivan *et al.*, 2006). However, AB did not initially increase the amounts of soluble salts in the amended soils compared to B-amended soils. Total N concentration in the extracts increased in soil amended with both B or AB, due to the low molecular weight-proteinic material contents in the amendments (Torri 2001). pH values of the extracts varied from 7.61 to 8.23, with no statistical differences between control and amended soils. It is well known that biosolids tend to increase acidity of the soils as a result of proton release from organic matter decomposition and mineralization of $\text{NH}_4^+\text{-N}$. On the other hand, carbonation has been recognised to be an important weathering process affecting alkaline metallic oxides produced during biosolids incineration, resulting in a decrease of pH (Meima *et al*, 2002). However, no organic matter mineralization or weathering processes occurred at the moment when the extracts were made, so pH values obtained in the extracts may be ascribed to the slightly higher pH of amendments compared to unamended soil.

Cu and Zn concentrations significantly increased in BS and ABS extracts compared to control. Moreover, an increment in Cu and Zn concentration with increasing doses of B was observed. The results of the multiple regression analysis performed separately for the two amendments indicated that Cu concentration in BS extracts was positively correlated with soil parameters like DOC and total Cu content (Table 2.3). The effect of DOC on Cu solubility is well documented: due to Cu high binding affinity for DOC, the formation of stable soluble Cu-DOC complexes and the capacity of DOC to mobilize Cu from the solid phase into solution (Römkens *et al*, 1999). On the contrary, Zn concentration in BS extracts was negatively correlated with DOC and pH (Table 2.3). Zn is less easily complexed by organic matter than Cu, and in soil solution appears mostly in free forms or in inorganic complexes (Xiao *et al*, 1999).

Table 2.2: Cu and Zn mean concentrations in control soils and soil-amendment mixtures, and chemical characterization of 1:2.5 extracts from control soils and soils amended with increasing doses of biosolids (BS) or ash-spiked biosolids (ABS). Different letters in the same column indicate significant differences at the 0.05 probability level (n = 4).

Treatment	total Cu (mg kg ⁻¹)		total Zn (mg kg ⁻¹)		EC (dS/m)	pH	total N (µg l ⁻¹)	DOC (µg C.l ⁻¹)	Cu (µg l ⁻¹)	Zn (µg l ⁻¹)						
	in the soil										in treatment extract					
Control	22.00	g	55.00	i	0.060	e	7.64	b	0.0093	d	0.073	d	0.0010	c	0.0030	b
BS 2	31.37	f	103.9	h	0.114	de	7.64	b	0.0156	cd	0.168	cd	0.0100	b	0.0305	ab
BS 4	40.74	e	152.8	f	0.198	cd	7.83	ab	0.0124	cd	0.107	cd	0.0115	b	0.0515	a
BS 6	50.11	d	201.7	d	0.33	b	7.86	ab	0.0374	ab	0.379	ab	0.0225	a	0.0420	a
ABS 2	34.82	f	116.9	g	0.144	cde	7.83	ab	0.0203	bcd	0.192	bcd	0.0185	a	0.0350	a
ABS 4	47.63	d	178.8	e	0.202	cd	8.23	a	0.0218	bcd	0.209	bcd	0.0240	a	0.0405	a
ABS 6	60.45	c	240.7	c	0.225	c	7.94	ab	0.0218	bcd	0.209	bcd	0.0230	a	0.0595	a
ABS 8	73.26	b	302.6	b	0.342	ab	7.76	b	0.0296	abc	0.294	abc	0.0215	a	0.0545	a
ABS10	86.08	a	364.5	a	0.439	a	7.61	b	0.0420	a	0.430	a	0.0195	a	0.0515	a

On the other hand, research has shown that Zn has relatively high affinity for sorption sites on the surfaces of Fe and Mn oxides, especially with an increase in soil pH (Luo and Christie, 1998; Zheljzkov and Warman, 2004). The increased sorption with an increase of soil pH, and the fact that minimum Zn solubility occurs at pH \approx 7 to 8 (Xiao *et al.*, 1999), explains the negative correlation between soil pH and Zn concentration in BS extracts.

Table 2.3: Multiple linear regression coefficients for soluble Cu and Zn in the extracts of substrates under assessment: BS: soil amended with biosolids (n=4 per treatment,16 samples), ABS: soil amended with ash-spiked biosolids (n=4 per treatment, 24 samples).

	treatment		R ²	SD
Cu	BS	$- 0.0099 + 0.029 \text{ DOC}^* + 4.42 \cdot 10^{-4} \text{ Cu}_{\text{soil}}$	0.9546	0.00450
	ABS	$- 0.161 + 0.021 \text{ pH} + 2.52 \cdot 10^{-4} \text{ Cu}_{\text{soil}}$	0.73	0.00450
Zn	BS	$- 0.034 - 0.006 \text{ pH} - 0.105 \text{ DOC} + 6.29 \cdot 10^{-5} \text{ Zn}_{\text{soil}}$	0.89	0.0087
	ABS	$0.009 + 1.43 \cdot 10^{-4} \text{ Zn}_{\text{soil}}$	0.52	0.01517

* DOC: dissolved organic carbon

Cu_{soil}: total Cu concentration in amended soil (mg kg⁻¹)

Zn_{soil}: total Zn concentration in amended soil (mg kg⁻¹)

Although Cu and Zn concentrations significantly increased in all ABS extracts compared to control, increasing rates of AB did not result in significant increases (p<0.05) in Cu or Zn concentration in the extracts. The availability of Cu and Zn in ABS depends on the chemical forms of these metals in the amendment. Cu and Zn are likely to be tightly retained by sorption mechanisms on the inorganic and organic components of this material instead of being released to the soil solution (Torri and Lavado 2008 a,b). The results of the multiple regression analysis in ABS treatments indicate that Cu solution concentration increased with an increase in pH and total Cu in soils (Table 2.3). This seems to be a contradiction, for an increase in soil pH implies increased metal sorption due to deprotonation of surface sites. Nonetheless, in lime treated biosolids, Hsiau and Lo (1998) reported a shift of Cu

from the organically bound fraction to the exchangeable fraction. Some other authors have also reported that liming increased Cu availability (Aarab *et al*, 2006, Jamali *et al*, 2007), and attributed this fact to the irreversible dissolution of organically-bound Cu, which enhanced the formation of DOC-Cu complexes (Leita and Nobili, 1991). Such complexes are more mobile and less readily adsorbed in soil (Neal and Sposito, 1986) and thus more easily extracted. Zn concentration in ABS extracts was positively correlated with total Zn content (Table 2.3). Although pH is a major factor that significantly affects metal availability, no correlation was observed between Zn concentration in ABS extracts and this soil parameter. This result suggests that the stabilization of Zn achieved by incineration does not depend on soil pH in the range 7.6 to 8.2, in which minimum Zn solubility occurs (Xiao *et al*, 1999).

Cu and Zn levels in extracts of all treatments used in this work were below toxicity limits for a wide range of vegetable species (Geiger *et al.*, 1993) and thus no phytotoxic effects were expected for discaria. Cusato *et al.* (2007) reported that even 2000 mg kg⁻¹ of Zn delayed discaria growth, but caused no phytotoxic symptoms.

Phytotoxicity assays

Seed germination

Seed germination and root length in each plate were measured for ryegrass seeds after 6 days, and for discaria seeds after 13 days. No germination delay was observed among treatments for ryegrass or discaria seeds. The percentages of relative seed germination (RSG) remained at a high level for all treatments in the ryegrass assay, in spite of the increasing application rates of B or AB (Table 2.4). Although there was a trend of decreasing percentage of ryegrass RSG accompanied with increasing application rate of B (Table 2.4), a significant decrease of ryegrass RSG ($P < 0.05$) was only observed when the seeds were treated with the highest concentration of AB (ABS 10). These results could not be attributed to high Cu or Zn concentration, for there were no statistical differences among Cu or Zn concentrations within all ABS extracts (Table 2.2). Besides, it has been

reported that concentrations of Cu up to 0.5 mg kg⁻¹ and of Zn up to 30 mg kg⁻¹ did not show primary toxicity for ryegrass seed germination (Wong and Bradshaw 1982), and the concentrations of Cu and Zn in B or AB extracts in this study were almost ten folds lower. Our data suggest that the inhibition of ryegrass seed germination in ABS 10 was mostly due to an osmotic effect. Salts can affect seed germination either by restricting the supply of water and/or causing specific injury through ions to the metabolic machinery (Mohammed and Sen, 1990, Pujol *et al.*, 2000). We observed a negative correlation between seed germination of ryegrass and electrical conductivity (EC) in both BS and ABS extracts (CE (dS m⁻¹) = -35.90 RSG + 102.96, R²= 0.60, P<0.05).

Table 2.4: Percentages of relative seed germination (RSG), relative root growth (RRG) and germination index (GI) of ryegrass (*Lolium perenne* L.) and discaria (*Discaria Americana*). Different letters in the same column indicate significant differences at the 0.05 probability level based on Tukey test.

	ryegrass			discaria		
	RSG	RRG	GI	RSG	RRG	GI
BS 2	101.1 a	87.4 a	88.6 a	71.3 a	103.0 ab	73.4 ab
BS 4	94.2 ab	92.4 a	87.2 a	70.5 a	93.6 ab	66.0 ab
BS 6	93.4 ab	91.7 a	86.0 a	99.5 a	146.6 a	145.9 a
ABS 2	97.6 a	107.7 a	105.0 a	95.0 a	94.2 ab	89.5 ab
ABS 4	94.8 ab	88.9 a	84.4 a	70.5 a	93.74 ab	66.1 ab
ABS 6	90.9 ab	89.7 a	81.7 a	66.0 a	91.8 ab	60.6 ab
ABS 8	96.4 ab	94.8 a	92.3 a	59.3 a	130.8 a	77.6 ab
ABS 10	83.8 c	90.2 a	77.3 a	54.5 a	76.6 ab	41.7 b

Compared to ryegrass, RSG was significantly lower for discaria, indicating that germination of this species was more sensitive than ryegrass to biosolids soluble components. RSG varied in a range from 54 to 99.5% (Table 2.4). According to Zucconi *et al.* (1981), the

existence of a phytotoxic effect is considered when RSG is lower than 80-85 %. No significant differences on RSG between B or AB treatments were observed (Table 2.4). As in ryegrass, there was a trend of decreasing values of RSG along with increasing concentration of AB dose (Table 2.4). Even though salinity did not cause significant decreases in RSG for discaria, a negative correlation was observed between seed germination of discaria and EC in AB treatments ($EC (dS m^{-1}) = -113.6 RSG + 99.7, R^2 = 0.73, P < 0.05$). This tendency was not observed in B treatments. On the contrary, an increase in RSG in BS 6 was observed. It has been reported that Cu and Zn uptake had a stimulating effect on the activity of hydrolytic enzymes of bean seeds during germination (Zeid and Abou El Ghatte, 2007). In our case, there appeared to be no clear relation between discaria RSG in BS 6 treatment and the parameters measured. Further experiments should be performed to study this finding.

Relative root growth (RRG)

Root elongation has been regarded as a more sensitive method than seed germination when used as a bioassay for the evaluation of phytotoxicity (Wang, Keturi 1990). According to Kapustka and Reporter (1993), seed germination is rather insensitive to many toxic substances: first, many chemicals cannot pass through seed coats; and second, the embryonic plant derives its nutritional requirements internally from the seed storage materials, making it isolated from the environment. Several other authors agree with this evidence (Dorn *et al.*, 1998, Alvarenga *et al.*, 2007). It has been reported that the toxic effects of metals on root elongation occur through disturbing the equilibrium among ions when metal ions enter the plants, inhibiting natural ion absorption, transportation, infiltration, and adjustment, and resulting in metabolic disorders (Fernandez and Henriques 1991; Li *et al.*, 2003; Ni and Wei 2003). In this study, no significant differences in RRG were observed with increasing B or AB application rates for ryegrass (Table 2.4). These results differ from those recorded by Wong and Bradshaw (1982), who reported a reduction of 50% in root growth of ryegrass with Cu solution concentrations of $0.02 \mu g l^{-1}$.

For the discaria seeds, slight differences in RRG could be observed (Table 2.4). In some cases, RRG exceeded 100% when seeds were in contact with BS or ABS extracts, suggesting a stimulating effect on root growth. An atypical increase in RRG was observed in BS 6 treatment. These results are difficult to be explained since RRG did not correlate with EC, DOC, pH, total N or Cu and Zn content in the extracts.

Germination index (GI)

Germination index (GI) is usually considered the most sensitive parameter that is able to account for low toxicity affecting root growth and seed germination (Zucconi *et al.*, 1981). GI above 80-85% has been regarded as an indicator of phytotoxin-free composts (Zucconi *et al.*, 1981), whereas GI values over 100% suggest a growth stimulating effect on plant growth (Keeling *et al.*, 1994). GI values for ryegrass varied from 105% to 77%, with no significant differences among treatments (Table 2.4). GI values for discaria varied from 41.7% to 145.9%, with the highest value in BS 6, and the lowest value in ABS 10. The reduction of GI has been attributed by other authors to the release of high concentrations of ammonia or low molecular weight organic acids (Wong, 1985, Fjällborg and Dave, 2004; Fuentes *et al.*, 2004). Unfortunately, we did not measure both parameters. Although EC, total N and DOC were significantly higher in ABS 10 compared to the other treatments, we found no relationship between GI values for discaria and total N or DOC concentration in the extracts ($r = 0.0010$).

2.4. Conclusions

The results obtained in this study show that the concentration of Cd, Cu, Pb and Zn in biosolids and ash-spiked biosolids amended soils extracts were low enough so as to cause no phytotoxic effect on discaria or ryegrass species. In general, total N, Cu and Zn concentration, EC and DOC in the extracts increased with increasing doses of both amendments. The use of ash-spiked biosolids did not show dramatic differences in these parameters compared with biosolids. Relative seed germination was in general lower for discaria compared to ryegrass, indicating that this species is more sensitive to biosolids

soluble components during the germination period. A negative correlation could be established between relative seed germination of ryegrass and discaria and EC. Relative root elongation and germination index of ryegrass were not significantly affected with increasing biosolids or ash-spiked biosolids application rate. An increase in relative root growth and germination index was observed for discaria with biosolids field application rate equivalent to $156 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$, suggesting a stimulating effect of the amendment. As seed germination of discaria was more sensitive to phytotoxic substances than root elongation, germinated seedlings of discaria might be a feasible option to be applied for metal stabilization in biosolids amended soils. However, further greenhouse and field experiments should be performed to confirm these findings.

CAPÍTULO III

INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD RADICAL DE LA *Discaria americana* Y DEL RAIGRÁS (*Lolium perenne* L.) SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE CU Y ZN ENTRE LAS DISTINTAS FRACCIONES EDÁFICAS

3.1 Introducción

La aplicación de biosólidos como enmienda orgánica a los suelos agrícolas es cada vez más frecuente a nivel mundial. Esta práctica produce mejoras en las propiedades físicas, químicas y biológicas de los agroecosistemas a nivel local y global (Cambier *et al.*, 2019). Como se mencionó en el Capítulo I, los biosólidos presentan un elevado contenido de materia orgánica (MO), macro y micro nutrientes vegetales (Tabla 1.1). Sin embargo, pueden potencialmente introducir concentraciones variables de elementos traza (ET) a los suelos (Sistani y Novak, 2006; Bolan *et al.*, 2014).

Cuando los ET son incorporados al suelo a través de una enmienda orgánica, pueden quedar retenidos por las partículas de suelo a través de diferentes mecanismos biológicos y/o físico químicos: en sitios de intercambio o específicamente adsorbidos sobre constituyentes inorgánicos, asociados con la materia orgánica del suelo (MOS) y/o precipitados; o pueden permanecer en la solución del suelo (Selim y Zhang, 2013). Las reacciones fisicoquímicas que se producen entre la fase sólida edáfica y la solución del suelo están estrechamente relacionadas con el pH y del potencial redox del sistema que, a su vez, dependen de la textura y estructura del suelo. La interacción entre los distintos procesos resulta en la mayor o menor disponibilidad de los ET (Figura 3.1).

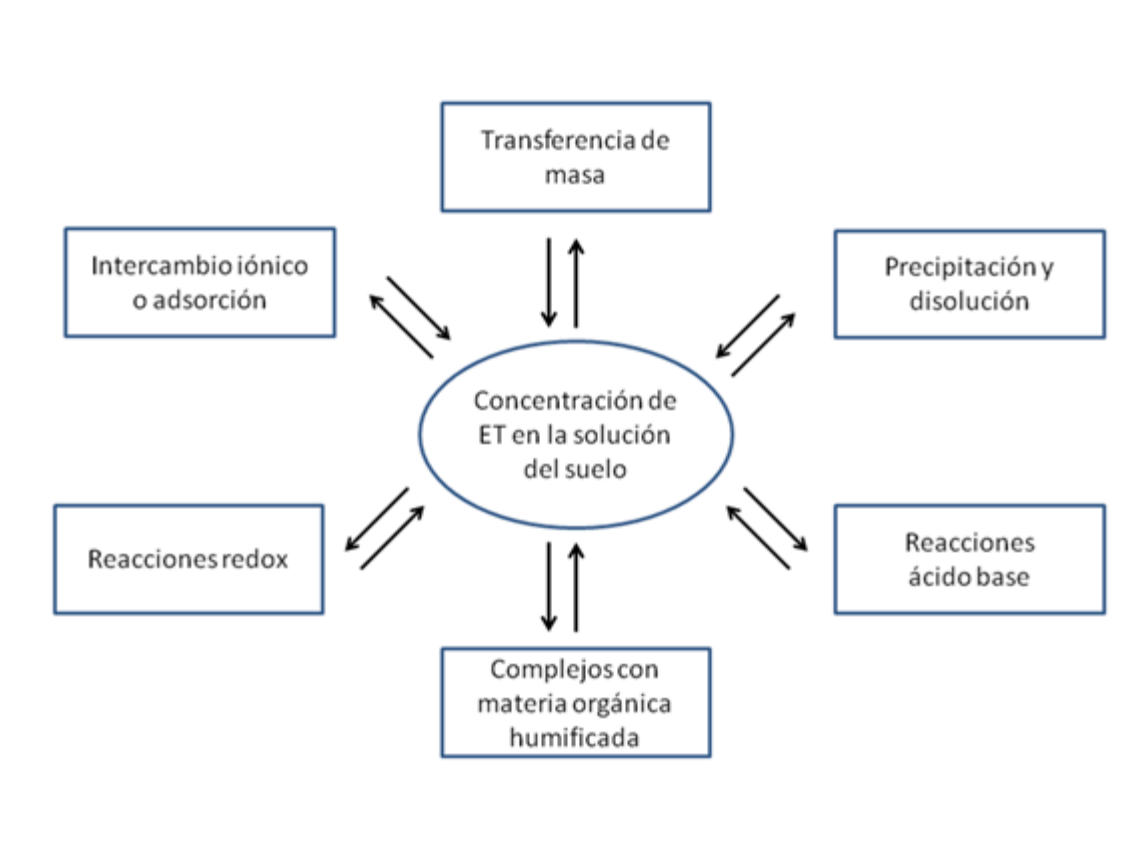


Figura 3.1: Procesos que regulan la concentración de elementos traza (ET) en la solución del suelo (adaptado de Mattigod, 1981).

Los ET se caracterizan por ser poco móviles en el perfil del suelo: alrededor del 90% de los elementos traza incorporados al suelo interactúan con los componentes de su fase sólida (Pinochet *et al.*, 2001). Este proceso se caracteriza por una rápida retención inicial y posteriores reacciones de redistribución entre las distintas fracciones edáficas, que depende del elemento traza en cuestión, las propiedades del suelo, factores ambientales y el tiempo. Por el contrario, las formas solubles en la solución del suelo como iones libres o asociados con ligandos (iones complejos) se encuentran en muy baja proporción, y son fácilmente absorbidas por las especies vegetales (He *et al.*, 2005).

La biodisponibilidad se define como la fracción del ET que puede interactuar con un organismo biológico y es incorporado a su estructura (Vangronsveld y Cunningham, 1998). Por lo tanto, se considera que los ET se encuentran en formas biodisponibles cuando están en contacto con un organismo (accesibilidad física), o cuando se encuentran en una forma particular (accesibilidad química) que pueda ingresar al sistema metabólico (Bolan *et al.*, 2014). En la Tabla 3.1 se presenta la relación entre la especie química presente en el suelo y su disponibilidad para las especies vegetales.

Tabla 3.1: Relación entre la forma de retención en el suelo y la disponibilidad relativa de elementos traza para las plantas

Forma de retención en el suelo	Disponibilidad relativa
Iones en solución del suelo	Fácilmente disponible
Ión en el complejo de cambio	Relativamente disponible
Complejos orgánicos	Menos disponible
Precipitado o coprecipitado	Disponible solamente si ocurre alguna alteración química
Incorporado a la matriz biológica	Disponible después de la descomposición
Parte de la estructura mineral	Disponible después de la meteorización

De este modo, la forma de retención del ET en el suelo condiciona su disponibilidad relativa por las plantas y por tanto la incorporación en los organismos.

Factores del suelo que afectan la disponibilidad de los elementos traza.

Ciertas propiedades del suelo pueden afectar la distribución de los ET entre las distintas fracciones edáficas, modificando su disponibilidad. Entre ellas se destacan:

pH

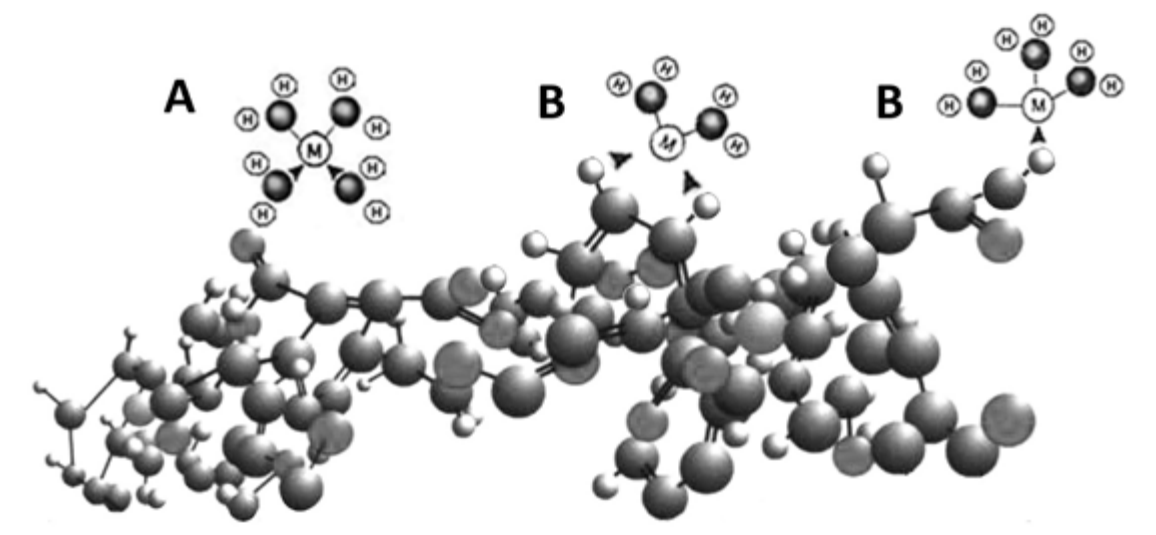
El pH edáfico modifica la carga variable de los componentes coloidales del suelo, como óxidos y materia orgánica. A pH alcalino se observa un incremento de cargas negativas en dichos componentes, mientras que a pH ácido predominan las cargas positivas (Violante *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2015). En general, los ET catiónicos se comportan de manera similar, y su disponibilidad disminuye con el aumento de pH por procesos de adsorción. Sin embargo, elementos como As, Mo, Se y Cr presentan mayor movilidad a pH alcalino (Kabata-Pendias, 2004; McGrath *et al.*, 2010).

Contenido de materia orgánica del suelo

La MOS presenta numerosos grupos funcionales capaces de interactuar con los ET. La MO más estabilizada (sustancias húmicas y huminas) que recubre los minerales primarios y secundarios, contribuye a la retención, y muchas veces a la inmovilización de los ET a través de mecanismos de adsorción específica y no específica (Blume y Brummer, 1991).

La adsorción no específica, o interacción iónica, ocurre como respuesta de la atracción electrostática del elemento traza en forma catiónica con los grupos funcionales que presentan carga negativa (o de formas aniónicas con grupos funcionales catiónicos), formando complejos de esfera externa (Sposito, 1989). Éste es un proceso rápido y reversible. Por el contrario, la adsorción específica es un fenómeno de alta afinidad, que involucra enlaces covalentes o iónicos entre el ET y el grupo funcional. Como consecuencia, los ET son removidos de la solución suelo y retenidos en la superficie de los coloides orgánicos formando complejos de esfera interna. Este mecanismo es generalmente irreversible (Silveira *et al.*, 2003). En la Figura 3.2 se esquematizan ambos procesos.

La materia orgánica ejerce una acción dual sobre la biodisponibilidad de los ET: los componentes orgánicos solubles pueden formar complejos solubles que incrementarían la disponibilidad de los ET, mientras que la materia orgánica más estabilizada contribuye a la retención (o inmovilización) de los ET. En cualquier caso, la interacción ocurre a través de



A. adsorción no específica
complejo de esfera externa

B. adsorción específica
complejo de esfera interna

Figura 3.2: Esquema de adsorción no específica y específica de un elemento traza catiónico (M) sobre la materia orgánica edáfica.

los numerosos grupos funcionales presentes en la matriz orgánica (Senesi, 1992). Por estos motivos, el hecho que la interacción resulte en la movilización o inmovilización del ET está relacionado con las características de la fase orgánica y su solubilidad más que con los grupos funcionales involucrados (Madrid, 1999).

Procesos de intercambio catiónico

Las arcillas presentan una densidad de carga negativa en su superficie como consecuencia de procesos de sustitución isomórfica. Dichas cargas negativas, sumadas a su alta superficie específica, permiten la adsorción de cationes del medio circundante en un proceso reversible de adsorción-desorción (Tack, 2010). La capacidad de adsorción de las arcillas se encuentra relacionada con su capacidad de intercambio catiónico (CIC), la cual

depende a su vez del tipo de arcilla. A mayor CIC, mayor capacidad de adsorción. La CIC se incrementa en el orden caolinita < illita < montmorillonita < vermiculita. Los suelos de la región pampeana presentan elevadas proporciones de illita y montmorillonita.

Los cationes que están muy solvatados forman complejos de esfera externa con las superficies cargadas, con una interacción débil entre el ión adsorbido y la partícula coloidal del suelo. Por esta razón, los iones adsorbidos son fácilmente intercambiados por otros cationes que, en forma similar, sólo forman complejos de esfera externa (Evans, 1989). De esta manera, el poder de adsorción de los ET depende de su valencia y del radio iónico hidratado: cuanto menor sea el tamaño y mayor sea la valencia, más fuertemente quedarán retenidos (Ji y Li, 1997).

Los suelos arcillosos retienen una mayor proporción de elementos traza que los suelos de textura gruesa. Sin embargo, la importancia de las arcillas como adsorbentes de ET es secundaria cuando en el suelo hay una elevada proporción de materia orgánica y/u óxidos o hidróxidos de hierro, que presentan superficies más competitivas (Galán, 2000). Por otro lado, en la solución del suelo existen especies como Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y NH_4^+ que se encuentran en concentraciones varios órdenes de magnitud superiores con respecto a los ET, compitiendo por los mismos sitios de adsorción. A pesar de ello, se observó que ciertos ET, como el Zn (y en menor proporción el Cu) son retenidos por las arcillas silicatadas en sitios de adsorción específicos (Fernández *et al.*, 2015).

Óxidos e hidróxidos de Fe y Mn.

Los óxidos, hidróxidos y oxihidróxidos de Fe y los óxidos de Mn presentan una elevada capacidad para fijar ET e inmovilizarlos. Poseen cargas variables, por lo tanto, el alcance de la retención depende del pH edáfico, siendo menor a mayor grado de cristalización de los óxidos (Blume y Brummer, 1991). La adsorción de ET a oxi/hidróxidos de hierro puede ser específica si el ion pasa a formar parte de la esfera de coordinación del hierro a través del cambio de ligandos.

Procesos de óxido - reducción

En condiciones de bajo suministro de oxígeno, los microorganismos utilizan aceptores de electrones secundarios como Fe y Mn, entre otros, para mantener sus procesos metabólicos. Esta situación puede manifestarse en suelos inundados, en el interior de macro agregados o como resultado de la incorporación de un gran volumen de residuos orgánicos, que origina un incremento de la concentración de CO₂ en la atmósfera edáfica (Torri, 2020). Si bien la disponibilidad de ciertos elementos como Fe y Mn se puede incrementar en condiciones reductoras, se observó que la disponibilidad de Cu y Zn disminuye, a pesar de no presentar estos elementos equilibrios de óxido-reducción. *Iu et al.* (1981 a y b) indicaron que la reducción de oxihidróxidos de Fe y óxidos de Mn origina superficies amorfas de elevada capacidad de adsorción. Sobre dichas superficies se verifica una elevada tasa de adsorción de Cu y Zn, originando la disminución de su disponibilidad en condiciones reductoras.

Actividad radical

A su vez, la actividad radical incide sobre la disponibilidad de los elementos traza a través de cambios químicos y microbianos. Las raíces secretan exudados radicales, como ácidos orgánicos de baja masa molar como cítrico, málico, tartárico y oxálico, entre otros, azúcares y enzimas como las fosfatasas (Kidd *et al.*, 2009), que alteran la disponibilidad de los ET en forma directa o indirecta, por la formación de complejos orgánicos solubles o pueden servir como sustrato para los microorganismos (Sessitsch *et al.*, 2013; Antoniadis *et al.*, 2017). Algunas especies vegetales son capaces de secretar compuestos orgánicos capaces de quelatar micronutrientes en la rizosfera, incrementando su solubilidad. Por ejemplo, las gramíneas secretan aminoácidos de baja masa molar (fitosideróforos) en respuesta a deficiencia de Fe (Briat, 2007).

La estructura radical (longitud, densidad, área superficial), y la presencia de pelos radicales, influyen en la habilidad de las distintas especies vegetales para absorber micronutrientes. En condiciones de baja disponibilidad de Zn, Mn o Cu, ciertas especies

vegetales inducen la acidificación de la rizosfera, junto con la exudación de ácidos orgánicos, fitosideróforos y enzimas capaces de degradar compuestos orgánicos en el suelo (Clemens, 2010; Guerinot, 2010; White *et al.*, 2013). Estos elementos pueden ser absorbidos en forma catiónica por las raíces de todas las plantas, y también en forma complejada por las raíces de los cereales y pasturas (Clemens, 2010; Krämer, 2010; Williams y Pittman, 2010; White y Greenwood, 2013).

Formas analíticas de evaluar la disponibilidad de elementos traza

Desde el punto de vista biológico, el contenido total de ET en los suelos no proporciona ninguna información acerca de su disponibilidad. La determinación de la fracción biodisponible de los ET se basa en procesos de extracción química, asociados a ciertas fracciones del suelo que potencialmente pueden liberarse e incorporarse a la solución del suelo en el corto o mediano plazo.

En la búsqueda de un extractante que simule la absorción por las plantas, se han propuestos multitud de estrategias, desde una única extracción (extracción simple) hasta la sucesiva extracción con varios reactivos de creciente poder extractante (extracción secuencial). El objetivo es poder correlacionar la concentración extraída con la proporción absorbida por la especie vegetal (Lindsay y Cox, 1985). Sin embargo, a la fecha no se ha estandarizado ningún procedimiento.

Los métodos que implican extracciones simples son bastante atractivos debido a su simplicidad y facilidad de operación. Se ha utilizado una gran variedad de reactivos, como ácido nítrico (HNO_3) o ácido acético (CH_3COOH) (Argyaki *et al.*, 2018) o soluciones salinas de cloruro de calcio (CaCl_2) o nitrato de sodio (NaNO_3). Estos reactivos extraen sólo la fracción intercambiable y débilmente unida a la matriz sólida del suelo (Houba *et al.*, 2000). Otros agentes extractantes más enérgicos son el ácido etilen diamino tetraacético (EDTA) o el ácido dietilen triamino pentaacético (DTPA) (Argyaki *et al.*, 2018; Yutong *et al.*, 2016). Ambos compuestos forman quelatos muy estables con diversos iones metálicos. Existe un cierto consenso que la concentración de ET extraído a través de estos

reactivos presenta una buena correlación con la absorción vegetal (Ure *et al.*, 1995), y se considera una estimación de la fracción disponible para el resto de la biota.

El recurso analítico utilizado para determinar las formas químicas de los ET en los suelos es la extracción secuencial. Este método ha sido ampliamente utilizado para estudiar los elementos traza de los biosólidos (McGrath y Cegarra, 1992; Jordán *et al.*, 2016), para investigar su distribución entre las diversas fracciones en suelos enmendados con biosólidos (McGrath y Cegarra, 1992; Zhu y Alva, 1993; Mc Bride, 1995; Tsadilas *et al.*, 1995; Canet *et al.*, 1998; Walter y Cuevas 1999) y su movilidad y disponibilidad vegetal (Hamidpour *et al.*, 2016; Ahumada *et al.*, 2014).

Los esquemas de fraccionamiento no han sido estandarizados. En la literatura se describen numerosos procesos extractivos que remueven los elementos traza de los distintos “*pools*” fisicoquímicos (Gupta y Chen, 1975; Stover *et al.*, 1976; Tessier *et al.*, 1979; Shuman, 1985; McGrath y Cegarra, 1992). Estos “*pools*” incluyen elementos traza unidos a sitios de intercambio, sitios de adsorción específicos, ocluidos o adsorbidos sobre la superficie de óxidos, materia orgánica o en sitios de sustitución en minerales primarios y secundarios (Emmerich *et al.*, 1982). El esquema basado en Lund *et al.* (1980), que a su vez es una modificación del utilizado por Stover *et al.* (1976), ha sido exitosamente utilizado por Emmerich *et al.* (1982), Sposito *et al.* (1982), y Chang *et al.* (1984). McGrath y Cegarra (1992) utilizaron un esquema de fraccionamiento similar al de los autores citados, pero introdujeron ligeras modificaciones en la extracción de la fracción de mayor disponibilidad (ET solubles en agua e intercambiables) debido a que el Zn, Cu, Ni y particularmente el Cd extraído se correlacionaba muy bien con la absorción vegetal (Jackson y Alloway, 1991; Smilde *et al.*, 1992; Canet *et al.*, 1997).

Los estudios sobre los cambios de disponibilidad de ET en el tiempo en suelos enmendados con biosólidos han dado resultados contradictorios: la disponibilidad puede permanecer elevada 15 años luego de su aplicación (McBride *et al.*, 1997), no sufrir modificaciones durante los 20 años posteriores (McGrath y Cegarra, 1992), o disminuir al

cabo de 5 años de su aplicación (Walter y Cuevas, 1999). Las características del biosólido, el pH, la textura del suelo y el contenido y calidad de la materia orgánica son factores que determinan las formas y la biodisponibilidad de los elementos traza en los suelos (Paré *et al.*, 1999). Por otro lado, no existe información sobre la disponibilidad de EPT en suelos enmendados con biosólidos adicionados con sus propias cenizas.

El objetivo de este capítulo fue estudiar el efecto de la aplicación de una elevada dosis de aplicación de biosólidos o biosólidos enriquecido con sus propias cenizas (equivalente a 150 t/ha) sobre la distribución inicial de cobre (Cu) y cinc (Zn) entre fracciones de distinta disponibilidad y sus eventuales cambios al cabo de 180 días, en un suelo de textura arenosa. Además, se analizó la influencia de la actividad radical de la *Discaria americana* y raigrás (*Lolium perenne* L.) sobre la distribución de Cu y Zn entre las distintas fracciones edáficas al cabo de 180 días en un suelo de textura arenosa enmendado con biosólidos o biosólido enriquecido con sus propias cenizas.

Se hipotetizó que la biodisponibilidad de Cu y Zn sería mayor en los suelos enmendados con la mezcla de biosólido con cenizas comparado con suelos enmendados con biosólido puro, y que la mineralización de la materia orgánica proveniente del biosólido provocaría un incremento en la fracción intercambiable a lo largo del período estudiado. Al cabo de 180 días, la actividad radical de ambas especies disminuiría la disponibilidad de Cu y Zn en un suelo de textura arenosa enmendado con biosólidos o biosólidos enriquecidos con sus propias cenizas.

3.2 Materiales y Métodos

Suelos y enmiendas

La Región pampeana es una de las áreas cultivadas de clima templado de mayor superficie del hemisferio sur. Se ubica entre 32° a 39°S y 56 a 67°W. Esta zona cubre alrededor de 30 Mha de suelos productivos.

Los suelos de la región pampeana se generaron a partir de depósitos de loess, y de sedimentos eólicos traídos desde el suroeste, que originaron suelos de textura progresivamente más fina de suroeste a noreste. Este hecho, combinado con un gradiente de precipitaciones que aumenta en la misma dirección, produjo una secuencia geográfica de Molisoles, con Haplustoles énticos (US Soil Taxonomy, USDA, 1999) en el límite occidental de la región, y la aparición progresiva de Hapludoles énticos, Hapludoles típicos, Argiudoles típicos y Argiudoles vérticos hacia el este (Gallet *et al.*, 1998; Zárate, 2003). Estos suelos están asociados con bajas proporciones de acuoles en las zonas más bajas. La mineralogía de los suelos está dominada por material volcánico casi intacto como plagioclasas, vidrios y fragmentos líticos; mientras que los componentes menores incluyen cuarzo y ortoclasas. En la fracción de arcilla, el mineral predominante es la illita, con menor proporción de montmorillonita (Soriano, 1992). El clima de la región es subtropical húmedo, caracterizado por veranos largos y cálidos e inviernos suaves, con temperatura media de 11° C en julio y 25,5° C en enero, mientras que la precipitación media anual es de 1147 mm. Estas condiciones climáticas permiten un buen desarrollo y producción de especies forrajeras y de cultivos extensivos típicos de las regiones templadas.

El trabajo experimental se llevó a cabo con muestras del horizonte superficial de un Hapludol Típico (U.S. Soil Taxonomy) de la provincia de Buenos Aires. Se tomaron muestras compuestas de suelo prístino (0-15 cm, n=30) utilizando implementos adecuados para evitar contaminación. Las muestras se secaron al aire, se tamizaron (<2mm) y se homogeneizaron previo a su análisis.

El biosólido fue provisto por la planta de tratamiento de desagües cloacales Agua y Saneamientos Argentinos S.A. (AySA), ubicada en San Fernando, Provincia de Buenos Aires. El biosólido tuvo un período de secado en playa previo a su recolección. En el laboratorio, se dividió en dos submuestras: la primera se secó a 60° C hasta constancia de masa, se molió y tamizó (<2 mm, biosólido puro, B); la segunda submuestra se incineró en mufla a 500° C y se homogeneizó cuidadosamente con parte del biosólido seco molido,

obteniendo una mezcla constituida por biosólido adicionado con 30% (P/P) de sus propias cenizas (Z).

Especies vegetales

Se utilizaron dos especies vegetales: una gramínea (raigrás, *Lolium perenne* L. P1) y, una dicotiledónea (discaria, *Discaria americana*, P2). Las semillas de raigrás (*Lolium perenne* L.) se adquirieron en un vivero. Las semillas de *Discaria americana* se recolectaron en su hábitat natural, las dunas costeras de La Lucila del Mar, provincia de Buenos Aires, Argentina. Las semillas se desinfectaron durante 15 minutos previo a su germinación en cajas de Petri estériles a T= 28°C (Cusato *et al.*, 2007). Después de la emergencia de los cotiledones, se trasplantaron a recipientes de vidrio con la siguiente solución nutritiva: 0.09 mM NH₄NO₃/0.5 mM KH₂PO₄/0.5 mM MgSO₄ 7H₂O/0.75 mM, K₂SO₄/1 mM CaCl₂/micronutrientes (11.5 μM H₃BO₃/2.3 μM MnCl₂ ·4H₂O/0.2 μM ZnSO₄ 7 H₂O/0.08 μM CuSO₄·5 H₂O/0.03 μM NaMoO₄ 2H₂O/0.03 μM CoCl₂·6H₂O) y hierro quelatado (0.03 μM FeSO₄ 7H₂O/0.03 μM Na₂EDTA, pH 7).

Ensayo

El ensayo se llevó a cabo en la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA), Argentina, bajo invernáculo, durante un lapso de seis meses. Se utilizaron macetas de PVC perforadas en su base para asegurar las condiciones de aireación. Se utilizó suelo testigo (ST), suelo enmendado con biosólido puro (SB) y suelo enmendado con biosólido adicionado con un 30% de sus propias cenizas (SZ). En ambos casos, se aplicaron dosis de enmienda equivalentes a 150 Tn. MS ha⁻¹. La masa de B y Z (15 g) se pesó por separado para cada maceta, y se homogeneizó con el suelo (250 g).

Dado que la formación de nódulos radicales depende de la presencia de *Frankia sp.* en el suelo, los plantines cultivados en solución hidropónica sólo nodulan si son inoculados (Zhongze, 1985). De esta manera, los suelos correspondientes al ensayo con

discaria se inocularon (Si) previo al implante con el suelo donde crece esta especie. El objetivo fue introducir esporas para facilitar la nodulación y fijación simbiótica de N.

Las muestras de suelo enmendadas se dejaron estabilizar en las macetas a temperatura ambiente durante 45 días, período generalmente utilizado para lograr el equilibrio de los biosólidos en el suelo (Jackson *et al.*, 1999). Durante dicho periodo, y a lo largo del ensayo, la humedad del suelo se mantuvo a a 90% de capacidad de campo por gravimetría, mediante riegos periódicos con agua destilada. La cantidad de agua destilada utilizada se determinó previamente por el método de goteo (Mizuno *et al.*, 1978).

Finalizado el periodo de estabilización, se implantaron las especies vegetales. La siembra de raigrás se realizó al voleo, con 0.4 g de semillas de raigrás / maceta. Se trasplantaron 3 plántulas de *D. americana* de 45 días de edad en cada maceta en función de los tratamientos. Las macetas se mantuvieron a 90% de capacidad de campo en invernáculo a temperatura ambiente mediante riegos periódicos.

El diseño fue de bloques al azar, con los siguientes tratamientos:

1. ST: suelo testigo.
2. SB: suelo enmendado con biosólidos.
3. SZ: suelo enmendado con biosólido adicionado con 30% de cenizas.
4. STP1: suelo testigo + raigrás.
5. SBP1: suelo enmendado con biosólidos + raigrás.
6. SZP1: suelo enmendado con biosólido adicionado con 30% de cenizas + raigrás.
7. SiT: suelo inoculado testigo.
8. SiB: suelo inoculado enmendado con biosólidos.
9. SiZ: suelo inoculado enmendado con biosólido adicionado con 30% de cenizas.
10. SiTP2: suelo inoculado testigo + discaria.
11. SiBP2: suelo inoculado enmendado con biosólidos + discaria.

12. SiZP2: suelo inoculado enmendado con biosólido adicionado con 30% de cenizas + discaria.

En la mayoría de las repeticiones de los tratamientos SiZP2, hubo una mortandad significativa de plántulas que hizo necesaria una reimplantación durante los primeros 15 días.

Los muestreos de suelo se realizaron en día 1, día 45 y día 180. Cada maceta constituyó una unidad experimental. El diseño del ensayo fue de bloques al azar, con un arreglo factorial de 3x4, siendo los factores: 3 enmiendas [suelo testigo; suelo enmendado con B, suelo enmendado con Z] x 4 plantas [sin planta, sin planta inoculado, con *D. americana* e inoculado, con raigrás], con 12 repeticiones por tratamiento. En cada muestreo, se retiraron cuatro macetas completas por tratamiento. El contenido de cada maceta se secó al aire, se molió cuidadosamente utilizando un mortero de porcelana, se tamizó (<2mm) y se homogeneizó para su análisis. Se utilizaron implementos adecuados para evitar contaminación.

Determinaciones

El suelo prístino y las enmiendas se analizaron por difracción de rayos X (XRD) utilizando muestras de polvo no orientado, utilizando portamuestras circulares y giratorias mediante un difractómetro de rayos X de polvo marca Philips, modelo X Pert MPD, con radiación K α de Cu, en el intervalo de barrido 2 theta comprendido entre 5-70 $^{\circ}$ con paso/tiempo de 0,03 $^{\circ}$ /2s. El análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM, por Scanning Electron Microscope) se realizó con un microscopio electrónico Phillips modelo 505 con Microsonda EDAX 9100 para análisis químico semicuantitativo con 5-10% de error analítico y límites de detección entre 0,25 - 0,50 según elemento. Ambos estudios se realizaron en el Servicio Geológico Minero Argentino (SEGEMAR) para identificar los

materiales particulados, arcillas y otros minerales, y obtener información acerca de su estructura cristalográfica.

El suelo prístino, las enmiendas y las muestras de suelo se analizaron por métodos estándar (Page, 1982; APHA-AWWA-WEF, 2017).

Se determinó el tamaño de partícula mediante el método de la micro pipeta (Richter y Svartz, 1984); la capacidad de intercambio catiónico y cationes de cambio por el método del acetato de amonio a pH7: Ca y Mg fueron determinados en el extracto por absorción atómica; K y Na, por emisión atómica. El contenido de nitrógeno total se determinó por el método de Kjeldahl, mientras que el carbono orgánico se determinó utilizando la metodología propuesta por Dalal (1979) y Amato (1983) mediante digestión húmeda (CrO_3 en H_2SO_4 : H_3PO_4 , 2 + 1).

El pH y la conductividad eléctrica (CE) se determinaron en extractos con relación suelo: agua 1:2.5 (Jackson, 1982). Si bien la conductividad eléctrica del suelo suele determinarse en extracto de saturación (CE_e) (Rhoades y Miyamoto, 1990; Janzen, 1993), en ocasiones se utiliza una relación suelo: agua 1:2.5 (P/P, base seca) dado el gran volumen de suelo requerido para realizar el extracto de saturación (Sonnevelt y van den Ende, 1971). La determinación de $\text{CE}_{1:2,5}$ con fines comparativos entre tratamientos fue utilizada en numerosos trabajos (Torri y Lavado, 2002; Sonmez *et al.*, 2008; Monteleone *et al.*, 2016). La relación entre CE_e y $\text{CE}_{1:2,5}$ es aproximadamente 4, por lo tanto: $\text{CE}_e = 4 \times \text{CE}_{1:2,5}$ (Aboukila y Norton, 2017; Kargas *et al.*, 2018).

El contenido total de Cu y Zn en el suelo prístino, B y Z se determinó por digestión ácida según la técnica descrita por Shuman (1985). Para ello, 3 g de muestra seca se humedecieron con 5 mL de agua regia ($\text{HNO}_3 + 3 \text{HCl}$) en un vaso de precipitados de teflón, con posterior incorporación de 5 mL de $\text{HF}_{(\text{conc.})}$. Las muestras se digitaron a 120 C hasta lograr la descomposición de toda la sílice. Para evitar que las muestras lleguen a sequedad, se fueron incorporando volúmenes iguales de agua regia y HF. El proceso de digestión total de cada muestra duró aproximadamente 70 h. Tras su completa descomposición, el

exceso de $\text{HF}_{(conc.)}$ se eliminó por evaporación con $\text{HClO}_{4(conc.)}$. Los extractos obtenidos se determinaron mediante espectroscopía de emisión de plasma (ICP-AES, del inglés Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry) en el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), departamento UO-Metales, Argentina. Los límites de cuantificación fueron $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Cu) y $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Zn). Se utilizó material de referencia (WQB CRM-3) de NIST (por sus siglas en inglés, National Institute of Standards and Methods), con porcentajes de recuperación para Cu 93.3 ± 2.9 , y Zn: 100.8 ± 2.4 . Dada la lentitud en el proceso de digestión, y las dificultades asociadas, este proceso solamente se utilizó para caracterizar los elementos bajo estudio (Cu y Zn) en el suelo y biosólidos.

La extracción secuencial se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por McGrath y Cegarra (1992). Cada determinación se realizó por duplicado. El fraccionamiento se realizó sobre 3 g de suelo, utilizando tubos Falcon de polipropileno de 50 cm^3 para minimizar pérdidas de suelo. Se obtuvieron las siguientes fracciones:

- i. *fracción soluble e intercambiable (INT)*: las muestras se agitaron con 30 cm^3 de 0.1 M CaCl_2 por 16 hs en agitador de vaivén a temperatura ambiente. El tubo, junto con su contenido, se pesó, se centrifugó a 4600g por 30 min, y se filtró el sobrenadante utilizando papel de filtro Whatman N° 42. Se pesó el residuo húmedo remanente en el tubo.
- ii. *fracción unida a materia orgánica (MO)*: el residuo del paso anterior se extrajo con 30 cm^3 de 0.5 M NaOH por 16 hs en agitador de vaivén a temperatura ambiente, se centrifugó, filtró y pesó como se describió en (i).
- iii. *fracción unida a precipitados inorgánicos (INOR)*: el residuo remanente de la fracción anterior se extrajo con 30 cm^3 de $0.05 \text{ M Na}_2\text{EDTA}$ por 1 h, se centrifugó, filtró y pesó como se describió en (ii).
- iv. *fracción residual (RES)*: calculó como la diferencia entre el contenido total en el suelo (digestión de formas totales) y la suma de las fracciones extraídas (INT + MO + INOR).

Esta forma de cálculo fue utilizada con anterioridad por otros autores (Bell *et al.*, 1991; Ure *et al.*, 1993; Luo y Christie, 1998).

En los pasos (i), (ii) y (iii), se determinó la masa total para calcular el volumen exacto de solución sobrenadante. Se asumió que el volumen de solución extractante remanente (r) en el residuo húmedo correspondió a la masa del residuo húmedo menos la masa de muestra de suelo, dividido por la densidad de la solución extractante. Este volumen se utilizó para corregir la concentración del elemento traza en la fracción siguiente. De esta manera, la concentración de Cu o Zn ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) en cada extracto se calculó de la siguiente manera:

$$(i) \quad c_1 v_1$$

$$(ii) \quad c_2 (v_2 + r_1) - c_1 r_1$$

$$(iii) \quad c_3 (v_3 + r_2) - c_2 r_2$$

La concentración de Cu y Zn (c_i) se determinó en los extractos mediante ICP-AES en el INTI UO-Metales. En todos los casos, las determinaciones se realizaron por duplicado, con un desvío estándar menor al 1 %. Los límites de cuantificación del ICP-AES fueron $0.003 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Cu) y $0.002 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Zn). Se utilizó material de referencia (NIST SRM 2711, Montana soil), con porcentajes de recuperación de 101% para Cu y 98 % para Zn.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), previa comprobación de homogeneidad (prueba de Bartlett) y de normalidad (prueba de Shapiro-Wilk). En caso de no cumplirse la homogeneidad de varianza, las variables se transformaron para su análisis estadístico (Kuehl, 1994). Las medias se analizaron mediante el test de Tukey (HSD), con el nivel de significancia de $p < 0,05$ (Zar, 1999). Se utilizó el programa Statistics (versión 1.0, 2000).

3.3 Resultados y Discusión

Los Hapludoles típicos se caracterizan por tener escaso desarrollo de horizontes pedogenéticos. En general son suelos arenosos, con baja capacidad de retención de humedad. En la Figura 3.3 se presenta el diagrama de difracción de rayos X (XRD) para el suelo y las dos enmiendas.

El principal componente cristalino del Hapludol típico fueron cuarzo (SiO_2), y plagioclasa $[(\text{Na,Ca}) (\text{Si, Al})_4\text{O}_8]$ (Figura 3.3 A). En el caso de los biosólidos, el principal componente cristalino fue el cuarzo (SiO_2), con trazas de plagioclasa $[(\text{Na,Ca}) (\text{Si, Al})_4\text{O}_8]$ (Figura 3.3 B). La incineración de biosólidos tuvo influencia en la mineralogía general de enmienda mixta. La comparación de los dos diagramas de difracción de rayos X (XRD) indica que el principal efecto de la incineración fue la formación de hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y calcita (CaCO_3) (Figura 3.3 C). También parece haber un ligero aumento en la cantidad de plagioclasas en relación con la cantidad de hematita y cuarzo.

En la Figura 3.4 se presentan las imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra de biosólidos (A) y de cenizas de biosólidos (B) obtenidas con un microscopio electrónico de barrido (SEM). En estas imágenes se puede apreciar la presencia de materia orgánica, fibras y menor proporción de partículas minerales en la muestra de biosólidos (A), mientras que la muestra de cenizas presenta exclusivamente partículas minerales de forma irregular y de diferentes tamaños (B).

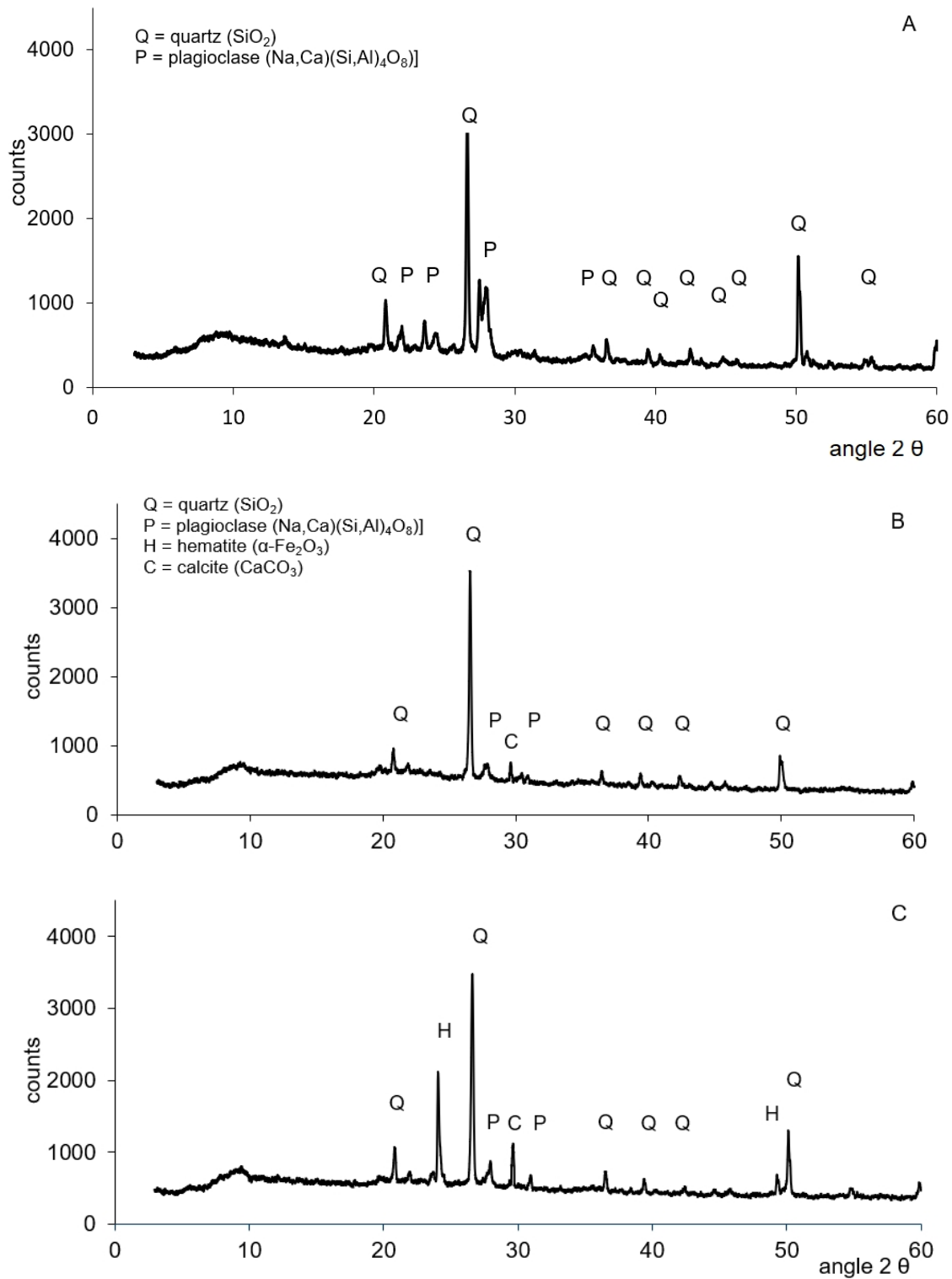


Figura 3.3: Diagrama de difracción de rayos X (XRD) para el suelo Hapludol típico (A), biosólido (B) y los biosólidos + 30% de sus propias cenizas (C) en muestras de polvo aleatoriamente orientados.

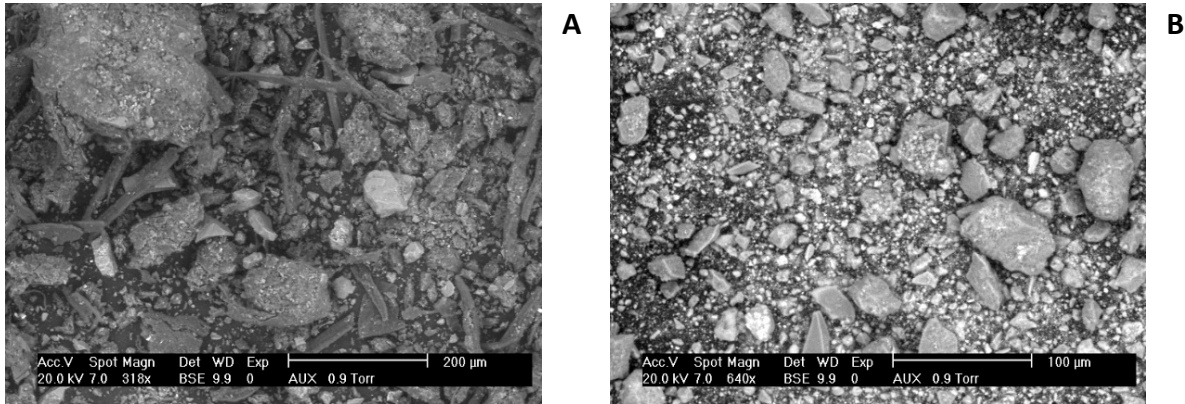


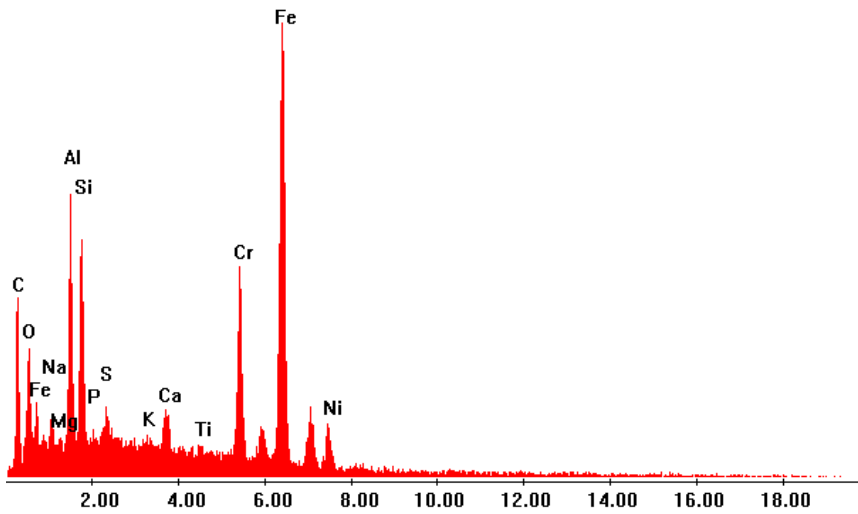
Figura 3.4: Micrográficas de microscopio electrónico de barrido (SEM) de las muestras de biosólidos (A) y de cenizas de biosólidos (B) con magnificación de 318X y 640X respectivamente.

El análisis elemental EDS de las superficies de las muestras de biosólidos y cenizas de biosólidos se obtuvo de los espectros de rayos X producidos por el barrido de electrones en lugares puntuales de algunas micrografías, así como en toda la superficie SEM. En la Figura 3.5 se grafica el número (conteo) de rayos X recibidos y procesados por el detector en función de la energía de los niveles atómicos de los elementos detectados. El espectro B corresponde a las cenizas puras de biosólidos. Por lo tanto, en la enmienda formada por biosólidos más 30 % cenizas habrá una contribución de los espectros A y B.

Se observa que la fase inorgánica de los biosólidos incluye compuestos de sílice, Fe, Al y Ca (Figura 3.5 A). En la Figura 3.5 B se evidencia que la incineración incrementó la concentración de ciertos elementos (Si, Al, Cu) debido a la pérdida de materia orgánica. En general, las cenizas de biosólidos están constituidas en un 50% por Si, Ca, Fe, P y Al, cada uno con porcentajes que varían según las características de los biosólidos y las condiciones de tratamiento (Krüger *et al.*, 2014). Se observa la elevada proporción de calcio en las cenizas de biosólidos, usualmente presente como CaO o CaCO₃ que le confiere capacidad encalante (Jakobsen y Willett, 1986; Dann *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 2002).

Label A: bio7

A



Label A: ash3

B

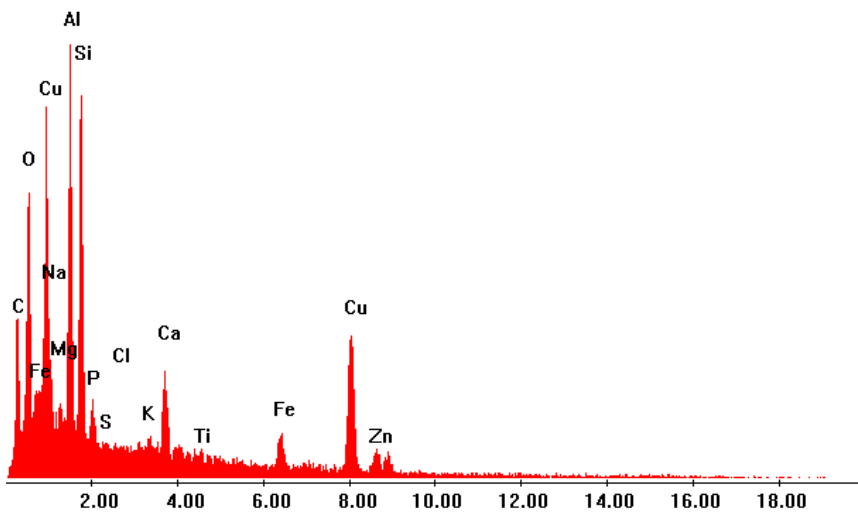


Figura 3.5: Espectros EDS de las muestras biosólidos (A) y cenizas (B), provenientes del barrido de un haz de electrones en su superficie.

Teniendo en cuenta que los biosólidos y las cenizas son ricos en óxidos de Fe / Al amorfos (Torri y Lavado, 2008 a), su aplicación al suelo podría aumentar el Fe / Al amorfo del suelo a largo plazo. Los óxidos amorfos de Fe y Al son muy reactivos debido a su pequeño tamaño y gran superficie. A menudo se presume que estas superficies reactivas son responsables de la sorción y estabilización de la MO (Kaiser y Guggenberger, 2000). Investigaciones más recientes sugirieron que los mecanismos de estabilización incluyen asociaciones ternarias de C - óxido de Fe - arcilla (Wagai *et al.*, 2007) y la formación de enlaces químicos no identificados (Spielvogel *et al.*, 2008), que minimizan la degradación de la MOS (Kaiser *et al.*, 2002; Chevallier *et al.*, 2008).

Tabla 3.2: Características analíticas y contenido total de elementos traza en el Hapludol típico, biosólido puro (B) y el biosólido adicionado con 30 % de sus propias cenizas (Z). Los datos presentados corresponden a la media de tres muestras compuestas.

Hapludol Típico		B	Z
Arcilla (%)	19.2	**	**
Limo (%)	23.2	**	**
Arena (%)	57.6	**	**
pH	5.12	5.82	6.17
Carbono total (mg g ⁻¹)	28.6	251	176
Nitrógeno total (mg g ⁻¹)	2.62	19.3	22.5
Fósforo total (mg g ⁻¹)	1.07	7.2	8.6
Conductividad eléctrica (dS m ⁻¹)	0.61	0.90	0.89
CIC (cmol _(c) kg ⁻¹)	20.3	11,95	**
Ca (mg g ⁻¹)	10.2	22,5	**
Mg (mg g ⁻¹)	2.0	5,6	**
K (mg g ⁻¹)	2.8	10,7	**
Na (mg g ⁻¹)	0.3	**	**
Cu total (mg·kg ⁻¹)	22	750.8	894.7
Zn total (mg·kg ⁻¹)	55	2500	3150

** : no determinado

Las características analíticas del suelo Hapludol Típico, biosólido puro (B) y el biosólido adicionado con 30 % de sus propias cenizas (Z) se presentan en la Tabla 3.2.

El suelo presentó niveles de Cu y Zn correspondientes a suelos no contaminados (Lavado *et al.*, 2004). En los biosólidos, los ET se encontraron dentro de los valores permisibles según la Norma Técnica para el Manejo Sustentable de Barros y Biosólidos generados en Plantas Depuradoras de Efluentes Líquidos Cloacales y Mixtos Cloacales Industriales (MAyDS Resolución 410/18), y las normas de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, 1993 Part 503) para su uso como enmienda orgánica (Tabla 1.2).

pH

La acidez de los suelos es una seria limitante para la producción de cultivos en numerosas partes del mundo. El desarrollo radical se encuentra afectado si las condiciones de acidez son tales que el Al soluble o intercambiable alcanza niveles tóxicos o las concentraciones de Ca son bajas, dificultando la absorción de agua y nutrientes (Farina y Channon, 1988). Numerosas investigaciones indican que la productividad de los suelos ácidos se puede mejorar si se ajusta el pH a valores cercanos a 6. El aumento de pH de suelos ácidos favorece la disponibilidad de macronutrientes mientras que reduce la solubilidad de elementos tóxicos como Al y Mn (Tisdale *et al.*, 1993). El carbonato de calcio es la enmienda más utilizada, aunque existe evidencia que residuos orgánicos como abonos verdes, estiércol o biosólidos pueden incrementar el pH de los suelos y a la vez mejorar las condiciones de crecimiento de las especies vegetales a través de la incorporación de materia orgánica y nutrientes (Hue, 1992; Lavado y Rodríguez, 1999; Whalen *et al.*, 2000).

El agregado de biosólidos a los suelos puede incrementar, disminuir o no tener efecto sobre el pH edáfico (Pierzynski, 1994). El descenso de pH se manifiesta como resultado de la mineralización de materia orgánica de los biosólidos, nitrificación de compuestos que contienen N amoniacal, hidrólisis de compuestos de Fe y Al, y oxidación de sulfuros (Hooda y Alloway, 1993; Pierzynski 1994; Al Wabel *et al.*, 1998; Wong *et al.*, 1998; Walter y Cuevas 1999). Sin embargo, ciertos investigadores observaron que la incorporación de

biosólidos no modificó el valor de pH (Pierzynski y Schwab, 1993; Berti y Jacobs, 1996; Sloan *et al.*, 1997). Otros investigadores observaron un incremento en el pH (Hue y Licudine, 1999; Basta y Sloan, 1999), particularmente cuando en el proceso de depuración de las aguas se empleó CaCO_3 o Ca(OH)_2 como floculante (Pierzynski, 1994; Simard *et al.*, 1999). Otros autores observaron que la variación del pH de los suelos estaba directamente relacionada con la dosis de biosólido aplicado (Logan *et al.*, 1997; Luo y Christie, 1998; Parkpain *et al.*, 1998).

Al finalizar el período de estabilización (día 45), la incorporación de ambas enmiendas (B y Z) modificó el pH de los suelos (SB y SZ) con respecto al suelo sin enmendar (ST) (Figura 3.6). Si bien el biosólido puro y las cenizas no presentaron un pH alcalino, ya que sus valores fueron de 5.82 y 6.17 respectivamente (Tabla 3.2), su incorporación al suelo originó incremento significativo en el pH, que osciló entre 1,3-1.9 unidades. El hecho que las dos enmiendas puras no evidenciaran pH alcalino está relacionado con el carácter hidrofóbico de los biosólidos, cuya materia orgánica esta compuesta en mayor proporción por ácidos palmítico, oleico, esteárico y esteroides (Torri y Alberti, 2012). Cabe desatacar que el pH es una escala numérica utilizada para especificar la acidez o alcalinidad de una solución acuosa. Sin embargo, los compuestos hidrofóbicos no interactúan con el agua, con lo cual el pH medido en las muestras de biosólidos puede no corresponder con el pH desarrollado en el suelo luego de su incorporación y del proceso de mineralización.

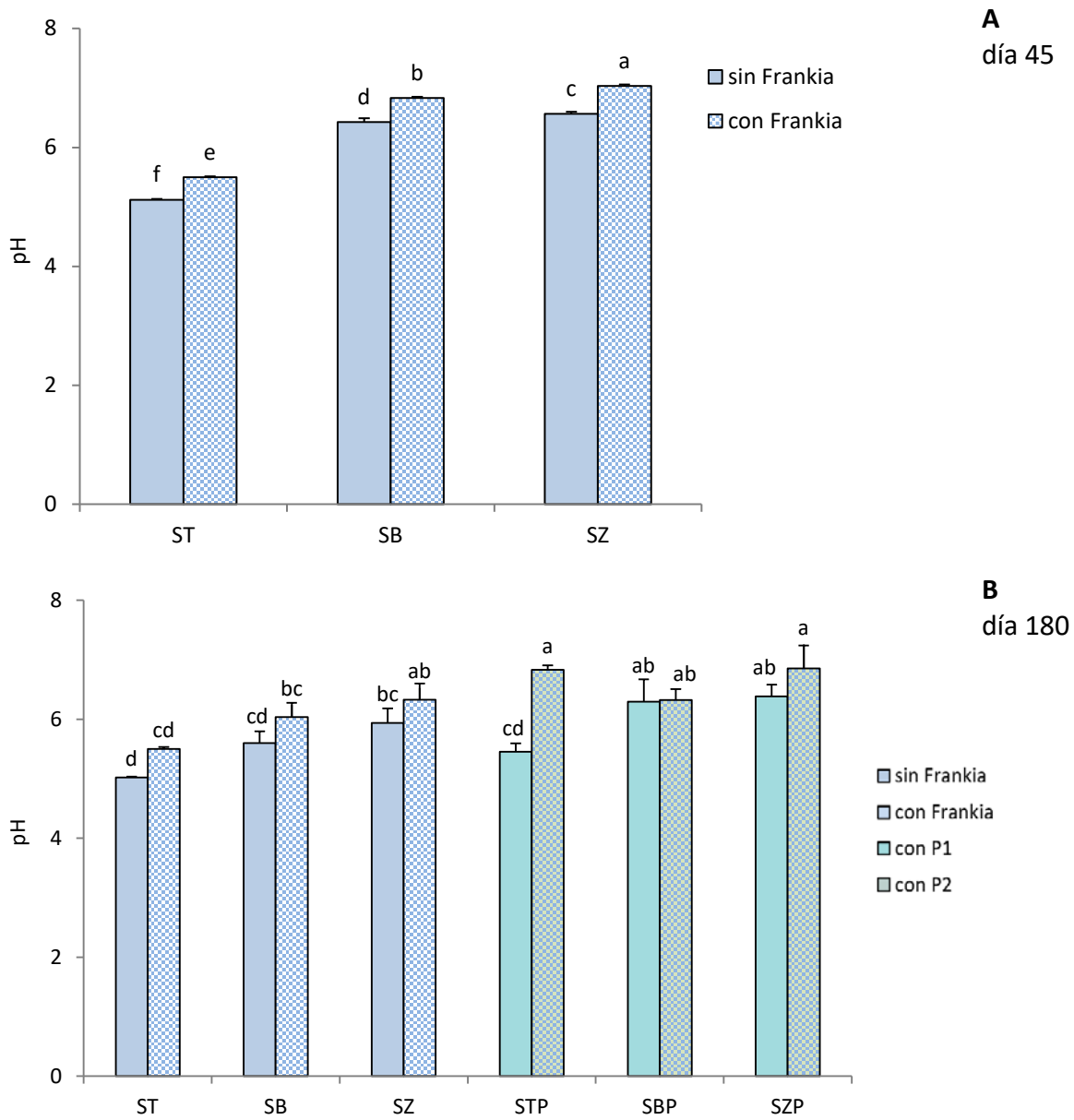
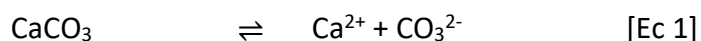
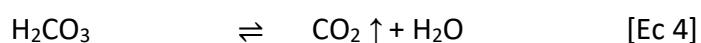
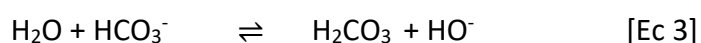
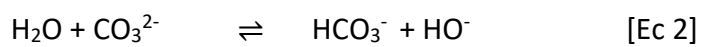


Figura 3.6: Variación del pH en un Hapludol Típico. A, al finalizar el periodo de estabilización (45 días); B, al finalizar el ensayo (180 días). Tratamientos: ST, suelo testigo; SB, suelo enmendado con biosólidos; SZ, suelo enmendado con biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas. Las barras representan la desviación estándar. Letras diferentes para la misma fecha en cada suelo indica diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$).

El incremento en el pH de los suelos enmendados está relacionado con la elevada concentración de Ca en el biosólido puro (2.25%, Tabla 3.2) bajo la forma de calcita. Cuando los biosólidos son incorporados al suelo, el Ca que se encuentra como calcita se libera lentamente a la solución del suelo en las condiciones de humedad en las que se realizó el ensayo, de acuerdo a la reacción



Si bien la solubilidad del CaCO_3 es de $0.018 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ en agua pura, la solubilidad se incrementa en condiciones ácidas, de acuerdo a las siguientes reacciones:



La tasa de disociación del CaCO_3 y de los compuestos carbonatados en general (calcitas) se encuentra directamente relacionada con la velocidad de remoción de los iones HO^- de la solución del suelo por procesos de neutralización. De esta manera, se produce un incremento de pH debido a la que disminución de la acidez del suelo. Hue y Licudine (1999) no sólo encontraron incrementos de pH en profundidad en los suelos tratados con biosólidos, sino que además observaron un incremento en la concentración de Ca en la solución del suelo. Jackson y Miller (2000) observaron resultados semejantes.

El incremento de pH fue significativamente más elevado en SZ comparado con SB en el suelo sin inocular e inoculado con *Frankia* (Figura 3.6 A). Estos resultados están relacionados con la presencia de óxidos como CaO , MgO , SiO_2 , Fe_2O_3 y MnO_2 generados durante la incineración (Torri y Lavado, 2008 a) y/o debido a la pérdida de aniones ácidos en forma gaseosa (Zhang *et al.*, 2001). De hecho, la elevada concentración de óxidos e hidróxidos de Ca y Mg presentes en las cenizas permitiría su utilización como agente encalante (Rosenfeld y Henry, 2000, Schumann y Sumner, 2000), a la vez de contribuir a la

capacidad tampón de los suelos (Carlson y Adriano, 1993). Sin embargo, el agregado de cenizas puras a los suelos puede elevar el pH hasta valores de pH= 9-10 (Chirenje y Ma, 1999), ocasionando un efecto negativo sobre la biota edáfica y una menor disponibilidad de macro y micronutrientes. Si bien los suelos enmendados con Z presentaron valores de pH significativamente mayores a los enmendados con B, dicho incremento fue de 0.1 - 0.2 unidades. Posiblemente, la mezcla de cenizas con los biosólidos haya minimizado un mayor incremento en el pH edáfico.

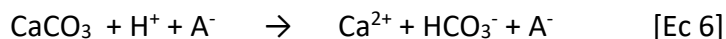
Por otro lado, se observó que, al finalizar el período de estabilización, todos los suelos inoculados con *Frankia* presentaron valores de pH significativamente mayores a los tratamientos sin inocular. La bibliografía sobre el efecto de la presencia de *Frankia* sobre las propiedades de los suelos sin planta es por demás escasa. *Frankia* es un género de bacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno que viven en simbiosis con plantas actinorícicas, aunque también pueden vivir en formas libres en los suelos (Carro *et al.*, 2016). Numerosos estudios se centraron en la supervivencia de las cepas de *Frankia* en distintos medios de cultivo. Si bien se observó que el crecimiento de *Frankia* depende de la solución buffer utilizada (Burggraaf y Shipton, 1982), cuando estas soluciones no logran regular en forma adecuada el pH, éste se torna cada vez más alcalino como consecuencia del crecimiento de la bacteria (Ngom *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos por estos autores podrían explicar el incremento de pH observado en el tratamiento testigo inoculado sin planta comparado con el suelo sin inocular.

Al final del ensayo (día 180), el suelo testigo sin planta y sin inocular (ST) presentó una ligera acidificación comparado con día 45. Este resultado se originó como resultado de la lenta mineralización de la materia orgánica nativa del suelo, que genera ácidos orgánicos y compuestos de baja masa molar (Hue, 1992). El contenido de materia orgánica (2.86%) y arcilla (19.2%) del Hapludol típico le confiere cierta capacidad buffer que impide cambios bruscos de pH (Bennardi *et al.*, 2018). La capacidad reguladora o buffer de un suelo se define como la cantidad de ácido o base necesaria para cambiar su pH en una unidad (Sá Mendonça *et al.*, 2006); y es también considerada como la resistencia que presenta un

suelo al cambio de pH cuando se le adicionan sustancias de naturaleza ácida o alcalina (Wang *et al.*, 2015). Este poder amortiguador depende de la cantidad y tipo de arcillas, del contenido de materia orgánica y del pH inicial que presenta el suelo (Van Rensburg *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015). En los suelos testigo sin planta no se observaron diferencias significativas entre el suelo sin inocular e inoculado con *Frankia* (ST y SiT).

Los suelos enmendados sin planta (SB y SZ) presentaron una disminución significativa de pH con respecto a día 45 (fin del período de estabilización). Dicha disminución se originó como resultado de la mineralización de la materia orgánica proveniente de los biosólidos y la propia del suelo que, como ya se mencionó, origina ácidos orgánicos y compuestos de baja masa molar (Hue, 1992, Singh and Agrawal, 2010 a). A su vez, la mineralización del nitrógeno orgánico incorporado a través de los biosólidos genera protones a través del proceso de nitrificación. Este proceso, junto con la mineralización de azufre orgánico realizados por las bacterias del suelo resultan en una caída en el pH del suelo, modulado por su capacidad buffer (Kirchmann *et al.*, 1996; Latare *et al.*, 2014; Eid *et al.*, 2017 b). Sin embargo, la disminución de pH fue menos pronunciada para el tratamiento SZ que para el tratamiento SB. Estos resultados coinciden con los observados en trabajos anteriores (Torri y Lavado, 2002) y sugieren que el pH de los suelos tratados con biosólido más cenizas se encuentra más regulado por los compuestos de naturaleza alcalina originados durante la incineración del biosólido, particularmente CaO. Uno de los potenciales beneficios de mezclar cenizas alcalinas con biosólido es que el efecto enalante de la enmienda puede enmascarar la disminución de pH originado como resultado de la descomposición de residuos orgánicos (Jackson y Miller, 2000). Rosenfeld y Henry (2000) indicaron que el CO₂ liberado como consecuencia de la mineralización de la materia orgánica del biosólido reacciona con el CaO presente en las cenizas formando CaCO₃ [Ec 5]. De esta manera, el carbonato de calcio formado sería el responsable del aumento en la capacidad buffer de los suelos enmendados con cenizas, según [Ec 6].





De esta manera, mientras el carbonato se encuentre presente en los suelos enmendados con Z, la acidez generada por los protones liberados a la solución del suelo por distintos procesos será consumida según la [Ec 6] y el pH del suelo se mantendrá regulado (Van Breemen *et al.*, 1983).

Los suelos enmendados sin planta presentaron valores de pH significativamente superiores a los correspondientes a los testigos sin enmendar (ST y SiT). La presencia de inóculo incrementó el pH de los suelos sin planta, con diferencias significativas solamente para los suelos enmendados con biosólidos (SB vs SiB).

Las especies vegetales modificaron el pH de los suelos con respecto a los correspondientes testigos sin planta. La presencia de raigrás (P1) incrementó ligeramente el pH del suelo sin enmendar, aunque dicha diferencia no llegó a ser significativa. También se observaron incrementos en los suelos enmendados con biosólidos (SBP1) o biosólidos más cenizas (SZP1), siendo significativo solamente para SBP1 con respecto al tratamiento sin planta. La *Discaria americana* incrementó significativamente el pH del suelo testigo (SiTP2) con respecto al testigo sin planta. Los tratamientos SiBP2 y SiZP2 siguieron la misma tendencia, pero dichos incrementos no fueron significativos.

El suelo enmendado con biosólidos no presentó diferencias significativas entre P1 y P2 en el valor de pH. Por el contrario, P2 incremento significativamente el pH del suelo enmendado con biosólidos más cenizas con respecto a P1.

Si bien en este ensayo no se separó el suelo rizosférico, se utilizaron macetas muy pequeñas con la idea que las raíces pudieran explorar todo el volumen de suelo. Por lo tanto, puede considerarse que el suelo correspondiente a los tratamientos con planta constituye suelo rizosférico (Hallett *et al.*, 2003). Como ya se mencionó más arriba, las raíces de las plantas pueden provocar cambios en las propiedades de la interfase suelo-raíz (rizósfera). El pH rizosférico puede modificarse por consumo de oxígeno, liberación de

dióxido de carbono, absorción desbalanceada de aniones o cationes, secreción de ácidos orgánicos, aumento de la actividad de los microorganismos, entre otros (Marschner *et al.*, 1987; Hinsinger y Gilkes 1996).

Los suelos testigo con raigrás (STP1) o *Discaria americana* (SiTP2) presentaron un pH ligeramente superior al correspondiente testigo sin planta (ST y SiT respectivamente). Durante las últimas décadas, se acumuló una amplia evidencia que las raíces pueden alterar significativamente el pH del suelo rizosférico, que influye en la absorción de nutrientes (Marschner *et al.*, 1986; Darrah, 1993; Hinsinger, 1994). Aunque la respiración radical puede disminuir significativamente el pH, la variación del pH rizosférico está mayormente relacionada con el equilibrio iónico radical, y la liberación de protones u oxhidrilos al medio externo (Middleton y Smith, 1979; Nye, 1981; Hedley *et al.*, 1982). Gahoonia *et al.* (1992) demostraron que las raíces de raigrás excretan protones cuando se les suministra N-NH_4^+ , mientras que liberan oxhidrilos cuando la fuente nitrogenada es N-NO_3^- . En un ensayo hidropónico (Smith *et al.*, 1983), se evaluó el efecto de una solución nutritiva sobre el pH y la CE de la solución rodeando las raíces de raigrás. Se observó que las plantas que crecieron a base de una solución nutritiva con N-amoniacal acidificaron la zona rizosférica; y que este descenso de pH se maximizó en suelos con baja capacidad buffer como los suelos arenosos. Por el contrario, cuando la fuente nitrogenada fue nitrato, se observó una alcalinización de la zona rizosférica de raigrás (Smith *et al.*, 1983). En este ensayo, la mayor fuente de N disponible para las plantas en el suelo testigo fue N-NO_3^- (Covacevich y Echeverria, 2000), mientras que, en los biosólidos, el N se encuentra mayormente formando parte de proteínas, aminoácidos y compuestos nitrogenados de bajo peso molecular, como la urea y el ácido úrico (Thangarajan *et al.*, 2015), que puede resultar en la liberación inicial de amonio. En condiciones de elevada disponibilidad de amonio y nitrato, la mayoría de las especies vegetales exhiben una mayor afinidad por la absorción de NH_4^+ que NO_3^- debido al bajo consumo de energía (5 ATP mol⁻¹ NH_4^+ frente a 20 ATP mol⁻¹ NO_3^- , Xu *et al.*, 2019). Por lo tanto, los valores de pH en los suelos con

planta están relacionados con la fuente de N, de acuerdo a lo observado también por Hinsinger y Gilkes (1996).

Conductividad Eléctrica (CE)

La conductividad eléctrica (CE) es un indicador de la concentración de iones presente en la solución del suelo, y mide la capacidad que presenta el suelo para conducir la corriente eléctrica. Debido a que las especies vegetales absorben agua a través de sus raíces por el proceso de ósmosis, un elevado contenido de sales en la solución del suelo puede originar que el citoplasma vegetal sea hipertónico con respecto su entorno, provocando una salida neta del agua presente en las células. Se produce entonces una disminución en la presión de turgencia, pudiendo originar daños en los tejidos, retraso en el crecimiento, bajo rendimiento y, en casos extremos incluso marchitez, aun cuando la provisión de agua en el suelo sea adecuada (Machado y Serralheiro, 2017).

En la Figura 3.7 se presentan los valores de $CE_{2,5:1}$, en adelante mencionados como CE, en cada uno de los tratamientos.

En la Figura 3.7 A se observa que, al finalizar el periodo de estabilización, los suelos enmendados con biosólidos (SB) o la mezcla de biosólidos con cenizas (SZ) presentaron valores significativamente más altos de CE comparados con el suelo testigo (ST). Resultados similares se observaron en el suelo inoculado con *Frankia*.

Los biosólidos poseen elevadas concentraciones de sales solubles (Eid *et al.*, 2017 b; Torri y Cabrera, 2017), ya que durante los procesos de sedimentación de los efluentes se incorporan diversos productos inorgánicos, como floculantes y agentes acondicionantes (Wong *et al.*, 1998) que se suman a la salinidad propia de este material (Badza *et al.*, 2020).

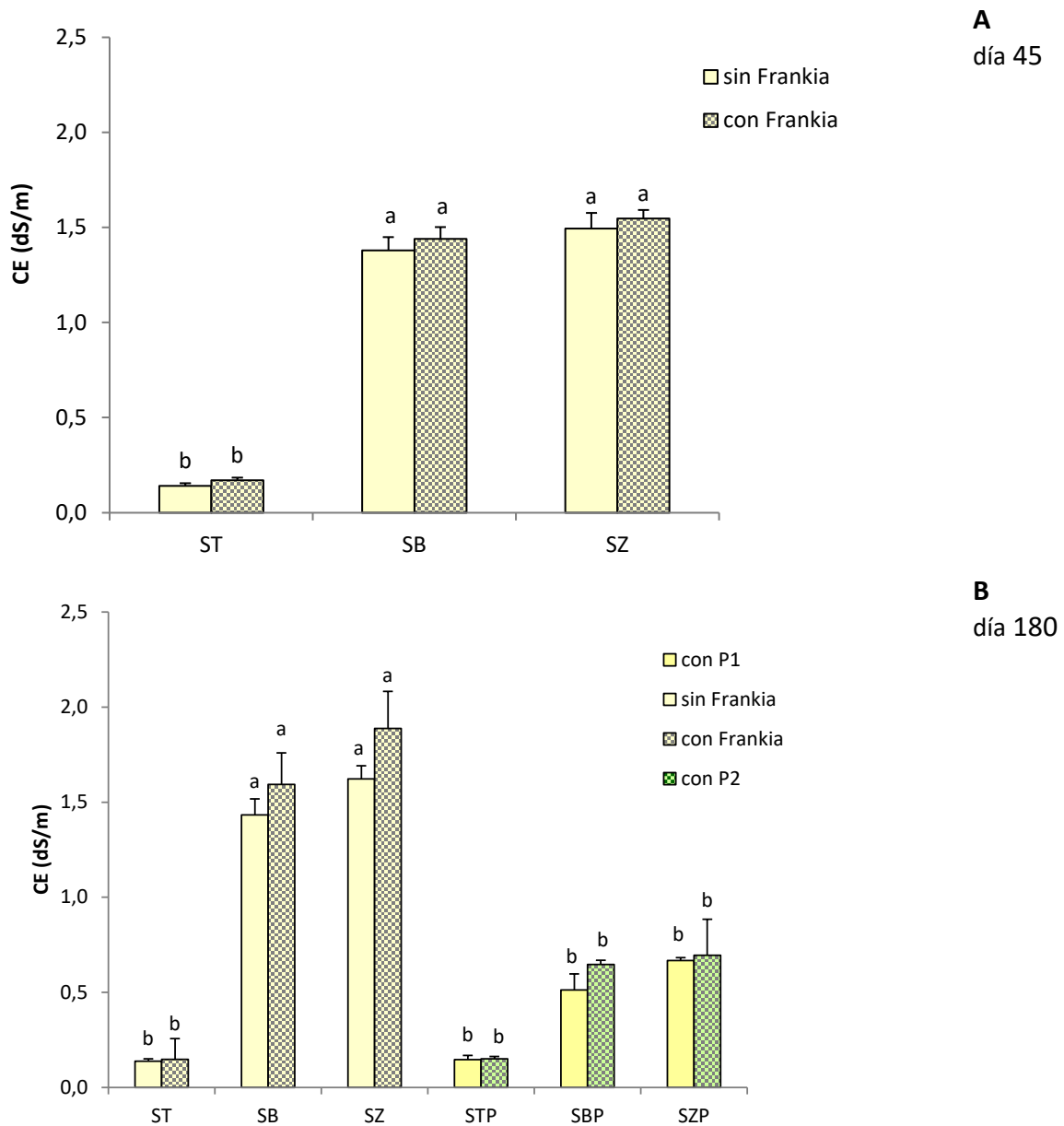


Figura 3.7: Variación en la CE de un Hapludol Típico. A, al finalizar el periodo de estabilización (45 días); B, al finalizar el ensayo (180 días). Tratamientos: ST, suelo testigo; SB, suelo enmendado con biosólidos; SZ, suelo enmendado con biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas. Las barras representan el desvío estándar, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$).

A su vez, los altos niveles de materia orgánica y nutrientes incorporados al suelo a través de los biosólidos inducen la proliferación de una mayor biomasa y actividad microbiana en el suelo (Bettiol y Ghini, 2011; Roig *et al.*, 2012), que facilitan la mineralización de la materia orgánica de los biosólidos y produce la liberación de iones a la solución del suelo, de acuerdo a lo observado también por Logan *et al.* (1997). Dichas sales incrementan la CE de los suelos enmendados con biosólidos (Eid *et al.*, 2017 a; Yilmaz y Temizgül, 2014).

Ciertos autores indicaron que la CE aumenta en forma lineal con la dosis de biosólido aplicado (Abd El-Hay y Angle, 1994; Logan *et al.*, 1997; Eid *et al.*, 2017 b). Clapp *et al.* (1986) observaron que la CE alcanzó su valor máximo luego de la incorporación de biosólidos con una disminución posterior, aunque en todo momento la CE fue significativamente superior a la de los suelos testigo. Estos autores indicaron que el descenso de la CE se verificó como resultado de la lixiviación de las sales. Por otro lado, Logan *et al.* (1997) indicaron que los máximos valores de CE se verificaron luego de dos años de la incorporación de biosólidos, adjudicando estos resultados a la mineralización de la materia orgánica. Abd El-Hay y Angle (1994) observaron que las sales provenientes del biosólido fueron perjudiciales para el crecimiento y rendimiento de un cultivo de soja cuando la dosis de biosólido fué mayor a 200 t·ha⁻¹.

En este ensayo, y al finalizar el periodo de estabilización, no se verificaron diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$) en los valores de CE entre los tratamientos SB y SZ. Estos resultados indican que los compuestos incorporados a los suelos como cenizas no contribuyeron a incrementar la CE de los suelos tratados posiblemente debido a que la matriz del biosólido pudo retenerlos (McBride, 1995), en concordancia con resultados anteriores (Torri, 2001; Torri, 2009). El riesgo de aplicar cenizas puras a los suelos se debe principalmente al incremento del pH y de la CE más que a los elementos traza aportados (Campbell, 1990). La mezcla de cenizas con biosólidos parecería evitar estos efectos negativos.

A los 180 días, los suelos enmendados con biosólidos (SB) o la mezcla de biosólidos con cenizas (SZ) presentaron valores significativamente más altos de CE comparados con el suelo testigo (ST, Figura 3.7 B). Asimismo, se observó un ligero incremento en el valor de CE en cada uno de los tratamientos con respecto al fin del periodo de estabilización (día 45). Estos resultados están relacionados con la mineralización de la materia orgánica del biosólido (Logan *et al.*, 1997; Galbally *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2017). No se observaron diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$) en los valores de CE entre los tratamientos SB y SZ en los suelos sin planta. Estos resultados confirman que los compuestos incorporados a los suelos como cenizas presentaron baja solubilidad o la matriz del biosólido pudo retenerlos (Torri, 2001; Torri, 2009).

La presencia de plantas no modificó significativamente la CE de los suelos testigo con respecto a los suelos sin planta. En los demás tratamientos enmendados, se observó que la presencia de las dos especies vegetales (raigrás y discaria) produjo una disminución de la CE con respecto a los suelos enmendados sin planta. Dado que las macetas se mantuvieron a 90% de capacidad de campo a lo largo del ensayo, estos resultados indican absorción radical. Dicha reducción en la CE es consistente con los resultados citados por Asher (1977) que indica que las plantas que crecen activamente en los suelos, particularmente los arenosos, pueden reducir rápidamente el “*pool*” de nutrientes en la solución del suelo. Comparando los valores de CE en los suelos implantados con raigrás y discaria, se observó que la CE de los suelos con discaria fue ligeramente más elevada que la correspondiente a raigrás, aunque no se manifestaron diferencias significativas.

Distribución de Cu entre diferentes fracciones del suelo

Día 1, inicio del ensayo

La distribución de Cu entre las distintas fracciones edáficas correspondiente al Hapludol típico en estado prístino (ST), en las muestras de suelo enmendadas con biosólidos (SB) o la mezcla de biosólidos con cenizas (SZ) se presenta en la Figura 3.8.

Dado que, en todos los casos, la concentración de Cu en los suelos fue similar en los tratamientos inoculados y sin inocular ($ST \approx SiT$, $SB \approx SiB$, $SZ \approx SiZ$), sin diferencias significativas entre ellos, se presentan solamente los datos del suelo sin inocular.

En el suelo prístino, la concentración de Cu nativo en la fracción intercambiable se encontró por debajo del límite de cuantificación ($< 0.50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). La fracción de Cu-INT representa usualmente una pequeña fracción del total, y corresponde a las formas solubles presentes en la solución suelo (iones y complejos orgánicos de baja masa molar) y a formas lábiles adsorbidas a sitios de sorción específicos presentes en la materia orgánica y en las partículas de arcilla constituyentes del suelo (Sauvé *et al.*, 2000). La baja concentración de Cu presente normalmente en la solución de los suelos prístinos se encuentra regulada por fenómenos de adsorción y desorción específicos asociados con el material coloidal edáfico (McBride, 1989; Wu *et al.*, 1999b). La mayor proporción de este elemento se encuentra en los suelos en formas de menor disponibilidad (Sauvé *et al.*, 1997a). Ciertos investigadores observaron que la mayor proporción de Cu se encontró asociada a la fracción orgánica y como formas residuales (Shuman, 1979; Luo y Christie, 1998), otros en formas orgánicas y precipitadas (Zhu y Alva, 1993; Walter y Cuevas, 1999). En el suelo utilizado en este ensayo, los mayores porcentajes de Cu se encontraron en la fracción residual (70%), con menor proporción entre las fracciones orgánica y precipitadas como compuestos inorgánicos (17.49% y 12.39%, respectivamente). Estos resultados coinciden con los reportados por McGrath y Cegarra (1992) y Canet *et al.* (1997), quienes observaron que, en un suelo franco arenoso típico en condición prístina, el Cu se encontró mayormente en la fracción residual, con proporciones decrecientes en las fracciones asociadas a la materia orgánica, precipitados inorgánicos e intercambiable.

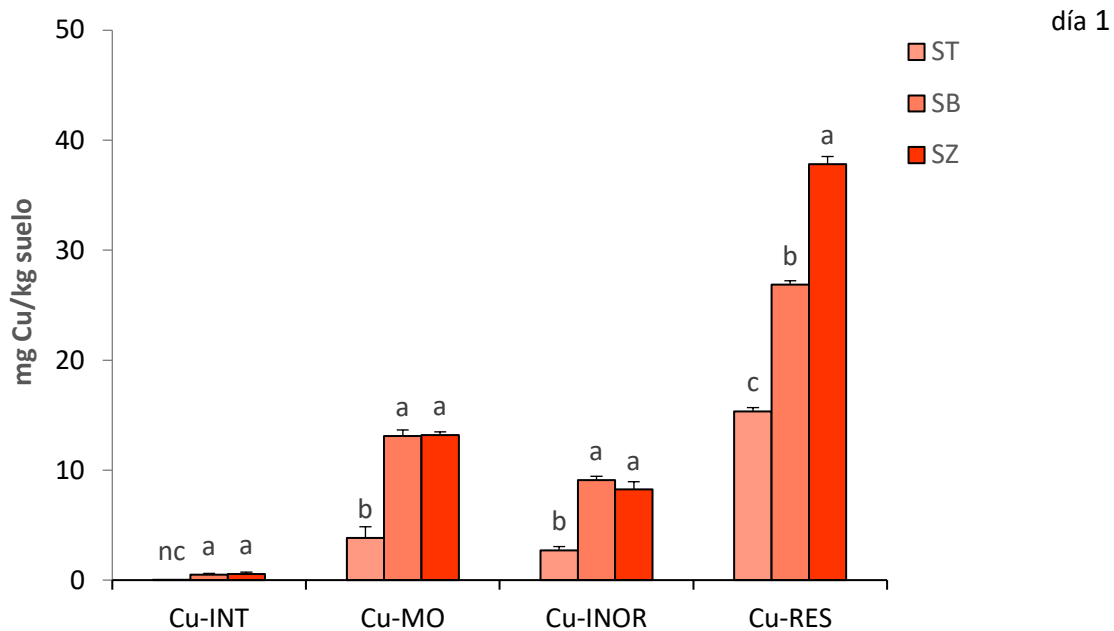


Figura 3.8: Concentración de Cu en las fracciones intercambiable (Cu-INT), orgánica (Cu-MO), precipitados inorgánicos (Cu-INOR) y residual (Cu-RES) en Hapludol típico en condiciones prístinas, enmendado con biosólido (B) o biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas (Z) en día 1. Las barras representan el desvío estándar. Para cada gráfico (A, B o C), letras diferentes para la misma fracción de Cu indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$), nc: por debajo del límite de cuantificación del equipo.

La incorporación de biosólidos y de biosólido con 30% de sus propias cenizas incrementó la concentración de Cu total en los suelos enmendados debido a la elevada concentración del elemento en ambas enmiendas (750.8 y 894.7 mg Cu·kg⁻¹, respectivamente).

A su vez, todas las fracciones estudiadas exhibieron incrementos significativos en la concentración de Cu con respecto al testigo. La mayor proporción de Cu en los suelos enmendados se encontró en las fracciones residual (50-65%) y orgánica (20-28%), con menor proporción como precipitados inorgánicos (12-20%) o intercambiables (1%) (Figura 3.8). Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores en suelos enmendados con biosólidos, quienes indicaron que el Cu estaba asociado a ligandos

orgánicos y a la fracción residual, posiblemente ocluído en minerales primarios (Fuentes *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006).

Los suelos enmendados presentaron concentraciones de Cu-INT de 0.4 y 0.6 mg Cu·kg⁻¹ para los tratamientos SB y SZ, respectivamente. Cabe destacar que las formas físico-químicas de los ET en las enmiendas son las que inicialmente determinan su especiación en los suelos, su movilidad, reactividad o disponibilidad para las plantas (Qian *et al.*, 2003). Evidentemente, el Cu se encontraba en la fracción intercambiable en el biosólido o en la mezcla del biosólido con cenizas, ya que la concentración de Cu-INT se encontró por debajo del límite de cuantificación en el suelo prístino (ST). Es importante destacar que no se observaron diferencias significativas entre SB y SZ, lo que implica que el Cu presente en las cenizas no corresponde a formas solubles.

No se observaron diferencias significativas para las fracciones Cu-MO y Cu-INOR entre los tratamientos SB y SZ. En cambio, la concentración de Cu-RES fue significativamente superior en SZ comparado con SB. Estos resultados indican que el Cu incorporado a través de las cenizas se encontró principalmente en la fracción residual. Los ET que se encuentran en la fracción residual son considerados no disponibles, o sea, no se encuentran sujetos a procesos de lixiviación o absorción (Legret *et al.*, 1993; Fuentes, 2004; Bogusz y Oleszczuk, 2018). Sin embargo, cabe destacar que las cenizas están compuestas predominantemente por sólidos generados a elevada temperatura. En condiciones atmosféricas normales, o en los suelos, muchos de estos sólidos son metaestables y con el tiempo pueden alterarse para transformarse en minerales secundarios termodinámicamente estables (Meima *et al.*, 2002; Chandler *et al.*, 1997). En este proceso, es posible que el Cu se libere a formas biodisponibles.

Día 45, fin del período de estabilización

Al final del período de estabilización (45 días), en los suelos testigo no se observaron diferencias significativas en la distribución de Cu con respecto a las condiciones iniciales,

indicando que el Cu se encuentra en equilibrio con las condiciones edafo climáticas imperantes.

Los suelos enmendados exhibieron concentraciones de Cu significativamente más elevadas que los correspondientes testigos en todas las fracciones estudiadas (Figura 3.9). La distribución del Cu en los suelos enmendados se modificó con respecto al inicio del ensayo. A medida que transcurre el tiempo de contacto entre la enmienda y el suelo, la distribución de los elementos traza entre las distintas fracciones está determinada por factores que dependen de las características de la enmienda, de la química del ET en cuestión, y de factores edáficos y climáticos, como se vio en el Capítulo 2. Una vez establecido el equilibrio, el cambio en uno o varios de esos factores puede provocar que el sistema evolucione hacia un nuevo equilibrio, con una nueva redistribución de ET.

día 45

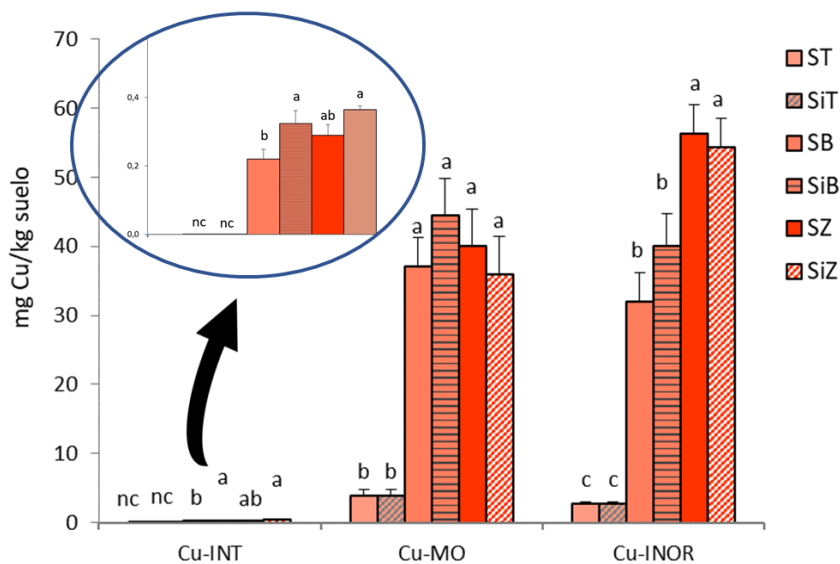


Figura 3.9: Concentración de Cu en las fracciones intercambiable (Cu-INT), orgánica (Cu-MO), precipitados inorgánicos (Cu-INOR) y residual (Cu-RES) en Hapludol típico en condiciones prístinas, enmendado con biosólido (B) o biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas (Z) en día 45. Las barras representan el desvío estándar. Letras diferentes para la misma fracción de Cu indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$), nc: por debajo del límite de cuantificación del equipo.

Al final del período de estabilización, los suelos sin enmendar presentaron concentraciones de Cu-INT por debajo del límite de cuantificación. Sin embargo, en los suelos enmendados se pudo cuantificar la concentración de Cu-INT, con valores que oscilaron entre 0.28 y 0.36 mg Cu-INT·kg⁻¹. Esta concentración representa una proporción muy baja del total de Cu incorporado a los suelos a través de los biosólidos. Los suelos enmendados e inoculados con *Frankia* (S_{Bi}, S_{Zi}) presentaron valores más altos de Cu-INT comparado con los suelos sin inocular, con diferencias significativas solo para S_{iB} comparado con S_B (Tukey, p<0.05). Se sugirió que los ET unidos a la materia orgánica estable de los biosólidos podrían liberarse a la solución del suelo incrementando su disponibilidad con el tiempo (Hooda y Alloway, 1994; McBride, 1995; Haghghi *et al.*, 2016). Ponizovsky *et al.* (2006) indicaron que la mayor proporción del Cu incorporado al suelo a través de los biosólidos permaneció fuertemente adsorbido a la fase sólida del suelo, y alrededor del 1% del total se encontró en la solución del suelo. Muchos autores indicaron que el carbono orgánico disuelto contribuye a la elevada disponibilidad de ciertos ET en suelos enmendados con biosólidos (Al-Wabel *et al.*, 2002; Haynes *et al.*, 2009; Peckenham *et al.*, 2008; Bolan *et al.*, 2011). De hecho, se estima que alrededor del 80% del Cu presente en la solución del suelo se encuentra como quelatos orgánicos solubles (Hodgson *et al.*, 1966, Ponizovsky *et al.*, 2007; Campillo-Cora *et al.*, 2020). Otros autores indicaron que el aumento en la CE del suelo como resultado de la aplicación de biosólidos, puede disminuir el porcentaje de Cu adsorbido al complejo de cambio al aumentar la competencia por los sitios de adsorción (Stevenson, 1991; Goss *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en este ensayo indican que el Cu liberado por el proceso de mineralización de la materia orgánica de los biosólidos, de acuerdo a lo observado por Torri *et al.* (2003) se redistribuyó hacia fracciones de menor disponibilidad.

No se observaron diferencias significativas entre S_B y S_Z, o entre S_{iB} y S_{iZ}. Estos resultados indican que la incorporación de cenizas a los biosólidos a los suelos no incrementó la disponibilidad de Cu con respecto a los suelos tratados con biosólidos, de acuerdo a lo observado en trabajos anteriores (Torri y Lavado, 2008 a). La concentración de Cu-MO en

los suelos enmendados con B y Z presentó incrementos significativos con respecto a día 1, mientras que no se observaron diferencias significativas para los suelos testigo.

Numerosos trabajos informaron incrementos de Cu-MO en los suelos luego de la incorporación de biosólidos (Domingues *et al.*, 2002; Pedra *et al.*, 2006), a pesar de la mineralización de su materia orgánica. Ciertos autores observaron que la mayor tasa de mineralización de C en los suelos enmendados con biosólidos ocurre entre los días 7 y 11 posteriores a su aplicación (Lerch *et al.*, 1992; Bernal *et al.*; 1998) mientras que Torri *et al.* (2003) observaron que la mayor tasa de mineralización se verificó durante los 30 días posteriores a la incorporación de biosólidos. El incremento de Cu-MO observado al final del periodo de estabilización está relacionado con el hecho que el Cu puede interactuar y tiene una elevada afinidad para formar complejos estables con sustancias orgánicas de alta y baja masa molar (Nierop *et al.*, 2002). Se concluye que el Cu liberado a la solución del suelo por procesos de mineralización se adsorbió a la materia orgánica remanente del biosólido o del suelo. Otros autores (Sparks, 1995; Wu *et al.*, 1999 b) asociaron el mayor incremento de Cu-MO en suelos de textura gruesa con las características de la materia orgánica asociada a la arcilla de granulometría más gruesa, que poseen una mayor concentración de grupos funcionales como carboxilos, aldehídos y cetonas.

El Cu es, probablemente, el micronutriente adsorbido o retenido con mayor energía por los componentes del suelo, debido a su tendencia para formar enlaces covalentes. Asimismo, presenta una mayor afinidad por la materia orgánica del suelo que otros cationes (Kerndorff y Schnitzer, 1980; Violante y Caporale, 2015). Este fenómeno se atribuyó a la elevada afinidad, y a la unión selectiva del Cu a grupos funcionales como aminas, polifenoles y sulfhidrilos (Stevenson, 1994). A su vez, los ácidos húmicos que adsorben/fijan Cu se encuentran fuertemente asociados a las superficies de partículas de tamaño arcilloso, como oxihidróxidos de hierro, arcillas silicatadas o cenizas, mediante complejos superficiales de esfera interna (McBride, 1984). De esta manera, el complejo húmico-arcilloso formado presenta Cu sorbido a partículas de tamaño arcilloso, sobre la materia orgánica que a su vez esta adsorbida sobre la superficie de arcillas (complejo

ternario tipo B) o formando puentes entre las arcillas y los grupos funcionales orgánicos (complejo ternario de tipo A). En la Figura 3.10 se esquematizan los enlaces de los complejos ternarios de Cu de tipo A y B.

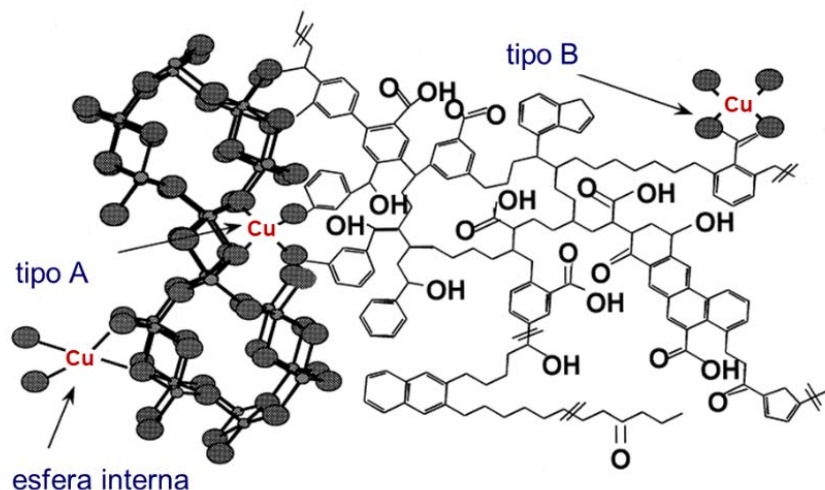


Figura 3.10: Esquema de posibles configuraciones de enlace en complejos húmico-arcilloso (goetita): complejo de esfera interna entre Cu (II) y goetita, y complejos ternarios de tipo A y B. Adaptado de Alcacio et al. (2001).

Por estos motivos, el Cu es considerado un elemento de escasa movilidad en el perfil del suelo, acumulándose en los horizontes superficiales debido a su adsorción específica a la materia orgánica estable, a los complejos húmico-arcillosos y, en menor proporción, a la superficie de las arcillas o partículas de tamaño arcilloso.

No se observaron diferencias significativas en Cu-MO entre los tratamientos SB-SiB o SZ-SiZ, ni tampoco entre SB-SZ o SiB-SiZ. La ausencia de diferencias significativas en Cu-MO entre los suelos enmendados con biosólidos y biosólidos con cenizas sugieren que el Cu

incorporado a través de las cenizas no contribuyó a incrementar la fracción adsorbida en la orgánica. Por ende, en ambos tratamientos, el incremento de Cu-MO se debió al Cu originalmente presente en los biosólidos, y que, en esta fecha, el Cu incorporado a los suelos a través de cenizas de biosólidos permaneció en fracciones de menor disponibilidad.

Al igual que con la fracción orgánica, se observó un incremento significativo en la fracción Cu-INOR en todos los suelos enmendados con respecto a día 1. Por el contrario, la concentración de Cu-INOR en los suelos testigo no se modificó significativamente con respecto al inicio del ensayo. Los suelos enmendados con biosólidos más cenizas presentaron una concentración de Cu-INOR significativamente más elevada que los suelos enmendados con biosólidos, sin observarse diferencias significativas entre el suelo sin inocular o inoculado con *Frankia* (SZ y SiZ). Estos resultados indican que una proporción del Cu incorporado al suelo a través de las cenizas incrementó la fracción inorgánica.

Ciertos autores indicaron que la fracción inorgánica de Cu aumenta con el incremento del pH edáfico (Sims y Kline, 1991; Zhu y Alva, 1993; Walter y Cuevas, 1999; Parkpain *et al.*, 1998; Alva *et al.*, 2000). En este ensayo, los suelos enmendados con Z presentaron un pH significativamente más alcalino que los suelos enmendados con B. Sin embargo, dicha correlación no pudo establecerse en esta fecha, posiblemente porque aún no se establecieron las condiciones de equilibrio o de cuasi-equilibrio entre las fracciones.

Día 180, finalización del ensayo

Dado que, en todos los casos, la concentración de Cu-MO en los suelos sin planta fue similar en los tratamientos inoculados y sin inocular (ST \approx SiT, SB \approx SiB, SZ \approx SiZ), sin diferencias significativas entre ellos, se presentan solamente los datos del suelo sin inocular. Al final del ensayo, el fraccionamiento secuencial de Cu en los suelos (datos no graficados) indicó que la concentración de Cu-INT se encontró por debajo del límite de cuantificación en casi todos los tratamientos. Solamente se pudo cuantificar Cu-INT en el

suelo enmendado con biosólidos sin planta (SB) y en el suelo enmendado con biosólidos y raigrás (SBP1). La concentración media en SB fue de $0,29 \pm 0,06$ mg Cu-INT·kg⁻¹, mientras que en SBP1 fue de $0,54 \pm 0,06$ mg Cu-INT·kg⁻¹.

Como ya se mencionó, la mineralización de la materia orgánica de los biosólidos libera Cu, entre otros elementos, a la solución del suelo. La tasa de mineralización es elevada durante los primeros 60 días, pareciendo llegar a un nuevo equilibrio al cabo de 150 días, con contenidos de carbono total significativamente más elevados que el testigo (Torri *et al.*, 2003). A pesar de la continua mineralización de la materia orgánica del biosólido, y la liberación de Cu a la solución del suelo, Cu-INT pudo cuantificarse solamente en dos tratamientos: SB y SBP1. En general, la presencia de especies vegetales disminuye la fracción de mayor disponibilidad vegetal, siendo el Cu mayormente absorbido por intercepción directa (Mortvedt *et al.*, 1991). Este hecho permitiría explicar que no se pudiera cuantificar Cu-INT en SBP2. Sin embargo, y a pesar de la presencia de raigrás, pudo cuantificarse Cu-INT en el tratamiento SBP1.

Las raíces de las gramíneas sintetizan y excretan compuestos de baja masa molar. En condiciones de deficiencia de hierro, las gramíneas secretan moléculas que actúan como agentes quelantes específicos de Fe³⁺ denominados fitosideróforos (Drechsel y Jung, 1998). Debido a su elevada afinidad por el Fe, lo solubilizan por quelación, produciendo complejos Fe (III)-fitosideróforo que ingresan al interior de la raíz a través de un transportador específico situado en la membrana plasmática (Neilands, 1995). Sin embargo, los fitosideróforos no son específicos para Fe y pueden aumentar la disponibilidad y posiblemente también la absorción de otros ET como Zn, Mn, Ni, Cu y Cd (Zhang *et al.*, 1991 a, b; Marschner y Römheld, 1994; Awad y Römheld, 2000). De hecho, el Cu es el metal de transición divalente para el cual los fitosideróforos exhiben una elevada afinidad (Cornu *et al.*, 2017). Además, se ha demostrado que la presencia de Cu en la rizósfera mejora la producción bacteriana de sideróforos (Braud *et al.*, 2010; Cornu

et al., 2019). La elevada concentración de Cu en el biosólido y la presencia de fitosideróforos, o de otras sustancias complejantes excretadas por las raíces del raigrás podrían explicar la mayor concentración de Cu-INT en los suelos enmendados con biosólidos comparado con discaria.

Sin embargo, la fracción de Cu-INT se encontró por debajo del límite de cuantificación en los tratamientos con cenizas, posiblemente debido a que el material coloidal incorporado a través de las cenizas posee una elevada capacidad de adsorción/fijación de iones (Wang *et al.*, 2016). Militaru *et al.* (2020) analizaron la eficiencia y factibilidad del uso de cenizas de biosólidos como material adsorbente para la eliminación de Pb (II) y Cu (II) en sistemas simples y binarios. Estos autores concluyeron que la adsorción de Cu sobre las cenizas de biosólidos es fuertemente dependiente del pH; se incrementa desde pH = 3 hasta alcanzar la máxima adsorción entre pH = 6-7. En concordancia con ese estudio, las dosis de cenizas de biosólidos utilizadas en este ensayo lograrían una eficiencia de remoción de 92.4 % del Cu presente en las formas de mayor labilidad (Cu-INT). De este modo, la adsorción de Cu sobre las cenizas de biosólidos, favorecido por el pH significativamente más elevado de este tratamiento comparado con los tratamientos con biosólidos explicarían la baja concentración de Cu-INT, por debajo del límite de cuantificación.

El hecho que en los demás tratamientos enmendados (SBP2, SZP1, SZP2), la concentración de Cu-INT se encontrara por debajo del límite de cuantificación sugiere que el elemento se redistribuyó hacia fracciones de menor disponibilidad o, en el caso de los tratamientos con planta, que fue absorbido por las especies vegetales.

La concentración de Cu-MO medida al final del ensayo fue, en todos los tratamientos, significativamente inferior con respecto al fin del periodo de estabilización. Sin embargo, todos los suelos enmendados presentaron concentraciones de Cu-MO significativamente más elevadas que el suelo testigo (ST) (Figura 3.11). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos enmendados sin planta (SB y SZ).

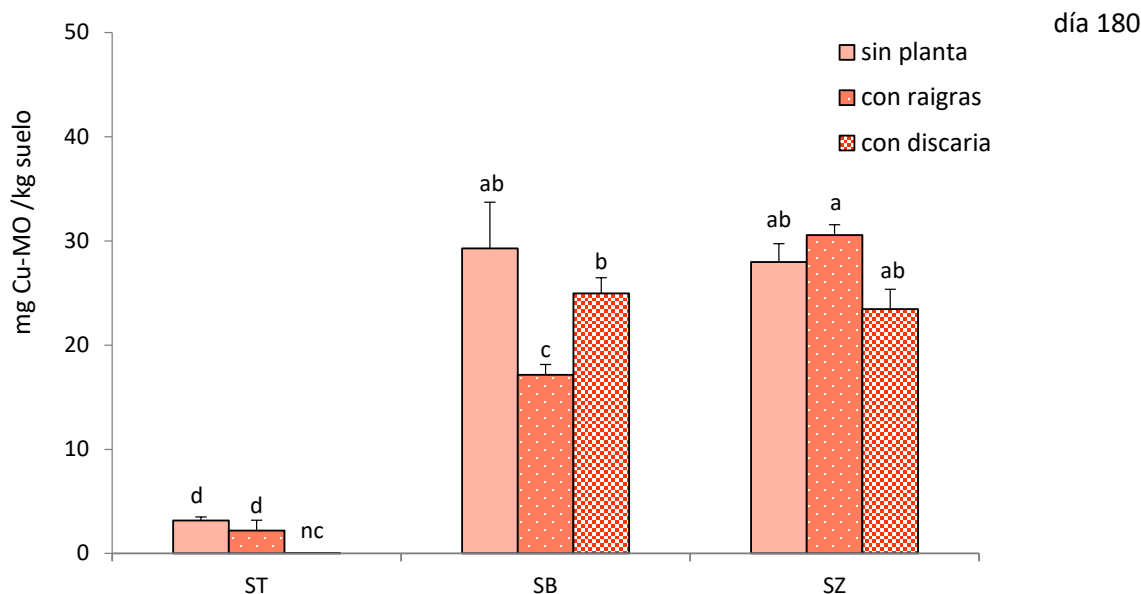


Figura 3.11: Concentración de Cu en la fracción orgánica (Cu-MO) a los 180 días de iniciado el ensayo. Tratamientos: ST, suelo testigo; SB, suelo enmendado con biosólidos; SZ, suelo enmendado con biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas; P1, raigrás; P2, *Discaria americana*. Las barras representan el desvío estándar, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$), nc: por debajo del límite de cuantificación del equipo.

Las especies vegetales modificaron la concentración de Cu-MO con respecto a los tratamientos sin planta.

En el suelo sin enmendar, la presencia de raigrás no modificó la concentración de Cu-MO con respecto al testigo sin planta. Sin embargo, originó una disminución significativa en la concentración de Cu-MO en SBP1 comparado con el suelo enmendado sin planta (SB). Dicho Cu pudo ser absorbido por el raigrás o pasar a formas de menor biodisponibilidad, como se observa en la Figura 3.13. Se observó un ligero incremento en Cu-MO en SZP1 con respecto al testigo sin planta (SZ), aunque este incremento no fue significativo.

En el suelo testigo, la presencia de discaria originó una disminución en la concentración de Cu-MO con respecto al testigo sin planta. Dicha concentración se encontró por debajo del límite de cuantificación. La misma tendencia se observó en los tratamientos SiBP2 y SiZP2

con respecto a los correspondientes testigos sin planta (SB y SZ), aunque estas diferencias no fueron significativas (Tukey, $p < 0.05$). Esta ligera disminución pudo originarse por absorción radical por parte de la discaria o por el pasaje de Cu hacia formas de menor biodisponibilidad.

Dada la elevada afinidad del Cu para formar complejos estables con la fase orgánica, se esperaría que la adsorción se incrementara a medida que el pH edáfico aumenta. Sin embargo, los resultados obtenidos indican lo contrario. Se observó que la proporción de Cu ligado a la fracción orgánica disminuyó en la medida que se incrementó el pH en los distintos tratamientos. En la Figura 3.12 se observa la relación entre Cu-MO y pH de los suelos. Zhu y Alva (1993) también observaron que la proporción de Cu-MO disminuyó a medida que el pH de los suelos se incrementó en una serie de 7 suelos arenosos con diferente contenido de materia orgánica. Este cambio se asoció con un incremento de las formas inorgánicas.

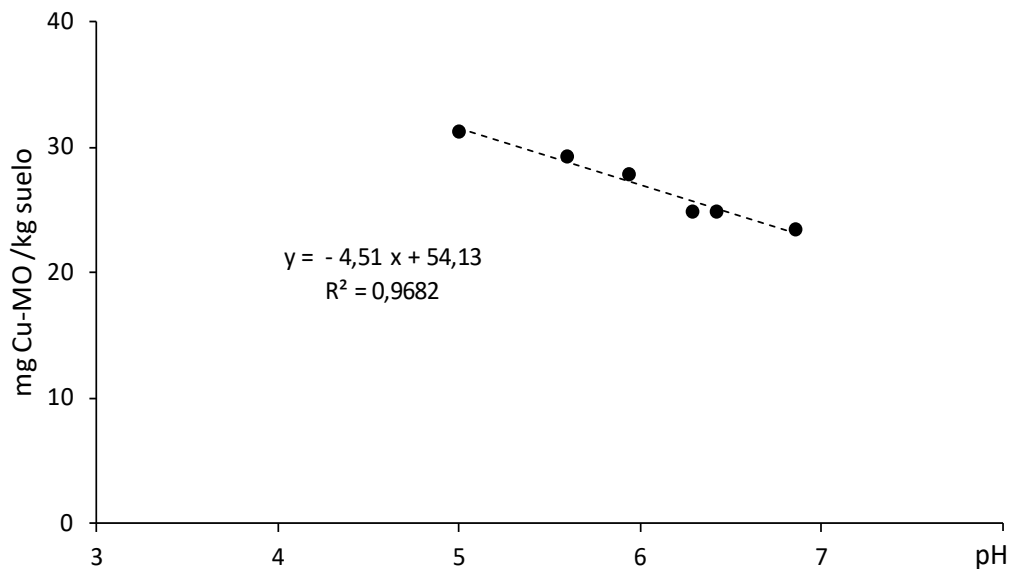


Figura 3.12: Relación entre formas orgánicas de Cu (Cu-MO) y pH en un Hapludol típico a los 180 días de la incorporación de ambas enmiendas, biosólidos o biosólidos más 30% de sus propias cenizas.

La dependencia de Cu-MO con el pH del suelo fue posteriormente confirmada por otros autores (Hsiau y Lo, 1998; Walter y Cuevas, 1999; Alva *et al.*, 2000).

En la Figura 3.13 se presenta la concentración de Cu en la fracción inorgánica (Cu-INOR) a los 180 días de iniciado el ensayo.

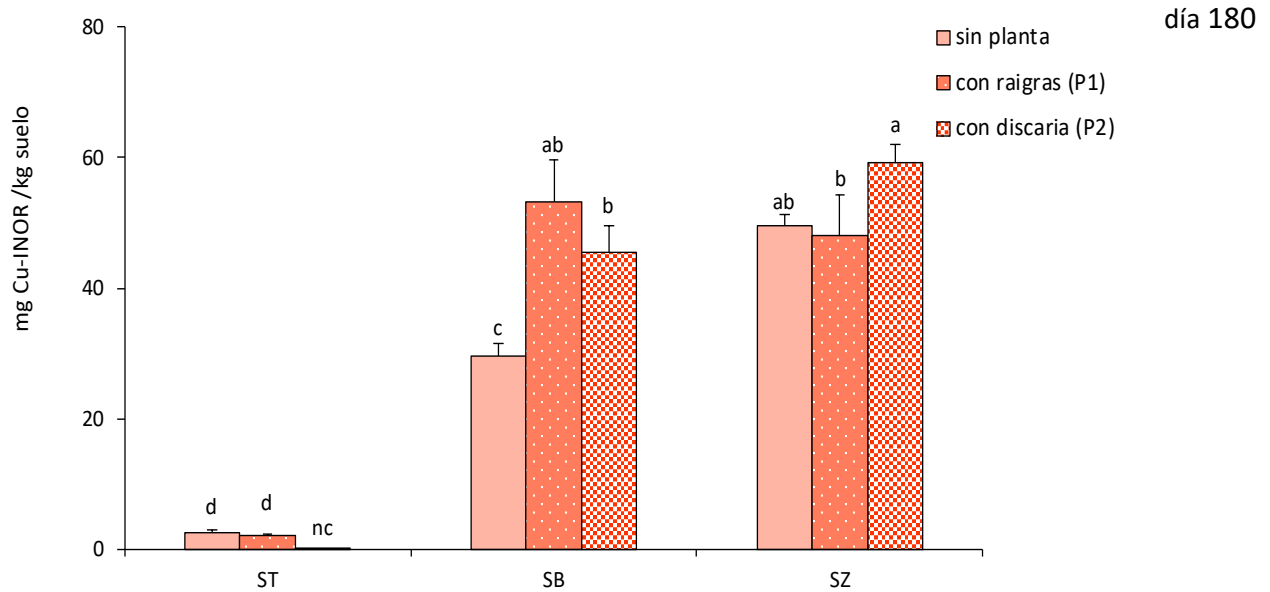


Figura 3.13: Concentración de Cu en la fracción inorgánica (Cu-INOR) a los 180 días de iniciado el ensayo. Tratamientos: ST, suelo testigo; SB, suelo enmendado con biosólidos; SZ, suelo enmendado con biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas; P1, raigrás; P2, *Discaria americana*. Las barras representan el desvío estándar, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$), nc: por debajo del límite de cuantificación del equipo.

En el suelo sin enmendar, la presencia de raigrás (STP1) no modificó la concentración de Cu-INOR con respecto al testigo sin planta (ST). Por el contrario, la presencia de discaria (STP2) originó una disminución significativa en la concentración de Cu-INOR con respecto al testigo sin planta (ST). Dicha concentración se encontró por debajo del límite de cuantificación.

En los suelos enmendados sin planta, la concentración de Cu-INOR disminuyó ligeramente con respecto a la fecha anterior (día 45).

Los suelos enmendados con biosólidos o con biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas presentaron concentraciones de Cu-INOR significativamente superiores al suelo testigo sin enmendar.

En los suelos enmendados con biosólidos, se observó que la presencia de las especies vegetales favoreció el pasaje de Cu hacia formas inorgánicas, ya que los tratamientos con planta (SBP1 y SBP2) presentaron una concentración de Cu-INOR significativamente superior al suelo sin planta (SB). A su vez, el suelo enmendado con biosólidos más cenizas (SZ) presentó una concentración significativamente superior de Cu-INOR con respecto a SB. Estos resultados indican que una proporción del Cu incorporado al suelo a través de las cenizas permaneció en formas precipitadas en el tratamiento sin plantas. Si bien no se observaron diferencias significativas debido a la presencia de especies vegetales (SZP1 y SZP2) con respecto al suelo sin planta (SZ), la concentración de Cu-INOR en SZP2 fue significativamente superior a SZP1.

Diversos estudios indicaron que, cuando los suelos se ordenan según pH creciente, la proporción de Cu-MO desciende mientras que la fracción Cu-INOR se incrementa (Zhu y Alva, 1993; Alva *et al.*, 2000 y 2005; Torri y Lavado, 2008 a). Cuando el pH del suelo es bajo, la asociación del Cu con la fracción orgánica predomina, pero en la medida que el pH se incrementa, hay una partición de Cu hacia formas inorgánicas hasta un valor de pH umbral a partir del cual la precipitación de Cu es la principal reacción. También se observó que la proporción de Cu-MO/Cu-INOR está regulada por el pH del suelo (Zhu y Alva, 1993; Parkpain *et al.*, 2000).

En este trabajo también se observó una correlación positiva entre Cu-INOR y pH (Figura 3.14). Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores (Zhu y Alva, 1993; Walter y Cuevas, 1999; Parkpain *et al.*, 1998; Alva *et al.*, 2000) quienes observaron que la fracción inorgánica de Cu se incrementó en los suelos que presentaron un pH más

elevado, acompañado usualmente por un descenso de la concentración de Cu en la fracción orgánica.

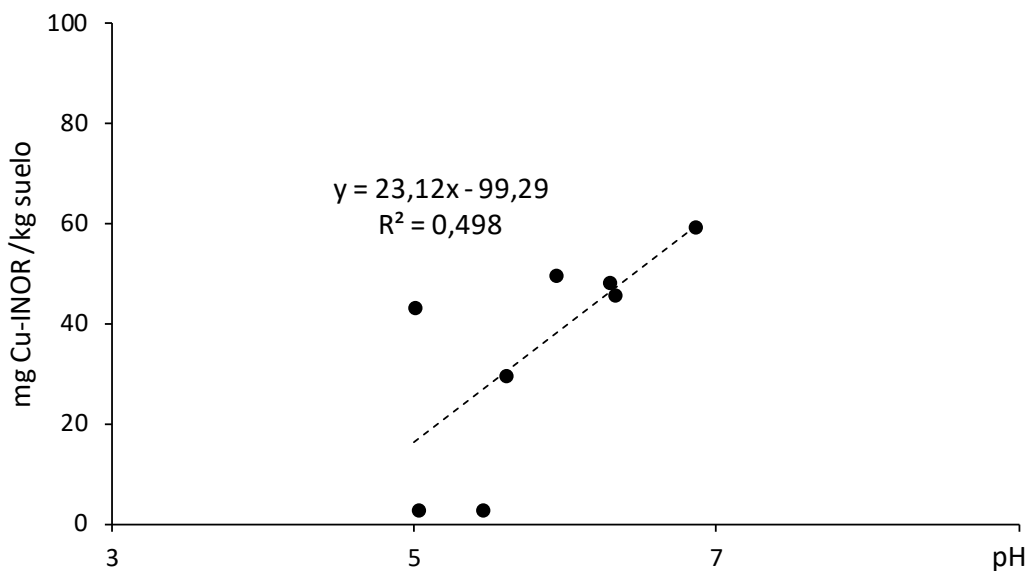


Figura 3.14: Relación entre formas inorgánicas de Cu (Cu-INOR) y pH en un Hapludol típico a los 180 días de la incorporación de ambas enmiendas, biosólidos o biosólidos más 30% de sus propias cenizas.

El bajo valor de R^2 posiblemente se debe a que aun no se alcanzaron las condiciones de equilibrio en el suelo. Estos resultados sugieren que el pH del suelo regula la concentración de Cu en las fracciones asociadas a la materia orgánica o precipitadas como compuestos inorgánicos a medida que las reacciones de Cu en el suelo van evolucionando hacia el equilibrio.

Distribución de Zn entre diferentes fracciones del suelo

Día 1, inicio del ensayo

La distribución de Zn nativo entre las distintas fracciones edáficas correspondiente al Hapludol típico en estado prístino (ST) se presenta en la Figura 3.15. A diferencia del Cu, pudo cuantificarse Zn en todas las fracciones analizadas. La mayor concentración de Zn se

encontró en la fracción residual (85.2%), como formas no reactivas. Estos resultados coinciden con los hallados por numerosos autores (Jeng y Singh, 1993; Chowdhury *et al.*, 1997; Luo y Christie, 1998; Shuman, 1999; Walter y Cuevas, 1999; Lavado y Porcelli, 2000). Sólo una pequeña fracción de Zn se encontró en formas orgánicas y precipitadas como compuestos inorgánicos (4.8% y 7.1% respectivamente), o en formas intercambiables o solubles (2.9 %), en concordancia con lo observado por Barak y Helmke (1993) y Chowdhury *et al.*, (1997).

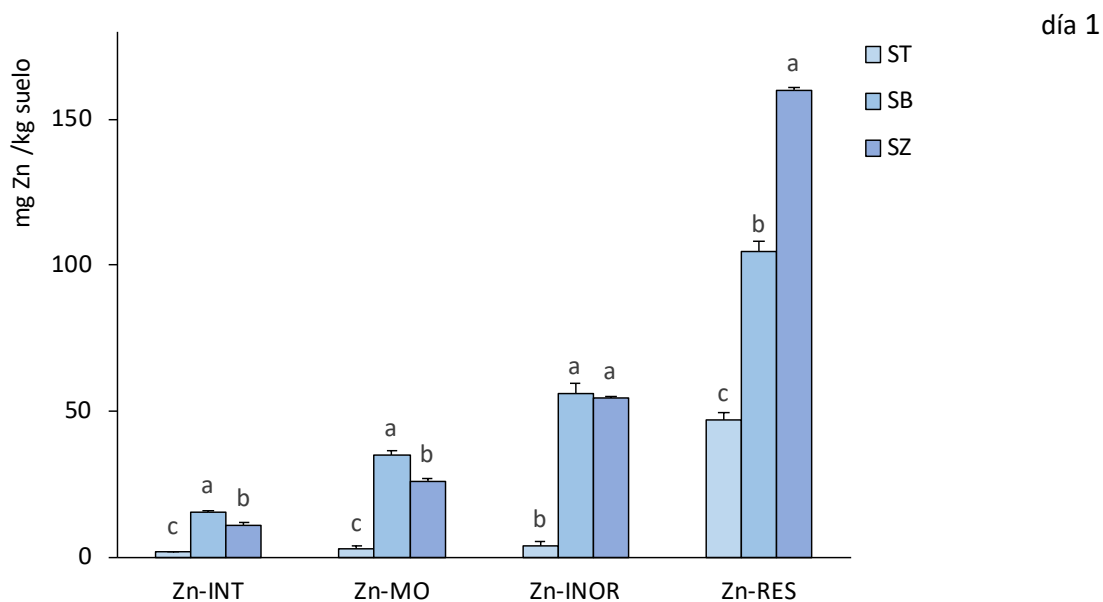


Figura 3.15: Concentración de Zn en las fracciones intercambiable (Cu-INT), orgánica (Cu-MO), precipitados inorgánicos (Cu-INOR) y residual (Cu-RES) en Hapludol típico en condiciones prístinas, enmendado con biosólido (B) o biosólidos adicionados con 30 % de sus propias cenizas (Z) en día 1. Las barras representan el desvío estándar. Letras diferentes para la misma fracción de Cu indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$), nc: por debajo del límite de cuantificación por ICP.

Dado que, en todos los casos, la concentración de Zn en los suelos fue similar en los tratamientos inoculados y sin inocular ($ST \approx SiT$, $SB \approx SiB$, $SZ \approx SiZ$), sin diferencias significativas entre ellos, se presentan solamente los datos del suelo sin inocular.

La incorporación de biosólidos y biosólidos con 30% de sus propias cenizas incrementó la concentración de Zn total debido a la elevada concentración del elemento en estas enmiendas (2500 / 3150 mg·kg⁻¹ de Zn respectivamente).

A su vez, todas las fracciones de los suelos enmendados exhibieron incrementos significativos en la concentración de Zn con respecto al testigo. La extracción secuencial utilizada revela que la mayor proporción de Zn en los suelos enmendados con biosólidos o biosólidos más cenizas se encontró, inicialmente, en las fracciones residual (50 y 63,6% en SB y SZ, respectivamente) y precipitados inorgánicos (26,6 y 21,6% en SB y SZ, respectivamente). Como podía esperarse de una enmienda orgánica rica en Zn, y dada la elevada afinidad de este elemento para formar complejos estables con la materia orgánica (Shuman, 1999), la concentración de Zn-MO también fue relevante (16.5 y 10.4% en SB y SZ, respectivamente), con menor proporción en la fracción intercambiable (7 y 4% en SB y SZ, respectivamente) en los suelos enmendados con biosólidos o biosólidos más cenizas (Figura 3.15).

Comparando la distribución de Zn entre las diferentes fracciones estudiadas, el tratamiento SZ presentó concentraciones de Zn-INT y Zn-MO significativamente inferiores a las correspondientes al tratamiento SB. El Zn-INOR no presentó diferencias significativas entre SB y SZ, pero SZ presentó una concentración de Zn-RES significativamente más elevada que SB. Teniendo en cuenta que durante los primeros días de incorporación son las formas físico químicas de los ET en las enmiendas las que inicialmente determinan su especiación en los suelos (Qian *et al.*, 2003), estos resultados indican que el Zn presente en las cenizas se encontraba en formas no reactivas, posiblemente ocluidas, en concordancia con los resultados informados por Bache y Lisk (1990) y Obrador *et al.* (2001). Este aumento en Zn-RES podría indicar que el elemento quedó ocluido en minerales secundarios luego de la incineración. Asimismo, Zevenbergen *et al.* (1994) indicaron que la mayoría de los ET existen como una solución sólida en residuos de incineración. Sin embargo, como ya se mencionó, muchos de estos sólidos son

metaestables y con el tiempo pueden alterarse para transformarse en minerales secundarios termodinámicamente estables (Meima *et al.*, 2002; Chandler *et al.*, 1997).

Día 45, fin del período de estabilización

En la Figura 3.16 se presenta la concentración de Zn en la fracción intercambiable al final del periodo de estabilización (45 días de iniciado el ensayo).

Al cabo de 45 días, la distribución del Zn en el suelo testigo no se modificó con respecto al inicio del ensayo. En los suelos enmendados con B y Z, todas las fracciones de Zn estudiadas presentaron concentraciones significativamente más elevadas que el suelo testigo. Se observó que el patrón de distribución del Zn entre las distintas fracciones de los suelos enmendados se modificó con respecto a día 1 (Figura 3.16).

En la solución del suelo, el Zn se presenta como ion libre o complejo, en forma catiónica como Zn^{2+} , $[ZnCl]^+$, $[ZnOH]^+$, $[ZnHCO_3]^+$, o aniónica: $[ZnO_2]^{2-}$, $[Zn(OH)_3]^-$, $[ZnCl_3]^-$ (Kabata-Pendias y Sadurski, 2004), aunque también pueden encontrarse especies orgánicas.

En esta fecha, el suelo prístino presentó concentraciones de Zn-INT similares a las encontradas en el día 1, sin diferencias significativas entre suelos inoculados con *Frankia* (SiT) o sin inocular (ST).

Por el contrario, los suelos enmendados con B o Z exhibieron concentraciones de Zn-INT significativamente menores comparada con día 1. Ciertos autores observaron un incremento en Zn-INT con el tiempo, asociado con una disminución del pH del suelo (Shuman y Li, 1997; Krebs *et al.*, 1998), mientras que otros no observaron incremento o disminución en Zn-INT a lo largo de un período de 25 años (McGrath *et al.*, 2000).

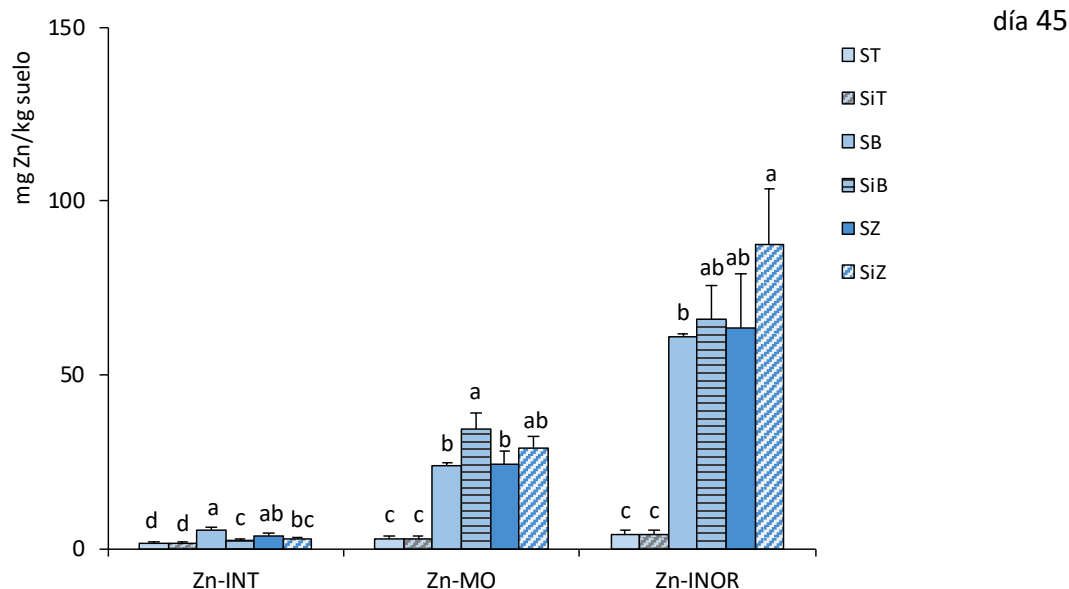


Figura 3.16: distribución de Zn entre las fracciones intercambiable (Zn-INT), orgánica (Zn-MO) y precipitados inorgánicos (Zn-INOR) en todos los tratamientos al finalizar el periodo de estabilización (45 días).

Los suelos enmendados con biosólidos o biosólidos con cenizas presentaron concentraciones de Zn-INT significativamente mayores a los suelos sin enmendar, de acuerdo a lo observado por otros autores (Sloan *et al.*, 1997; Krebs *et al.*, 1998; Parkpain *et al.*, 2000; McGrath *et al.*, 2000).

A su vez, los suelos enmendados sin inoculo presentaron concentraciones de Zn-INT significativamente mayores en SB comparado con SZ. Este resultado indica que el Zn introducido al suelo como ceniza se encuentra en formas poco solubles. La presencia de *Frankia* disminuyó significativamente la concentración de Zn-INT en SiB comparado con SB, y en SiZ comparado con SZ. Esta disminución significativa en la concentración de Zn-INT posiblemente se deba al pH más alcalino que presentaron los suelos inoculados con *Frankia* (Shuman y Li 1997; Krebs *et al.*, 1998). En la bibliografía se indica que la concentración de Zn intercambiable en los suelos tratados con biosólidos está estrechamente relacionada con el pH de los suelos (Smith, 1994; Basta y Sloan 1999; Zhao *et al.*, 1999).

La fracción de Zn-MO disminuyó en los suelos enmendados con B o Z con respecto al inicio del ensayo, aunque dichas diferencias no fueron significativas.

A los 45 días, los suelos enmendados con B o Z presentaron concentraciones de Zn-MO significativamente mayores a los suelos sin enmendar. No se manifestaron diferencias significativas en Zn-MO entre los tratamientos SB y SZ o SiB y SiZ. En los suelos enmendados con biosólidos o biosólidos más cenizas, la presencia de *Frankia* (SiB, SiZ) incrementó ligeramente la concentración de Zn-MO comparado con el suelo sin inocular (SB), aunque dichas diferencias no fueron significativas.

En la Figura 3. 17 puede observarse que la concentración de Zn en la fracción orgánica se encontró estrechamente relacionada con el pH del suelo

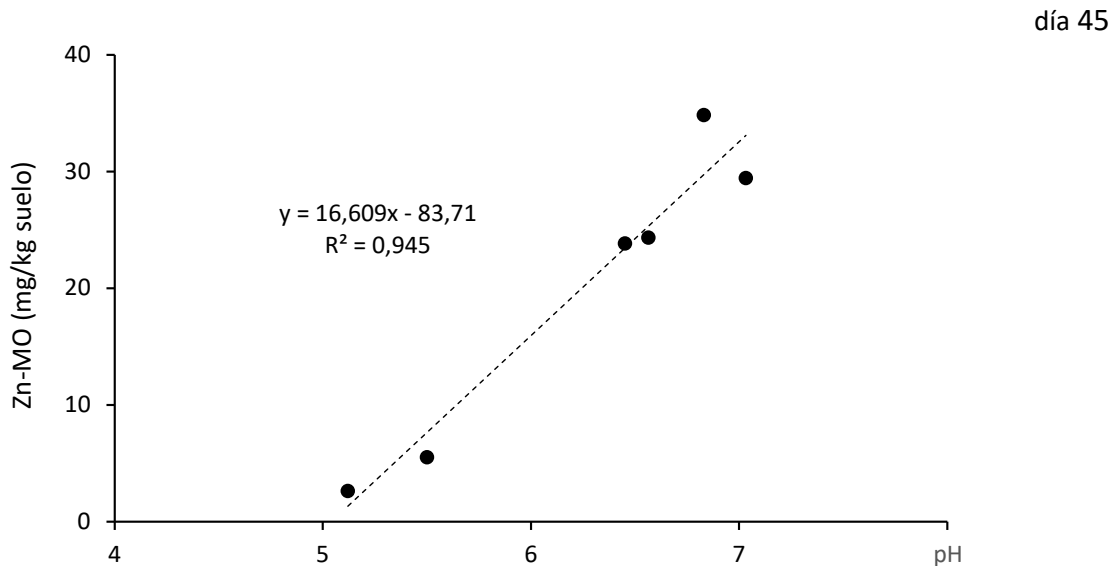


Figura 3.17: Relación entre formas orgánicas de Zn (Zn-MO) y pH en un Hapludol típico a los 45 días de la incorporación de ambas enmiendas, biosólidos o biosólidos más 30% de sus propias cenizas.

Como se mencionó más arriba, la materia orgánica del biosólido sufrió un proceso de mineralización durante el periodo de estabilización, liberando Zn a la solución del suelo.

Dado que la afinidad del Zn por la materia orgánica es menor que la del Cu (Bunzl *et al.*, 1976; Wang *et al.*, 2021), se origina una menor concentración de Zn en la fracción orgánica. La materia orgánica posee una elevada capacidad de adsorción de ET a través de numerosos grupos funcionales, cuya carga depende del pH del medio. De esta manera, a pH alcalino predominan las cargas negativas, mientras que a pH ácido predominan las cargas positivas (Violante *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2015). Consecuentemente, la adsorción de Zn se incrementaría significativamente con el aumento del pH (Parkpain *et al.*, 2000; Mandal y Hazra, 1997).

A los 45 días de la incorporación de las enmiendas, la fracción de Zn-INOR se incrementó con respecto a la fecha anterior (día 1), y fue la fracción preponderante en los suelos enmendados. Estos resultados estarían indicando que los componentes inorgánicos presentes en los biosólidos favorecieron el pasaje de Zn hacia formas precipitadas, particularmente debido a la presencia de óxidos de Fe y Mn (Morera *et al.*, 2001; Dvorak *et al.*, 2003). Chirenje y Ma (1999) observaron que, con el tiempo, el Zn precipita como sulfuros y carbonatos, a la vez que se fija en los oxi-hidróxidos de Fe/Mn. En muchas situaciones, la adsorción es precursora de la posterior precipitación del elemento, y resulta difícil definir el límite que separa los procesos de adsorción y precipitación (Corey, 1981). Esta elevada capacidad de retención también fue observada en un suelo artificial creado a partir de biosólidos, aunque fue adjudicada al elevado contenido de CaCO_3 (McBride *et al.*, 2000; Usman *et al.*, 2004). Dado que los biosólidos utilizados en este ensayo presentaron una elevada concentración de Ca (2.25%), los compuestos inorgánicos formados como resultado del proceso de mineralización pueden incluir carbonatos, sulfatos, fosfatos e hidróxido de calcio (Liu *et al.*, 2016).

Todos estos procesos se ven favorecidos por el incremento en el pH edáfico (Alloway y Jackson, 1991; Luo y Christie, 1998; Morera *et al.*, 2002). De hecho, se halló una correlación significativa entre Zn-INOR y pH edáfico en los suelos correspondientes a los suelos enmendados (Figura 3.18).

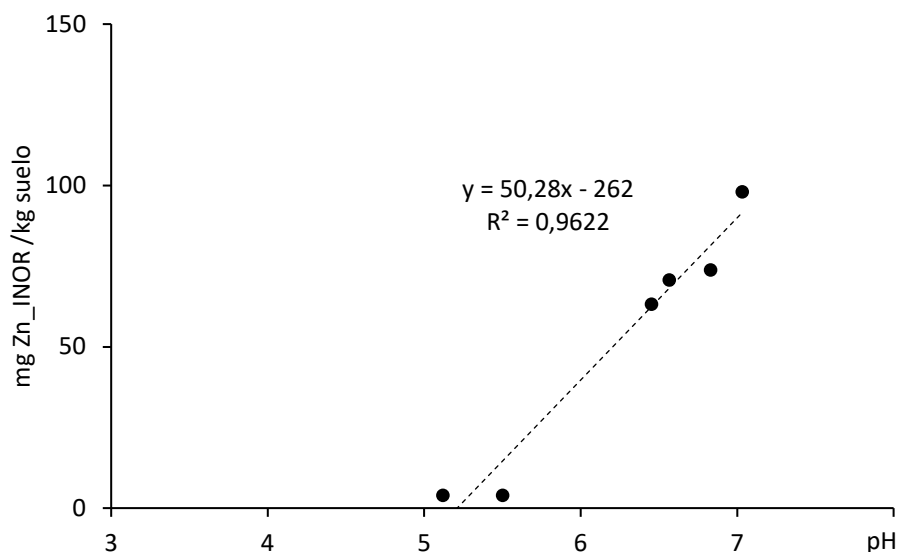


Figura 3.18: Relación entre formas inorgánicas de Zn (Zn-INOR) y pH en un Hapludol típico a los 45 días de la incorporación de ambas enmiendas, biosólidos o biosólidos más 30% de sus propias cenizas

No se manifestaron diferencias significativas en la concentración de Zn-INOR entre los tratamientos SB y SZ o entre SiB y SiZ.

Se concluye que los componentes inorgánicos presentes en el biosólido y el pH contribuyeron al pasaje de Zn hacia formas inorgánicas, de menor disponibilidad. Asimismo, se observó que la concentración de Zn-INT y Zn-MO disminuyó con respecto a día 1, con lo cual se concluye que el Zn liberado por el proceso de mineralización se redistribuyó hacia esta fracción. A su vez, los procesos de meteorización pueden haber disminuido la proporción de Zn en la fracción residual, con un incremento en las formas inorgánicas.

Día 180, finalización del ensayo

En forma similar a los resultados observados para Cu, la concentración de Zn-MO en los suelos sin planta fue similar en los tratamientos inoculados y sin inocular en todos los

casos (ST \approx SiT, SB \approx SiB, SZ \approx SiZ), sin diferencias significativas entre ellos. Por lo tanto, se presentan solamente los datos del suelo sin inocular.

En la Figura 3.19 se presenta la concentración de Zn en la fracción intercambiable (Zn-INT) a los 180 días de iniciado el ensayo. El cinc se pudo determinar en las tres fracciones estudiadas, sugiriendo que este elemento presenta mayor disponibilidad que el Cu. Esto está de acuerdo con las observaciones de Tokalioglu y Kartal (2003) y Pedra *et al.* (2006) en suelos enmendados con biosólidos.

En los tratamientos sin planta, la concentración de Zn-INT siguió el orden de significancia ST < SZ < SB.

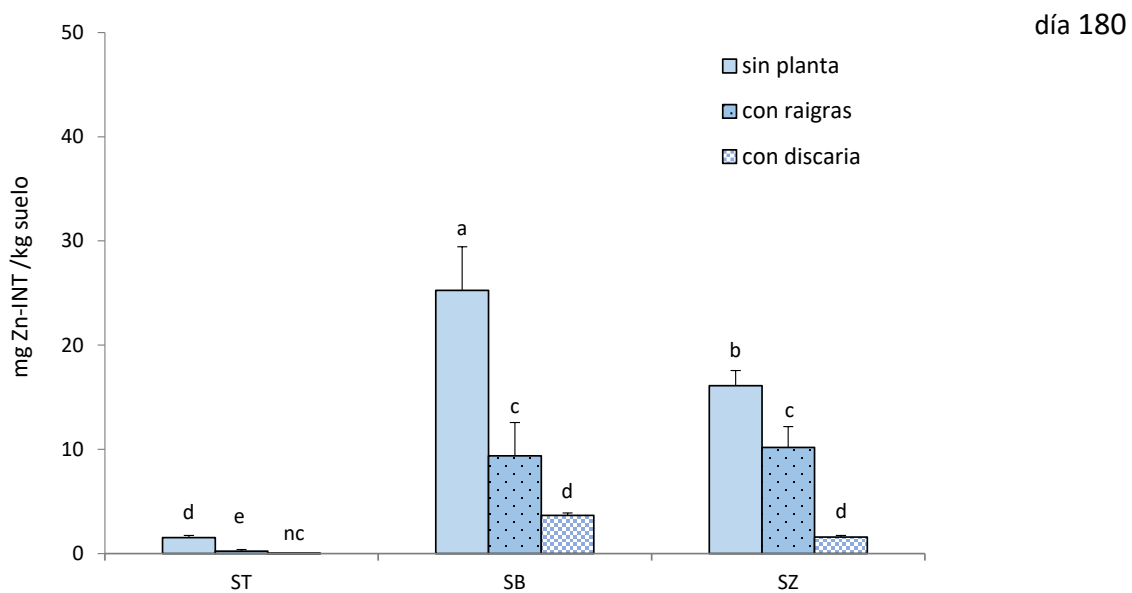


Figura 3.19: Concentración de Zn en la fracción intercambiable (Zn-INT) a los 180 días de iniciado el ensayo. Tratamientos: ST, Suelo Testigo; SB, suelo enmendado con biosólidos; SZ, suelo enmendado con biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas; P1, raigrás; P2, *Discaria americana*. Las barras representan el desvío estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$), nc: por debajo del límite de cuantificación del equipo.

En la Figura 3.19 se observa que, en los suelos sin enmendar, la presencia de especies vegetales (P1, P2) originó una disminución significativa de Zn-INT para raigrás (P1), y una concentración por debajo del límite de cuantificación en el suelo con discaria (P2).

La menor tendencia del Zn comparado con el Cu para formar complejos con la materia orgánica explica su mayor disponibilidad para las especies vegetales (Alloway, 1995; Yu *et al.*, 2004; Pedra *et al.*, 2006). Las formas solubles de Zn constituyen especies fácilmente disponibles para las plantas, y existe una relación directa entre concentración de Zn-INT y la absorción vegetal (Kabata-Pendias y Pendias, 2011).

En los suelos enmendados con biosólidos o biosólidos más ceniza sin planta, se observó un incremento significativo en el valor de Zn-INT con respecto al testigo. Estos valores descendieron significativamente en los tratamientos con raigrás y/o discaria, con un nivel de significancia $SB > SBP1 > SBP2$, y $SZ > SZP1 > SZP2$ (Tukey, $p < 0,05$). Comparando ambas especies, la discaria fue la que originó, en todos los casos, las menores concentraciones de Zn-INT, significativamente menores a raigrás.

Al final del ensayo, la concentración de Zn-INT se incrementó en todos los suelos tratados con respecto a día 45. Hooda y Alloway (1994) concluyeron que el incremento de Zn en la fracción intercambiable puede deberse a: i) disminución del pH del suelo a lo largo del tiempo que ocasiona la disolución de fracciones poco solubles como carbonatos, fosfatos e hidróxidos. b) mineralización de la materia orgánica del suelo, que origina la liberación de elementos traza debido a la disminución de sitios de adsorción en la matriz del biosólido. c) formación de compuestos organometálicos solubles que no se encuentran implicados en reacciones de adsorción. d) liberación por parte de los microorganismos de los metales complejados con la materia orgánica del biosólido. e) oxidación microbiana de los sulfuros metálicos a sulfatos.

En la bibliografía se indica que la concentración de Zn intercambiable en los suelos tratados con biosólidos está estrechamente relacionada con el pH de los suelos (Smith *et al.*, 1994; Basta y Sloan, 1999; Zhao *et al.*, 1999; Torri y Lavado, 2008 b). Sin embargo, los

citados autores trabajaron solamente con muestras de suelo, sin la presencia de plantas. En este ensayo no se pudo observar una correlación entre pH y Zn-INT. Es probable que la mineralización de la materia orgánica proveniente de las enmiendas, la presencia de plantas, y la duración del ensayo no hayan permitido alcanzar condiciones de equilibrio.

En la Figura 3.20 se presenta la concentración de Zn asociado a la fracción orgánica (Zn-MO) a los 180 días de iniciado el ensayo.

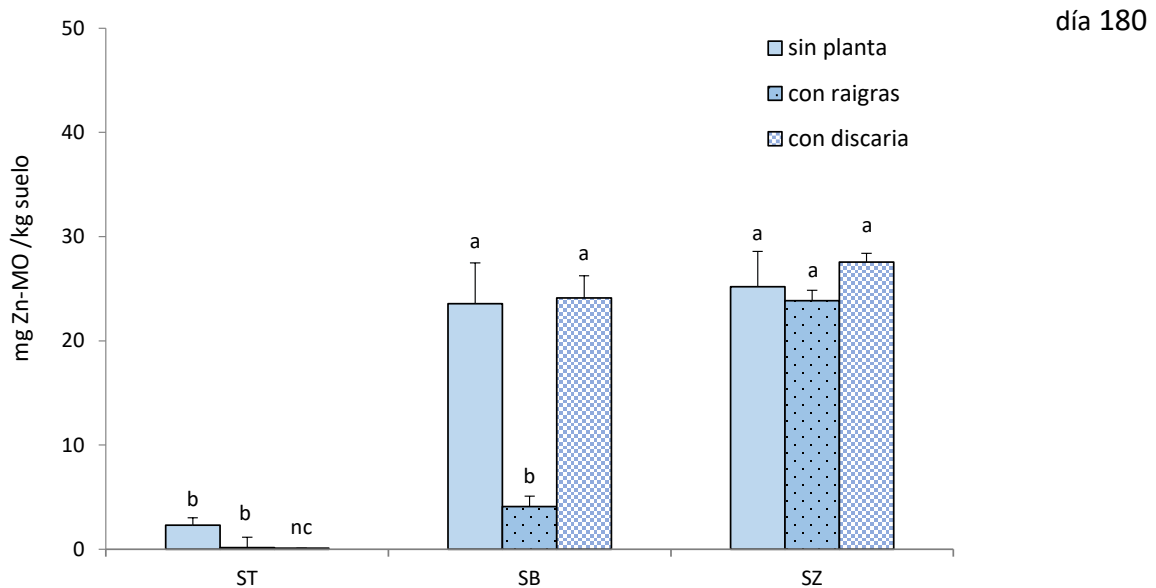


Figura 3.20: Concentración de Zn en la fracción orgánica (Zn-MO) a los 180 días de iniciado el ensayo. Tratamientos: ST, suelo testigo; SB, suelo enmendado con biosólidos; SZ, suelo enmendado con biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas; P1, raigrás; P2, *Discaria americana*. Las barras representan el desvío estándar, letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$), nc: por debajo del límite de cuantificación del equipo.

Comparado con la fecha anterior (día 45), los suelos enmendados sin planta presentaron menor concentración de Zn-MO. En el suelo testigo, la presencia de especies vegetales

(P1, P2) originó una disminución significativa de Zn-MO para raigrás (P1), y una concentración por debajo del límite de cuantificación para el caso de discaria (P2).

La fracción de Zn-MO en los suelos con biosólidos o biosólidos más cenizas sin planta continuó siendo significativamente más elevada que el testigo, sin observarse diferencias significativas entre SB y SZ (Figura 3. 20). La presencia de raigrás produjo un descenso significativo en la concentración de Zn-MO con respecto al suelo sin planta, mientras que los tratamientos SBP2, SZP1 y SZP2 no presentaron diferencias significativas con respecto al suelo sin planta.

En la Figura 3.21 se presenta la concentración de Zn asociado a la fracción inorgánica (Zn-INOR) a los 180 días de iniciado el ensayo.

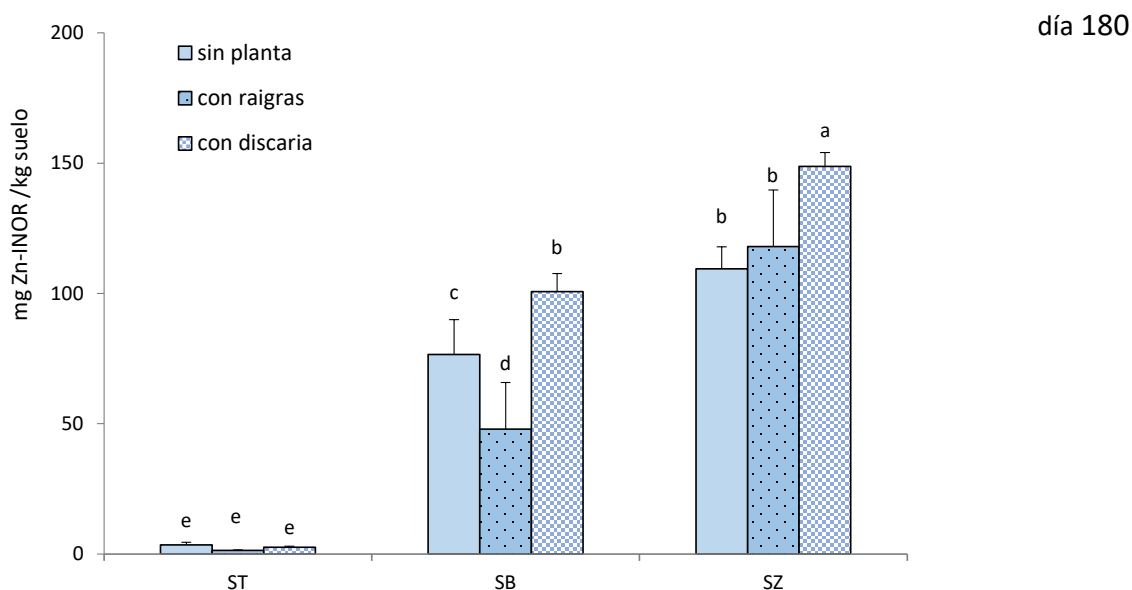


Figura 3.21: Concentración de Zn en la fracción inorgánica (Zn-INOR) a los 180 días de iniciado el ensayo. Tratamientos: ST, suelo testigo; SB, suelo enmendado con biosólidos; SZ, suelo enmendado con biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas; P1, raigrás; P2, Discaria americana. Las barras representan el desvío estándar, letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0.05$), nc: por debajo del límite de cuantificación del equipo.

En esta fecha, la mayor proporción de Zn se encontró en la fracción precipitada como compuestos inorgánicos (Zn-INOR). La acción rizosférica puede haber facilitado la precipitación de Zn en formas inorgánicas, justificando el incremento de esta fracción en los suelos con planta.

Se observó una correlación positiva entre Zn-INOR y pH al graficar solamente los suelos enmendados (Figura 3.22).

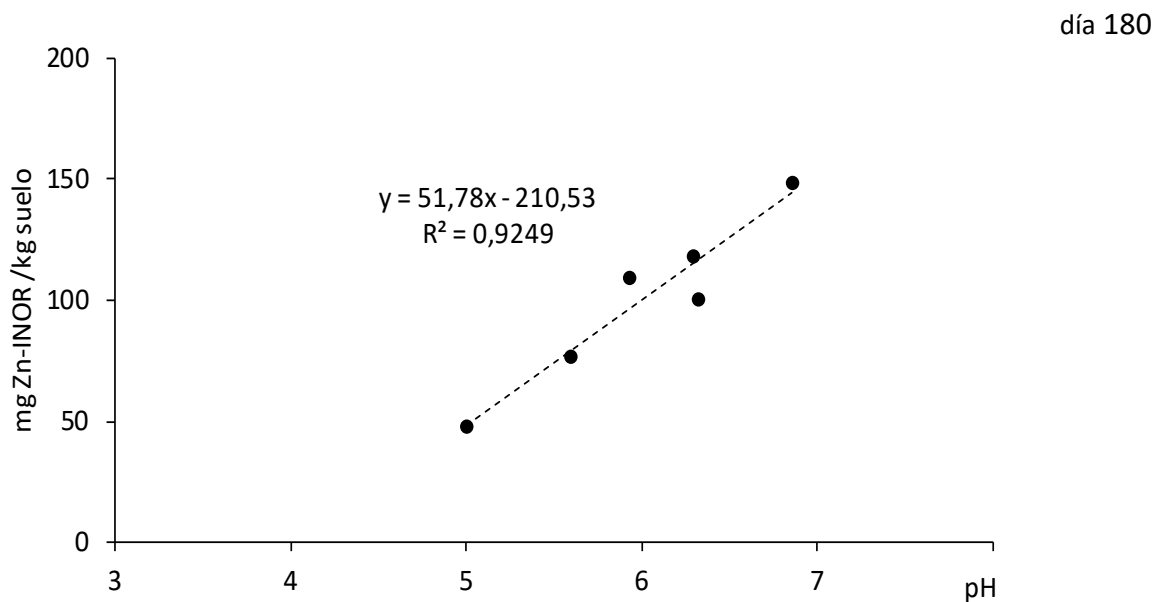


Figura 3.22: Relación entre formas inorgánicas precipitadas de Zn (Zn-INOR) y pH en los suelos enmendados a los 180 días de la incorporación de ambas enmiendas, biosólidos o biosólidos más 30% de sus propias cenizas.

El pH del suelo gobierna la solubilidad de las fases sólidas de Zn. Numerosos estudios indican que la biodisponibilidad de Zn en los suelos se reduce al aumentar el pH edáfico (Davis y Shuman, 1993; Wu y Aasen, 1994; Akhtar *et al.*, 2019). McBride y Blasiak (1979) indicaron que la formación de hidróxido de Zn sobre la superficie de óxidos de Fe,

halloysita, alofano, imogolita y arcillas silicatadas produce la retención de Zn fuertemente dependiente del pH en los suelos. Además, los óxidos e hidróxidos de Al, Fe y Mn cobran importancia en la retención de Zn en algunos suelos. La goetita (αFeOOH) presenta una gran afinidad por la sorción de Zn (Kabata-Pendias y Pendias 2011).

3.4 Conclusiones

En las condiciones de este trabajo experimental, la aplicación de biosólidos (B) o biosólidos adicionados con sus propias cenizas (Z) a un Hapludol típico originó un incremento significativo en la concentración total inicial de Cu y Zn con respecto al suelo testigo, así como un incremento significativo en la concentración de todas las fracciones de Cu y Zn analizadas: intercambiable (INT), unida a la fracción orgánica (MO), precipitadas en formas inorgánicas (INOR) y residual (RES).

Al inicio de ensayo, la mayor proporción de Cu en los suelos enmendados se encontró como Cu-RES y Cu-MO, con menor proporción como Cu-INOR o Cu-INT. A lo largo del ensayo, se observó una redistribución de Cu en las fechas muestreadas: las fracciones orgánica y de precipitados inorgánicos (Cu-MO y Cu-INOR) fueron máximas en día 45. Al finalizar el ensayo, ambas fracciones presentaron una estrecha relación con el pH del suelo. La proporción de Cu en la fracción orgánica se encontró inversamente relacionada con el pH, mientras que se observó una débil correlación positiva entre Cu-INOR y pH.

La mayor proporción de Zn en los suelos enmendados se encontró, al inicio de ensayo, en las fracciones residual e inorgánica, con menor proporción asociado a formas orgánicas o intercambiables. En las fechas muestreadas se observó una redistribución de Zn: las fracciones intercambiables y orgánicas fueron mínimas, con un aumento en la fracción de precipitados inorgánicos en día 45. Al finalizar el ensayo, la concentración de Zn-INT fue significativamente más elevada en los suelos enmendados con B y Z comparado con día 1. Dicho incremento fue superior en el suelo enmendado con B comparado con el suelo

enmendado con Z. La concentración de Zn asociado a la fracción orgánica no se modificó significativamente con respecto a día 1 en el suelo enmendado con B, mientras que se incrementó ligeramente en el suelo enmendado con Z. Por el contrario, la fracción inorgánica fue la fracción que experimentó el mayor incremento en los suelos enmendados con B o Z, encontrándose estrechamente relacionada con el pH del suelo. De esta manera, tanto el Cu como el Zn pasaron a formas de menor disponibilidad en suelos sin planta al cabo de 180 días.

La actividad radical del raigrás y la discaria modificó los equilibrios entre las fracciones edáficas de Cu y Zn en los suelos enmendados con B o Z. En general, ambas especies contribuyeron a incrementar las fracciones de Cu de menor biodisponibilidad, tanto en los suelos enmendados con biosólidos como en los suelos enmendados con biosólidos adicionados con sus propias cenizas.

Ambas especies vegetales contribuyeron a disminuir significativamente la concentración de Zn-INT en los suelos enmendados con B o Z por absorción radical. Comparando ambas especies, la discaria fue la especie vegetal que logró la mayor disminución en Zn-INT, presentando diferencias significativas con los tratamientos con raigrás. Dicha disminución se observó en los suelos enmendados con B y Z.

En general, no se observó influencia de la actividad radical en la concentración de Zn-MO en los suelos enmendados con B o Z, con excepción del tratamiento de biosólidos con raigrás, donde se observó una disminución significativa en la concentración de Zn-MO. A su vez, la discaria originó incrementos significativos en Zn-INOR en los suelos enmendados con B y Z, mientras que el raigrás disminuyó significativamente o no modificó la fracción de Zn-INOR en los suelos enmendados con B y Z, respectivamente.

CAPÍTULO IV

4.1 Introducción

La elevada concentración de Cu y Zn que presentan los biosólidos (Tabla 3.2) podría representar riesgo de fitotoxicidad en especies sensibles cuando este residuo es aplicado a los suelos como enmienda. Tanto el Cu como el Zn tienden a ser tóxicos para las plantas antes que sus tejidos puedan acumular suficiente concentración para afectar a los animales o a los seres humanos (Miller y Miller, 2000). Como se discutió en el capítulo anterior, el grado de toxicidad de los elementos traza (ET) en los suelos no sólo depende del tipo de elemento y de su concentración, sino que presenta una particular relevancia la especie química presente en la solución del suelo (Bosch-Serra *et al.*, 2020; Qin *et al.*, 2020; Baldi *et al.*, 2021). Por estos motivos, es deseable estabilizar o disminuir la biodisponibilidad de los ET en los suelos enmendados con biosólidos.

La vegetación juega un papel crucial en la restauración de suelos degradados enmendados con biosólidos, ya que contribuye al anclaje físico del suelo, reduciendo la erosión y la dispersión de partículas a los suelos adyacentes y a cuerpos de agua superficiales (Tordoff *et al.*, 2000), restituyendo la calidad paisajística de la zona (Moreno, 2005; Domínguez *et al.*, 2008).

El uso de especies vegetales para estabilizar o remover ET de los suelos, generalmente definido como fitorremediación, ofrece la ventaja de ser una tecnología económica y amigable con el medio ambiente. Esta tecnología no es nueva, se conoce desde el siglo XVIII mediante experimentos realizados por J. Priesley, A. Lavoissier, K. Scheele y J. Ingenhousz (Barceló y Poschenrieder, 2003). Sin embargo, el establecimiento de una cobertura vegetal apropiada depende en gran medida de la tolerancia de la especie a las condiciones edáficas imperantes (Arienzo *et al.*, 2004) y suele ser un paso crítico. Para las tecnologías de fitoremediación suelen utilizarse especies vegetales metalófitas ó pseudometalófitas (Chaney *et al.*, 1997) que desarrollaron mecanismos fisiológicos para resistir, tolerar y crecer en suelos con concentraciones de ET que son tóxicas para la

mayoría de las especies vegetales. Dichas especies presentan distintas estrategias para mantener bajos niveles de ET en los tejidos en un amplio intervalo de concentración de ET en el suelo (Robinson *et al.*, 2009). Sin embargo, si la concentración de ET es tan elevada que los mecanismos de regulación se saturan, estos elementos ingresan sin control a la planta, causando reducción en el crecimiento, llegando incluso a originar posterior clorosis o necrosis (Corso *et al.*, 2020).

Las plantas poseen tres estrategias básicas para crecer en suelos con elevada disponibilidad de elementos traza: exclusión, acumulación e indicación (Baker, 1981). La definición de estas estrategias se basa en la comparación entre la concentración de ET en tejido aéreo vegetal y la concentración de ET edáfica (Figura 4. 1).

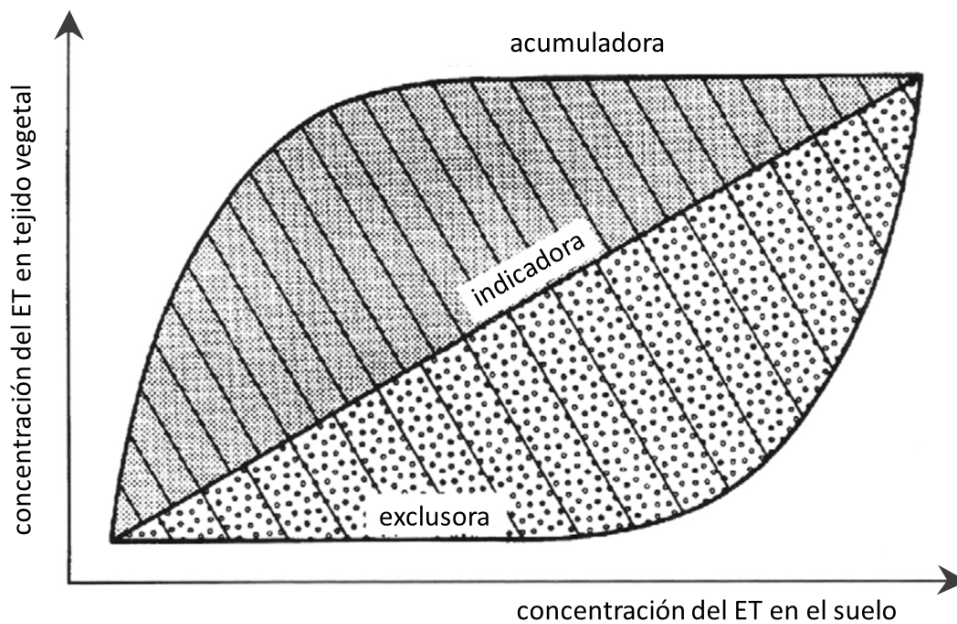


Figura 4.1: Modelo conceptual de los tres principales mecanismos que presentan las especies vegetales frente a un aumento de ET en los suelos (Adaptado de Markert 2000).

Las especies excluidoras absorben los ET pero restringen su translocación hacia la parte aérea (Kabata-Pendias y Pendias, 2011). La exclusión es la estrategia de tolerancia más característica de especies sensibles (Llugany *et al.*, 2007) para evitar daño en el tejido de los brotes fotosintéticamente activos debido a la acumulación de ET (Krämer, 2010). De esta manera, las especies excluidoras presentan niveles relativamente bajos de ET en su biomasa aérea, pero pueden contener una elevada concentración de ET en raíz (Barceló y Poschenrieder, 2003; Whiting *et al.*, 2004; Becerril *et al.*, 2007). Por el contrario, las especies acumuladoras e hiperacumuladoras son capaces de translocar elevadas concentraciones de ET a los tejidos aéreos, que exceden varias veces el nivel presente en el suelo (Cunningham y Ow, 1996). Dicha acumulación puede manifestarse aun cuando la disponibilidad de ET en el suelo es baja. Una respuesta intermedia es la que presentan las plantas indicadoras, cuya concentración de ET en tejido vegetal refleja la biodisponibilidad existente en el suelo (Baker, 1981; Markert, 2000; Ghosh y Singh, 2005). A este grupo pertenece la mayoría de los cultivos agrícolas (Tlustos *et al.*, 2006).

La tolerancia e hiperacumulación de ET se logra mediante alteraciones en los pasos típicos de la red de homeostasis general (Clemens *et al.*, 2002), que a nivel fisiológico son: (i) movilización y captación de ET en las raíces, (ii) almacenamiento de ET en las raíces o transporte radial hacia los tejidos vasculares, (iii) translocación de ET de raíz a parte aérea, y (iv) desintoxicación de ET y / o almacenamiento en vacuolas de parte aérea. Si bien la estrategia de exclusión se puede lograr atenuando la absorción de ET por las raíces, aumentando su expulsión radical, incrementando el almacenamiento de ET en la pared celular y / o las vacuolas de las raíces, la hiperacumulación de ET requiere una mejor absorción y transporte de ET en las raíces, una mejora en la translocación a parte aérea, distribución eficiente del ET y almacenamiento vacuolar en parte aérea (Viehweger, 2014). Para que una especie sea considerada hiperacumuladora, la concentración de ET en la parte aérea debe ser mayor al 1 % del peso seco de la planta (van der Ent *et al.*, 2013).

Las fitotecnologías tienen en cuenta estos mecanismos o estrategias que las plantas desarrollan naturalmente (Figura 4.1). La fitoestabilización propone limitar la movilidad y

biodisponibilidad de los ET en el suelo a través de la acción rizosférica (Bolan *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2013). Para esta tecnología, es deseable que las plantas sean exclusoras o acumulen ET a muy bajas concentraciones en su parte aérea (Sheoran *et al.*, 2011). Por el contrario, para tecnologías de fitoextracción, se requiere que las plantas acumulen una elevada concentración de ET en la parte aérea.

A su vez, la tasa de remoción de ET depende de su concentración en biomasa aérea y de la biomasa total cosechada. En especies comunes, no-acumuladoras, el bajo potencial para la bioconcentración de ET es frecuentemente compensado por la producción de un mayor volumen de biomasa (Fagnano *et al.*, 2020; Khodaverdilloo *et al.*, 2020). Sin embargo, todas estas tecnologías se encuentran condicionadas por la elección de las especies vegetales.

El raigrás (*Lolium perenne* L) es una especie de rápida germinación, establecimiento y rebrote, que le confiere una gran capacidad competitiva. Presenta dos picos de producción anual: en otoño y otro de mayor magnitud en primavera. Fue definida por Smith y Bradshaw (1979) como una especie metalófito, ya que resiste una elevada biodisponibilidad de ET mediante diversos mecanismos celulares (Whiting *et al.*, 2004). Suele considerarse una especie indicadora, ya que la concentración de ET en sus tejidos aumenta con el incremento de dichos elementos en el suelo (Gorlach *et al.*, 1990; Domínguez *et al.*, 1998), con altos rendimientos en materia seca (Pichtel y Salt, 1998). De hecho, Arienzo *et al.* (2004) mostraron que se podía implantar raigrás en suelos contaminados con ET sin que la planta presente signos de fitotoxicidad.

Desde el punto de vista de la absorción, es la especie que posee el sistema radical más denso, en forma de cabellera, como consecuencia de tener raíces de menor diámetro, lo cual representa una mayor capacidad de exploración de suelo y posibilidad de nutrición, a la vez de incrementar la fertilidad física, mejorando la estructura del suelo en forma muy superior a la de otras gramíneas. En este sentido, la especie *Lolium perenne* es muy utilizada para reducir la lixiviación de contaminantes (Houben *et al.*, 2012), en programas

de control de erosión de suelos (Reubens *et al.*, 2007), y en estudios de fitorremediación de suelos contaminados, tanto como fitoextractora (Gunawardana *et al.*, 2010) como fitoestabilizadora (Bidar *et al.*, 2009).

Actualmente existe una tendencia creciente en el uso de plantas autóctonas o no invasivas para disminuir cualquier efecto dañino sobre los ecosistemas mediante la introducción de plantas exóticas al medio ambiente (Suchkova *et al.*, 2014). Por lo tanto, es importante explorar el potencial fitoremedfiador de especies nativas. La discaria (*Discaria americana*) es una planta nativa arbustiva, que establece una simbiosis fijadora de nitrógeno con actinomicetes del género *Frankia* en la rizósfera, capaz de acumular altas concentraciones de Zn (Cusato *et al.*, 2007), pudiendo ser una especie adecuada para la fitoestabilización o fitoextracción de ET en suelos enmendados con biosólidos.

Cabe destacar que la deficiencia de nitrógeno limita, en ocasiones, el establecimiento de flora en los suelos. *Frankia* es un género de bacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno que viven en simbiosis con plantas actinorrícicas nativas y varios géneros rizosféricos como *Streptomyces*, *Micromonopora*, *Actinoplanes*, *Nocardia* y *Actinomadura* (Cusato y Tortosa, 1998; Chaia *et al.*, 2006; Solans y Vobis, 2003; Arancibia *et al.*, 2018). El hecho de que esta bacteria filamentosa haga simbiosis con miembros de ocho familias, muestra una de las grandes diferencias que existen entre ella y otra bacteria simbiótica fijadora de nitrógeno, *Rhizobium*, cuyos géneros hospederos pertenecen, en su mayoría, a la familia de las leguminosas.

El establecimiento de la simbiosis contribuye a que las plantas actinorrícicas sean capaces de crecer en suelos de baja fertilidad, en ambientes extremos como suelos arenosos o áreas semiáridas. De este modo, las plantas actinorrícicas son pioneras en la sucesión ecológica, siendo excelentes opciones en los procesos de reforestación o para ser empleadas como plantas pioneras en la restauración de suelos perturbados (Diem y Dommergues, 1990; Schwenke y Carú, 2001; Benson *et al.*, 2004). Cabe destacar que su tasa de fijación de nitrógeno es igual o más alta que la correspondiente a especies

leguminosas (Torrey, 1978; Dommergues, 1997; Busse, 2000). De esta manera, la estructura de los suelos de baja fertilidad se mejora por el efecto de las raíces. Además, el ecosistema edáfico se activa a causa de la secreción de compuestos, nutrientes y nitrógeno biológicamente fijado, derivado de bacterias del nódulo radical. Estas especies son capaces de establecerse en sitios con altas concentraciones de ET (Bécquer, 2004; Dary *et al.*, 2010).

El objetivo de este capítulo fue examinar la capacidad de la *Discaria americana* para extraer Cu y Zn en un suelo arenoso enmendado con biosólido puro y biosólido enriquecido con sus propias cenizas, comparado con raigrás (*Lolium perenne* L.).

Se hipotetiza que la aplicación de biosólidos (B) o biosólidos adicionados con sus propias cenizas (Z) no produce efectos fitotóxicos para la implantación o desarrollo de *Discaria americana*, siendo una especie apta para tecnologías de fitorremediación de suelos enmendados con biosólidos.

4.2 Materiales y Métodos

Los detalles del ensayo figuran en el Capítulo 3.

Muestreo de biomasa

Se realizaron tres muestreos de biomasa aérea (BMA) de raigrás. Los muestreos se efectuaron cuando la biomasa aérea de la mayoría de los tratamientos alcanzó una altura de 10 cm. El último muestreo se realizó al finalizar el ensayo. Los cortes de BMA se efectuaron los días 105, 140 y 180. Debido a la morfología del sistema radical del raigrás, constituido por raíces en cabellera muy finas, se vio limitada la posibilidad de extraer biomasa radical para determinar la concentración de Cu o Zn en esos tejidos.

Dado el menor crecimiento de la planta arbustiva *Discaria americana*, originalmente se planeó realizar dos muestreos: uno a los 140 días y el segundo a los 180 días de iniciado el ensayo. Luego de la implantación, y en la mayoría de las repeticiones de los tratamientos

de *Discaria* con biosólidos (SBP2) hubo gran mortandad de plántulas, que hizo necesaria su reimplantación durante los primeros 15 días, sin observarse resultados similares en el tratamiento SZP2. Entre los días 120-130 comenzaron a observarse síntomas de fitotoxicidad en los tratamientos SBP2. Para el primer muestreo, se retiraron 4 macetas completas por tratamiento, ya que cada maceta constituyó una unidad experimental. Luego del primer muestreo, en las 4 macetas restantes por tratamiento, se observó mortandad de las especies implantadas en los dos tratamientos con biosólidos, SBP2 y SZP2, con lo cual no se pudo realizar un segundo muestreo. La biomasa recolectada a los 140 días se dividió en parte aérea y raíz. Las raíces se lavaron con una solución de ácido clorhídrico al 1 % durante 15 s, después con agua desionizada durante 10 s. y se dejaron escurrir. Todo el material vegetal se secó en estufa a 60 C durante 96 h.

Determinaciones

Se determinó biomasa (base seca) en cada corte y para cada tratamiento. Posteriormente, las muestras de biomasa aérea y radical se sometieron a una digestión ácida (HNO_3 : HClO_4 70:30 V:V) para la determinación de Cu y Zn (Zhao *et al.*, 1994). La concentración de los elementos en los extractos se determinó mediante ICP-AES en el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), departamento UO-Metales, Argentina. Los límites de cuantificación fueron de 60 y 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para Cu y Zn, respectivamente. En todos los casos, los análisis se realizaron por triplicado, con un desvío estándar menor al 1 %. Los análisis de contrastaron con material de referencia (spinach leaves, NIST 1570a).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), previa comprobación de homogeneidad de varianzas (prueba de Bartlett) y de normalidad de datos (prueba de Shapiro-Wilk). En caso de no cumplirse la homogeneidad de varianza, las variables se transformaron para su análisis estadístico (Kuehl, 1994). Se aplicaron las funciones logaritmo decimal, inversa, potencia (cuadrado y cubo). En todos los gráficos se utilizaron

las variables sin transformar. Las medias, o medias transformadas, se analizaron mediante la prueba de Tukey, con el nivel de significancia de $p = 0.05$. Se utilizó el programa Statistics (versión 1.0, 2000).

4.3 Resultados y Discusion

Biomasa aérea

Raigrás

En los suelos enmendados con biosólidos (SBP1) o biosólidos adicionados con sus propias cenizas (SZP1), se observó una demora de 5-7 días en la germinación de raigrás comparado con el suelo testigo. Estos resultados coinciden con los observados en ensayos anteriores con biosólidos (Torri *et al.*, 2011 a), y puede atribuirse, o ser, la interacción de distintos factores como el contenido salino que presentan ambas enmiendas (Figura 3.7) o a la presencia de sustancias potencialmente tóxicas. El alto contenido salino origina una elevada presión osmótica en la solución del suelo. La germinación de las semillas comienza con el ingreso de agua en la semilla (imbibición) y finaliza con el inicio de la elongación del eje embrionario, principalmente la radícula (Zanetti *et al.*, 2019). La cantidad total de agua y/o solutos tomados durante la imbibición es generalmente muy pequeña, ya que no excede en dos a tres veces el peso seco de la semilla. Este proceso depende de varios factores, entre los cuales se encuentran el potencial agua y la permeabilidad de la cubierta de la semilla (Simon, 1984; Balestri *et al.*, 2019). Como el ingreso de agua a la semilla ocurre bajo un gradiente de potencial, una elevada concentración salina en la solución del suelo minimiza, o invierte, dicho gradiente, perjudicando la germinación (Myers y Couper, 1989).

La presencia de sustancias potencialmente tóxicas también puede disminuir el porcentaje de germinación. Estas sustancias incluyen los ET, ácidos, o compuestos orgánicos de bajo peso molecular originados por la biodegradación de la materia orgánica menos estabilizada (Brodie *et al.*, 1994; Hoekstra *et al.*, 2002). Los biosólidos son ricos en

proteínas y compuestos nitrogenados de baja masa molar, que pueden resultar en la liberación inicial de amonio, provocando inhibición en la germinación o crecimiento inicial de plántulas (Britto y Kronzucker, 2002; Silveira y Kohmann, 2020). La toxicidad por amonio puede manifestarse a menores concentraciones que la correspondiente a la toxicidad salina (Pan *et al.*, 2016). La mayoría de las especies vegetales exhiben una mayor afinidad por la absorción de amonio que de nitrato, pero la acumulación de amonio en las células no es adecuada para el normal crecimiento de las plantas debido a problemas de toxicidad (Boudsocq *et al.*, 2012). Cabe destacar que, una vez implantado, no se observaron problemas de crecimiento o síntomas de fitotoxicidad en raigrás a lo largo del ensayo.

En la Figura 4.2 se observa la producción de BMA (base seca) del raigrás en el suelo testigo (STP1), en el suelo enmendado con biosólidos (SBP1), y en el suelo enmendado con biosólidos adicionados con sus propias cenizas (SZP1), en cada uno de los cortes.

El efecto de la incorporación de ambas enmiendas (B y Z) fue evidente para la producción de biomasa aérea de raigrás en los tres cortes efectuados. En el primer y segundo muestreo se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con biosólidos o biosólidos adicionados con sus propias cenizas, sin diferencias significativas en el tercer muestreo (Tukey, $p < 0.05$).

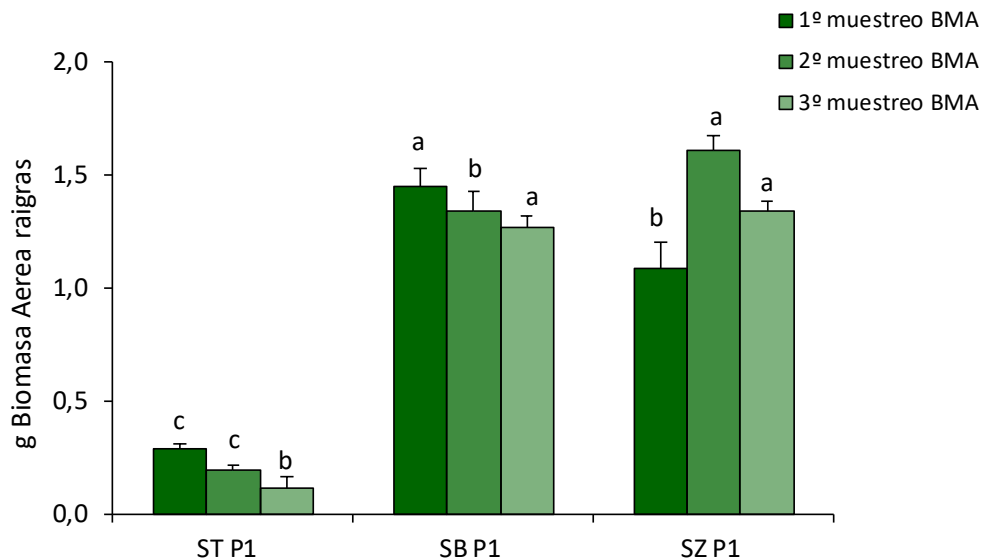


Figura 4.2: Biomasa aérea de raigrás (base seca, g) en los cortes efectuados los días 105, 140 y 180. Tratamientos: suelo testigo (ST), suelo enmendado con biosólidos (SB), suelo enmendado con biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas (SZ). El análisis estadístico se efectuó para cada muestreo. Letras diferentes para el mismo muestreo indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$). Las barras verticales representan la desviación estándar.

El incremento significativo de biomasa observado en los suelos enmendados con B o Z con respecto al testigo está relacionado con el incremento en la biodisponibilidad de macro y micronutrientes en SB y SZ debido a la mineralización de la materia orgánica del biosólido (Latare *et al.*, 2014), a las mejores condiciones de fertilidad física de los suelos (Corrêa y da Silva, 2016; Esperschuetz *et al.*, 2016) y al incremento en la capacidad de retención hídrica (Lekfeldt *et al.*, 2017; Tejada y Gonzalez, 2007). Estos resultados se observaron también en otros cultivos en suelos enmendados con biosólidos (Burducea *et al.*, 2019; Eid *et al.*, 2019; Fan *et al.*, 2019). La menor producción de biomasa aérea en el tercer corte sugiere una menor disponibilidad de nutrientes, aunque se observa un efecto residual de la aplicación de B o Z en el tercer corte, evidenciado por una mayor producción de biomasa aérea comparada con el tratamiento testigo.

En la Figura 4.3 se presenta la producción total de biomasa aérea de raigrás, calculada como la suma de la biomasa producida en cada corte (base seca) en cada uno de los tratamientos.

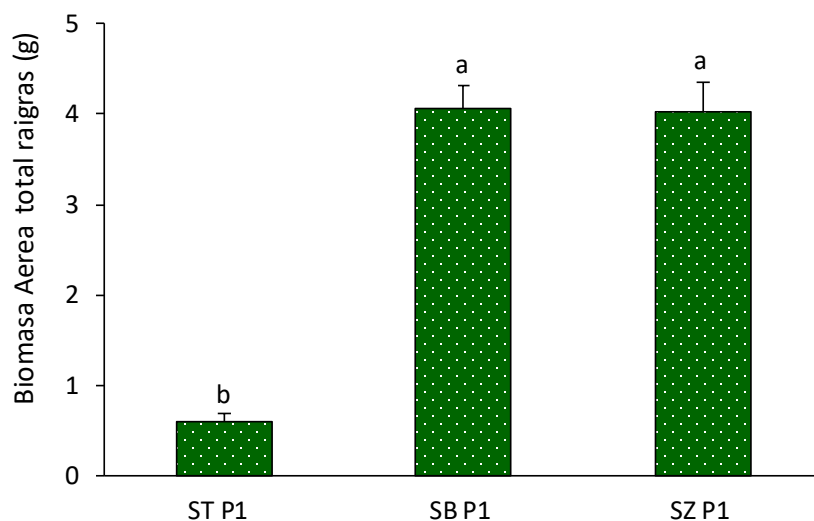


Figura 4.3: Producción total de BMA (base seca) en cada tratamiento: suelo testigo (ST), suelo enmendado con biosólido (SB), suelo enmendado con biosólidos adicionado con 30 % de sus propias cenizas (SZ). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$). Las barras verticales representan la desviación estándar.

En la Figura 4.3 se observa que la producción total de biomasa aérea de raigrás en los suelos enmendados con biosólidos o biosólidos adicionados con sus propias cenizas fue significativamente superior al suelo testigo. No se observaron diferencias significativas en BMA total entre los tratamientos B y Z. Estos resultados indican que los elementos incorporados al suelo a través de las cenizas del biosólido no se hallaban en formas fitotóxicas para esta especie, a diferencia de lo observado en ciertos casos por Bache y Linsk (1990) en raigrás cultivado en suelos enmendados con cenizas.

Numerosos trabajos indicaron que el incremento de biomasa de los cultivos cosechados en suelos enmendados con biosólidos no solo se debe al mayor contenido de materia orgánica del suelo, que mejoró la fertilidad física y química de los suelos (Sharma *et al.*, 2017), sino a un incremento en la actividad biológica, que promueve la liberación de formas nitrogenadas lábiles, favoreciendo la producción de biomasa (Boudjabi *et al.*, 2019).

Discaria americana

En la Figura 4.4 se presenta la producción de biomasa aérea y radical (base seca) de *Discaria americana* en el suelo testigo (STP2), enmendado con biosólidos (SBP2) o biosólidos adicionados con sus propias cenizas (SZP2) a los 140 días del inicio del ensayo

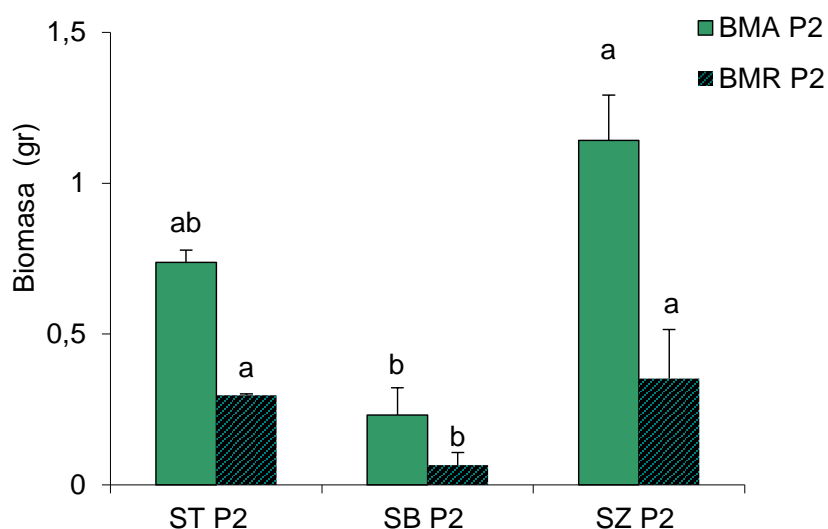


Figura 4.4: Biomasa aérea y radical de *Discaria americana* (base seca, g). Tratamientos: suelo testigo (ST), suelo enmendado con biosólido (SB), suelo enmendado con biosólidos adicionados con 30 % de sus propias cenizas (SZ). El análisis estadístico se efectuó por separado para biomasa aérea o radical. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$). Las barras verticales representan la desviación estándar.

Como se mencionó en la sección Materiales y Métodos, a partir de día 140 se generalizaron los síntomas de fitotoxicidad, originando la necrosis de todas las especies implantadas en los suelos enmendados con B o Z antes de día 160.

En la Figura 4.4 no se observan diferencias significativas en biomasa aérea de discaria entre los tratamientos STP2 y SZP2. Tampoco se observaron diferencias significativas en la biomasa radical entre estos dos tratamientos.

Por el contrario, los suelos enmendados con biosólidos (SBP2) presentaron una biomasa aérea sin diferencias significativas con el testigo, pero significativamente inferior al tratamiento SZP2. A su vez, la biomasa radical fue significativamente inferior en este tratamiento comparado con STP2 y SZP2. Tanto la biomasa aérea como radical indican menor crecimiento en SBP2 comparado con los otros dos tratamientos (STP2 y SZP2). Estos resultados pueden atribuirse a la elevada dosis de aplicación de biosólidos, que originó una elevada concentración de Cu biodisponible al final del período de estabilización, como puede observarse en la concentración de Cu-INT (Figura 3.9). Sin embargo, al finalizar el ensayo, solamente se pudo cuantificar Cu-INT en el suelo enmendado con biosólidos sin planta (SB) y en el suelo enmendado con biosólidos y raigrás (SBP1). El hecho de no poder cuantificar Cu-INT en el suelo enmendado con biosólidos y *D. americana* indica que esta especie presentó una elevada absorción de Cu. A su vez, al finalizar el período de estabilización, se observó una concentración significativamente más elevada de Zn-INT en los suelos enmendados con biosólidos con respecto a los testigos, mientras que, al finalizar el ensayo, se observó que la presencia de *D. americana* disminuyó significativamente la concentración de Zn-INT en los suelos enmendados con biosólidos, indicando una mayor absorción de Zn comparado con raigrás. Estos resultados pueden haber generando un efecto tóxico en el crecimiento de la *D. americana* (Rui You *et al.*, 2020). En el caso del tratamiento Z, es probable que inicialmente la matriz inorgánica del biosólido haya contribuido para retener los ET en

formas de menor disponibilidad, de acuerdo a lo observado en otros trabajos (Torri y Lavado, 2009 a).

El uso de especies arbóreas o arbustivas de crecimiento rápido es una herramienta prometedora para remediar suelos, a la vez de reducir el contenido de CO₂ atmosférico debido a la producción de biomasa (Conesa *et al.*, 2012; Dauber *et al.*, 2012; Shortall, 2013; Calfapietra *et al.*, 2010). La discaria presenta la ventaja de ser una planta nativa, pero su crecimiento fue más lento que el correspondiente al raigrás (0.7-1 g de biomasa aérea frente a 4 g de raigrás en SBP1 y SZP1), lo que podría deberse al mejor establecimiento del raigrás como resultado de las diferentes estrategias desarrolladas por cada familia de plantas. De todos modos, el hecho que la discaria presente un crecimiento más lento que el raigrás no sería un impedimento, ya que podrían utilizarse las dos especies en conjunto, logrando una mejor cobertura (raigrás) y una acción remediadora en mayor profundidad por la acción radical de la discaria, cuyas raíces son más profundas.

Concentración de Cu en biomasa vegetal

Raigrás

En la Figura 4.5 se presenta la concentración de Cu en biomasa aérea (BMA) de raigrás para cada uno de los muestreos en los tratamientos realizados.

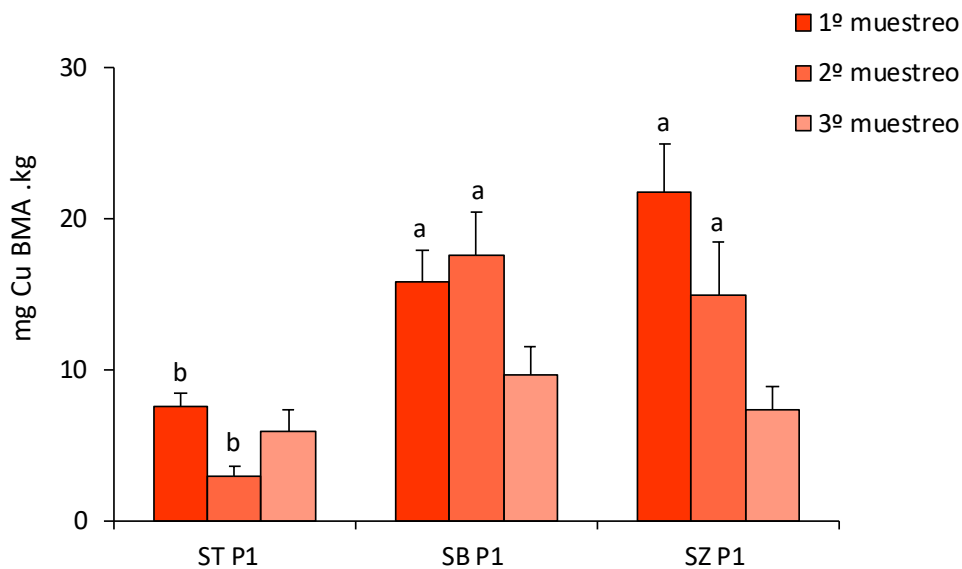


Figura 4.5: Concentración de Cu total en biomasa aérea de raigrás en los cortes efectuados los días 105, 140 y 180 en el suelo Hapludol típico. Tratamientos suelo testigo (ST), suelo enmendado con biosólidos (SB) y suelo enmendado con biosólidos más cenizas (SZ). Letras diferentes en el mismo corte indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar.

En el suelo testigo, la concentración de Cu en los tres muestreos de BMA de raigrás se encontró dentro de las concentraciones medias consideradas normales para pasturas (Kubota, 1983; Davis y Beckett, 1978).

Los tratamientos con B o Z presentaron, en el primer y segundo corte de BMA de raigrás, una concentración de Cu significativamente más elevada que el testigo (Figura 4.5). No hubo evidencia de toxicidad, incluso en el primer corte del tratamiento SZP1, que presentó la concentración más alta de Cu en BMA ($21.7 \text{ mg Cu} \cdot \text{kg}^{-1}$). En la bibliografía se indica que concentraciones entre $20\text{-}100 \text{ mg Cu} \cdot \text{kg}^{-1}$ en BMA son consideradas tóxicas para la mayoría de las plantas (Jones, 1991), aunque el valor umbral varía entre especies y entre cultivares. Por ejemplo, Cottenie *et al.* (1976) informaron inhibición del crecimiento en brotes de maíz cuando éstos presentaron una concentración de $20 \text{ mg Cu} \cdot \text{kg}^{-1}$, mientras que una concentración foliar de $40 \text{ mg Cu} \cdot \text{kg}^{-1}$ originó una reducción del 50% del

crecimiento. En la Figura 4.2 se observa una menor producción de BMA en este tratamiento con respecto a SBP1, que fue compensado en el segundo corte, sin evidenciar síntomas de toxicidad.

En el tercer corte, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos STP1, SBP1 y SZP1. Abdul Rida (1996) observó que los vegetales absorben los elementos de los “pools” más lábiles, y por lo tanto poseen la habilidad de agotar el “pool” de elementos disponibles en el suelo. Domínguez *et al.* (1998) también observaron una menor concentración de Cu en los cortes sucesivos de raigrás para distintas dosis de biosólidos. En este ensayo, la ausencia de diferencias significativas entre SBP1, SZP1 y STP1 podría indicar un agotamiento del pool más lábil de cobre en los suelos enmendados con B o Z.

Discaria

En la Figura 4.6 se presenta la concentración de Cu en biomasa aérea y radical de *Discaria americana* para el muestreo efectuado a los 140 días del inicio del ensayo en todos los tratamientos realizados.

No se observaron diferencias significativas en la concentración de Cu en biomasa aérea (BMA) para los suelos testigo (STP2) y el suelo enmendado con biosólidos mas cenizas (SZP2). Por el contrario, el suelo enmendado con biosólidos (SBP2) presentó concentraciones de Cu en BMA significativamente mayores que SiTP2 y SiZP2 (Figura 4.6). Este resultado podría estar indicando una falta de regulación en la concentración de Cu en biomasa aérea de *discaria* en el tratamiento con biosólidos.

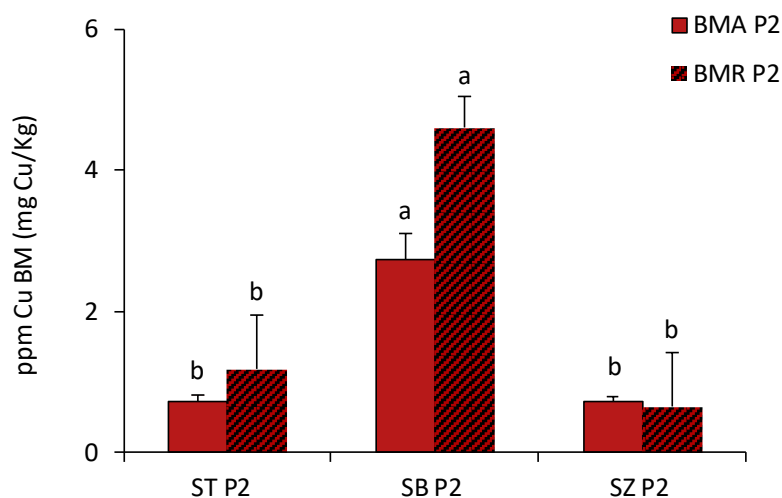


Figura 4.6: Concentración de Cu total en biomasa aérea (BMA) y biomasa radical (BMR) de *Discaria americana* cultivada en el suelo Hapludol típico. Tratamientos suelo testigo (ST), suelo enmendado con biosólidos (SB) y suelo enmendado con biosólidos más cenizas (SZ). Letras diferentes en biomasa aérea o radical indica diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar.

La biomasa radical (BMR) presentó la misma tendencia. siguiendo el orden de significancia $SBP2 > STP2 \approx SZP2$ (Tukey, $p < 0,05$). Esta elevada concentración de Cu en BMA y BMR podría explicar los síntomas de toxicidad observados, que originaron la posterior necrosis de las plantas.

La toxicidad de los ET es una consecuencia directa de la concentración de formas bioasimilables, es decir, en la solución del suelo y formas adsorbidas. El Cu es un elemento esencial para el crecimiento vegetal, pero es requerido en muy baja concentración, siendo clasificado como micronutriente. Si su biodisponibilidad es elevada pueden originarse síntomas de toxicidad para especies vegetales y organismos (Sandstead, 1995; Printz *et al.*, 2016). Como ya se mencionó, la dosis de biosólidos aplicada originó una elevada biodisponibilidad de Cu al final del período de estabilización (Cu-INT, Figura 3.9). Sin embargo, al finalizar el ensayo, solamente se pudo cuantificar Cu-INT en el suelo

enmendado con biosólidos sin planta (SB) y en el suelo enmendado con biosólidos y raigrás (SBP1). El hecho de no poder cuantificar Cu-INT en el suelo implantado con *D. americana* y enmendado con biosólidos indica que esta especie presentó una elevada absorción de Cu. Los síntomas de toxicidad por Cu se relacionan con la reducción de crecimiento, especialmente de la raíz. Las plantas con síntomas de toxicidad por Cu presentan raíces con ápices más cortos y gruesos, debido a los cambios en la división celular y en la disposición de los tejidos, así como menor densidad radical que se refleja en una absorción reducida de nutrientes y, por lo tanto, menor producción de biomasa (De Conti *et al.*, 2019; Marastoni *et al.*, 2019). Los casos más severos incluyen clorosis y necrosis foliar y, posteriormente, síntomas de senescencia y abscisión.

Dada la concentración significativamente mayor de Cu en biomasa aérea y radical en SiBP2, y a la baja biomasa aérea y radical generada en ese tratamiento, es probable que se hayan desarrollado síntomas de toxicidad por Cu.

Concentración de Zn en biomasa vegetal.

Raigrás

En la Figura 4.7 se presenta la concentración de Zn en BMA de raigrás para cada corte y en cada uno de los tratamientos realizados.

En el suelo testigo, la concentración de Zn en los tres muestreos de BMA de raigrás se encontró dentro de las concentraciones medias consideradas normales para pasturas (Davis y Beckett, 1978).

En todos los cortes, la aplicación de B o Z incrementó significativamente la concentración de Zn en BMA de raigrás comparado con el suelo testigo. A su vez, los suelos enmendados con B presentaron concentraciones de Zn en BMA significativamente superiores a los suelos enmendados con Z en todos los muestreos efectuados. Estos resultados ponen de manifiesto que, si bien los biosólidos más cenizas presentaron una concentración total de

Zn más elevada que el biosólido puro, dicho elemento se encontró en formas no disponibles para el raigrás durante el periodo que duró el ensayo.

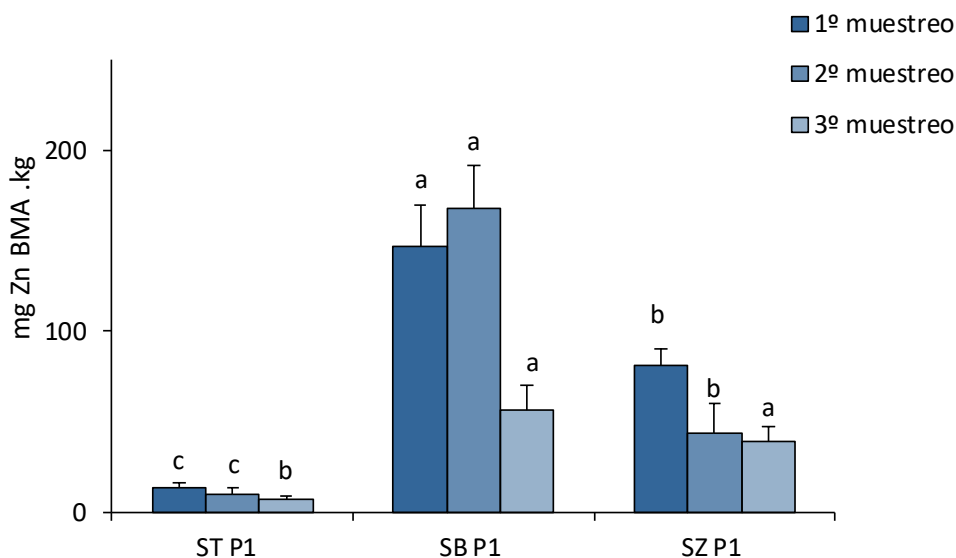


Figura 4.7: Concentración de Zn total en biomasa aérea de raigrás en los cortes efectuados los días 105, 140 y 180 en el suelo Hapludol típico. Tratamientos testigo (STP1), suelo enmendado con biosólidos (SBP1) y suelo enmendado con biosólidos más cenizas (ZSZP1). Letras diferentes en el mismo corte indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar.

La máxima concentración de Zn en BMA se observó en el primer y segundo corte del tratamiento SBP1. Según Pinkerton *et al.* (1997), concentraciones superiores a $375 \text{ mg Zn} \cdot \text{kg}^{-1}$ son extremadamente tóxicas para *Lolium perenne* y las gramíneas en general, y su efecto se exagera cuando se combina con otras toxicidades. En el segundo corte, la máxima concentración de Zn en BMA fue de $168 \text{ mg Zn} \cdot \text{kg}^{-1}$ en el tratamiento SBP1, por debajo del valor umbral y sin signos aparentes de toxicidad.

El tercer muestreo de BMA presentó una menor concentración de Zn comparado con los muestreos anteriores. Este descenso posiblemente se originó por un paulatino

agotamiento de las formas disponibles de Zn. Por otro lado, el Zn tiende a pasar a formas de menor disponibilidad en suelos enmendados con biosólidos o biosólidos adicionados con sus propias cenizas, como se discutió en el Capítulo anterior, que podría explicar su menor disponibilidad y, por ende, su menor concentración en biomasa aérea.

Discaria

En la Figura 4.8 se observa la concentración de Zn en BMA y BMR de *Discaria americana* para el muestreo efectuado a los 140 días del inicio del ensayo en todos los tratamientos.

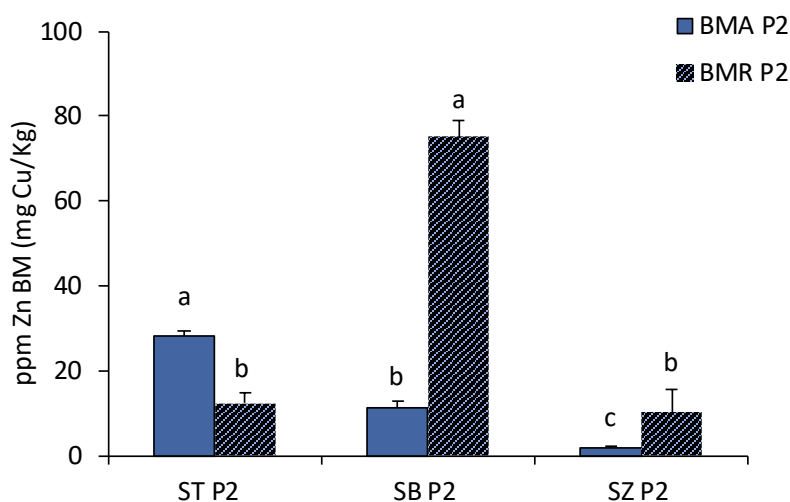


Figura 4.8: Concentración de Zn total en biomasa aérea y radical de *Discaria americana* cultivada en el suelo Hapludol típico. Tratamientos suelo testigo (ST), suelo enmendado con biosólidos (SB) y suelo enmendado con biosólidos más cenizas (SZ). Letras diferentes en biomasa aérea o radical indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$). Las barras verticales representan la desviación estándar.

La concentración de Zn en biomasa aérea en STP2 fue significativamente más elevada que la correspondiente al suelo enmendado con biosólidos y al suelo enmendado con

biosólidos mas cenizas. De este modo, la concentración de Zn en BMA sigue la secuencia de significancia STP2 > SBP2 > SZP2.

Por el contrario, la concentración de Zn en biomasa radical siguió el orden de significancia SBP2 > STP2 \approx SZP2 (Tukey, $p < 0,05$). Estos resultados estarían indicando que la *Discaria americana* se estaría comportando como una especie excluyente en relación al Zn, que desarrolló mecanismos fisiológicos para resistir o tolerar una elevada disponibilidad de Zn en el suelo (Becerril *et al.*, 2007), de acuerdo a los resultados reportados por Cusato *et al.* (2007).

De esta manera, la *Discaria americana* podría ser utilizada en tecnologías de fitoestabilización, inmovilizando Zn a través de su absorción y acumulación en las raíces o facilitando precipitación en la rizósfera (Barceló y Poschenrieder, 2003; Alkorta *et al.*, 2004). Si bien Baker (1981) denominó a este tipo de plantas como excluyentes, otros autores consideran que esta denominación no es correcta, señalando que, si las raíces presentan un elevado contenido de ET, entonces no existe un mecanismo de exclusión, sino un mecanismo que limita la circulación de ET desde las raíces hacia la parte aérea (Bradshaw y Mcneilly, 1985).

4.4 Conclusiones

En este capítulo, se evaluó la capacidad que presenta la *Discaria americana* para actuar como especie remediadora en suelos enmendados con biosólidos o biosólidos enriquecidos con sus propias cenizas, en forma comparativa al raigrás.

El raigrás resultó ser una especie apta para tecnologías de remediación de suelos degradados enmendados con biosólido o biosólido más cenizas. Si bien ambas enmiendas originaron una demora en la germinación con respecto al testigo, no se observaron síntomas de toxicidad, y presentó un incremento significativo de biomasa en los suelos enmendados. Estos resultados están relacionados con la liberación de nutrientes por

parte de las enmiendas, a las mejoras en la fertilidad física de los suelos y al aumento de la capacidad de retención hídrica en los suelos enmendados. El raigrás se comportó como una especie indicadora. La acumulación de Cu y Zn en biomasa vegetal fue inicialmente significativamente mayor en los suelos enmendados con respecto al testigo, disminuyendo a lo largo del tiempo, indicando una disminución en la biodisponibilidad de este elemento.

La *Discaria americana* es una especie sensible en suelos enmendados con el equivalente a 150 T/ha de biosólidos, que se tradujo en una menor biomasa aérea y radical. Estos efectos se manifestaron a partir de los 120 días de inicio del ensayo, originando la completa mortandad en el tratamiento SiBP2. Los resultados sugieren que se originó fitotoxicidad por la presencia de una elevada disponibilidad de Ciu en los suelos enmendados con biosólidos. En relación al Zn, la *Discaria americana* se comporta como exclusora, debido a la elevada concentración de Zn en biomasa radical comparado con biomasa aérea. Se concluye en que esta especie no es adecuada para ser utilizada como fitoestabilizadora en suelos arenosos enmendados con biosólidos de características semejantes a los utilizados en este trabajo de Tesis, en dosis equivalentes de 150 t·ha⁻¹. Por el contrario, la *Discaria americana* no manifestó efectos fitotóxicos en los suelos enmendados con biosólidos más cenizas. Estos resultados ponen de manifiesto que la matriz inorgánica de los biosólidos fue capaz de retener elementos traza en formas de menor biodisponibilidad.

CAPÍTULO V

CONSIDERACIONES FINALES

El aprovechamiento de residuos orgánicos de origen urbano para restaurar suelos degradados constituye un destino aceptable desde el punto de vista ecológico y económico. Los biosólidos presentan altos contenidos de materia orgánica y nutrientes que, a priori, les confieren un alto potencial para ser utilizados en la restauración de suelos degradados, mejorando las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos. Sin embargo, su uso puede implicar el ingreso de elementos traza a los suelos, que podría ocasionar diversos riesgos si su biodisponibilidad en los suelos es elevada, siendo necesaria su estabilización o reducción.

Los suelos enmendados con materiales orgánicos no suelen dejarse desnudos. El establecimiento de una cobertura vegetal contribuye a disminuir los procesos de mineralización de la materia orgánica recientemente incorporada, minimiza la dispersión de partículas a través del viento y/ o procesos de escorrentía, y reduce la transferencia hídrica a través del suelo, pudiendo combinarse con fitotecnologías de remediación.

Recientemente, se manifestó un creciente interés por el uso de plantas nativas para estas fitotecnologías, con el fin de reducir cualquier efecto negativo originado por la introducción de especies exóticas en el ecosistema. Este trabajo de Tesis analizó la capacidad que presenta la *Discaria americana* para fitorremediar Cu y Zn en suelos enmendados con biosólidos en comparación con *Lolium perenne*.

Se realizó un bioensayo de germinación para evaluar los efectos de dosis crecientes de biosólido puro y biosólido enriquecido con sus propias cenizas sobre ciertos parámetros de germinación de raigrás (*Lolium perenne* L.) y discaria (*Discaria americana*), sin observarse efectos fitotóxicos en ninguna de las dos especies. Solo el raigrás manifestó

una merma significativa en el porcentaje de germinación con la mayor dosis de biosólido más cenizas, relacionado con la elevada CE del extracto.

Posteriormente, se analizó la influencia de la actividad radical de la *Discaria americana* y raigrás (*Lolium perenne* L.) sobre la distribución de Cu y Zn entre las distintas fracciones edáficas al cabo de 180 días en un suelo de textura arenosa enmendado con biosólidos o biosólido enriquecido con sus propias cenizas.

A lo largo del ensayo, se observó una redistribución de Cu y Zn. A su vez, la actividad radical del raigrás y la discaria modificó los equilibrios entre las fracciones edáficas de Cu y Zn en el suelo enmendado con biosólidos o con biosólidos mezclado con sus propias cenizas.

A los 180 días de iniciado el ensayo, la concentración de Cu en la fracción intercambiable se encontró, en casi todos los tratamientos, por debajo del límite de cuantificación. A su vez, se observó una disminución en la concentración de Cu-MO en los suelos sin enmendar implantados con raigrás y con discaria con respecto a los suelos sin planta. En los suelos enmendados, la concentración de Cu en la fracción orgánica se encontró inversamente relacionada con el pH, mientras que se observó una correlación positiva entre Cu-INOR y pH. Por el contrario, la concentración de Zn-INT al finalizar el ensayo fue significativamente más elevada en los suelos enmendados con B y Z comparado con día 1. Dicho incremento fue superior en el suelo enmendados con B comparado con el suelo enmendado con Z. La concentración de Zn-MO se mantuvo en el mismo orden a lo largo del ensayo, mientras que la concentración de Zn-INOR fue la fracción que experimentó el mayor incremento en los suelos enmendados con B o Z, encontrándose estrechamente relacionada con el pH del suelo. En general, la presencia de *Discaria americana* y raigrás favorecieron el incremento de Zn-INOR.

El análisis de material vegetal indico que, si bien el raigrás resultó ser una especie apta para tecnologías de remediación de suelos degradados enmendados con biosólido o biosólido más cenizas, la *Discaria americana* presentó síntomas de fitotoxicidad,

posiblemente por una elevada disponibilidad de Cu en los suelos enmendados con biosólidos, aunque no se descartan factores no cuantificados en este ensayo que posteriormente originaron la necrosis de las plantas en todos los tratamientos con biosólidos. Las elevadas dosis de aplicación de biosólidos utilizadas en este ensayo pudieron haber maximizado estos efectos. En relación al Zn, la *Discaria americana* se comportó como especie exclusora, debido a la elevada concentración de Zn en biomasa radical comparada con biomasa aérea. Cabe destacar que la *Discaria americana* no manifestó efectos fitotóxicos en los suelos enmendados con biosólidos más cenizas. Estos resultados ponen de manifiesto que la matriz inorgánica de los biosólidos fue capaz de retener elementos traza en formas de menor biodisponibilidad.

Las determinaciones efectuadas en este trabajo de Tesis constituyen un aporte importante al conocimiento de la capacidad de esta especie nativa para estabilizar Cu y Zn en suelos enmendados con biosólidos. Sin embargo, las características de los biosólidos, y la concentración y propiedades de otros elementos o sustancias que pueden estar presentes en los biosólidos juegan un rol fundamental en la disponibilidad de los elementos estudiados y su potencial fitotoxicidad. Por estos motivos, estas enmiendas deben ser cuidadosamente estudiadas para aprovechar las ventajas que presentan para la remediación de suelos degradados, minimizando los posibles impactos negativos que podrían generarse como consecuencia de su uso.

Capítulo VI

REFERENCIAS

- Aarab, T., Smeyers, M., Remy, M., Godden, B., Delhaye, J.P. 2006. The storage of sewage sludge: Influence of liming on the evolution of copper chemical fractions. *Waste Manage.* 26: 1024-1032.
- Abd El-Hay G, Angle J. 1994. Sludge borne salt effects on soybean growth. 1994. Plant nutrient aspects of sewage sludge. En *Sewage Sludge: Land utilization and the Environment*. SSSA Miscellaneous Publication. ASA-CSSA-SSSA, 677 South Segoe Road, Madison, WI 53711, USA. 185.
- Abdul Rida A M. 1996. Concentration and growth of earthworms and plants in polluted (Cd, Cu, Fe, Pb and Zn) and non-polluted soils: interactions between plants-soil-earthworms. *Soil Biol. Biochem.* 28: 8, 1037-1044.
- Aboukila, E. F., Norton, J. B. (2017). Estimation of saturated soil paste salinity from soil-water extracts. *Soil Sci.*, 182(3), 107-113.
- Adriano DC. 2001. Trace elements in the terrestrial environment: Biogeochemistry, bioavailability and risks of metals, 2ª ed. Springer Verlag, New York, USA, p. 866.
- AGN 2006. Auditoría General de la Nación, Informe sobre el Ente Tripartito de Obras y Servicios Sanitarios, Memoria 2006, 62 p.
- Ahumada, I., Sepúlveda, K., Fernández, P., Ascar, L., Pedraza, C., Richter, P., Brown, S. 2014. Effect of biosolid application to Mollisol Chilean soils on the bioavailability of heavy metals (Cu, Cr, Ni, and Zn) as assessed by bioassays with sunflower (*Helianthus annuus*) and DGT measurements. *J Soils Sediments* 14, 886–896.
- Akhtar, M., Yousaf, S., Sarwar, N., Hussain, S. 2019. Zinc biofortification of cereals—role of phosphorus and other impediments in alkaline calcareous soils, *Environ. Geochem. Health*, 41:2365–2379.
- Al Wabel M I, Al Omran A M, Shalaby A A, Choudhary M I. 1998. Effect of sewage sludge on some chemical properties of calcareous sandy soils. *Comm Soil Sci Plant Anal.* 29 (17-18): 2713-2724.
- Alcacio, T. E., Hesterberg, D., Chou, J. W., Martin, J. D., Beauchemin, S., Sayers, D. E. 2001. Molecular scale characteristics of Cu (II) bonding in goethite–humate complexes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65(9), 1355–1366.
- Ali H., E. Khan, M.A. Sajad. 2013. Phytoremediation of heavy metals – concepts and applications. *Chemosphere*, 91: 869-881

- Alkorta, I., Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Amezaga, I., Albizu, I. Garbisu, C. 2004. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 3 (1) 71-90.
- Alloway B.J., Jackson A.P. 1991. The behaviour of heavy metals in sewage sludge-amended soils, *Sci. Total Environ.* 100, pp. 151–176.
- Alloway, B.J. 1995. The origin of heavy metals in soils. p. 29–39. En B.J. Alloway (ed.) *Heavy metals in soils*. 2nd ed. John Wiley and Sons Inc., New York.
- Alva A K, Huang B, Paramasivam S. 2000. Soil pH affects copper fractionation and phytotoxicity. *Soil Sci Soc Am J.* 64: 955-962.
- Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, A.P., Fernandes, R.M., Cunha-Queda, A.C., Duarte E., Vallini, G. 2007. Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. *Environment International.* 33: 505-513.
- Al-Wabel, M.A., D.M. Heil, D.G. Westfall, and K.A. Barbarick. 2002. Solution chemistry influence on metal mobility in biosolids-amended soils. *J. Environ. Qual.* 31:1157–1165.
- Amato, M. 1983. Determination of ^{12}C and ^{14}C in plant and soil. *Soil Biol.Biochem.* 15: 611-612.
- Antoniadis, V., Levizou, E., Shaheen, S. M., Ok, Y. S., Sebastian, A., Baum, C., Rinklebe, J. 2017. Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation- A review. *Earth-Science Reviews*, 171, 621-645.
- APHA 2017. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.*, American Public Health Association, Washington DC. 23rd edition, ISBN: 978-0-87553-287-5
- Arancibia, N. B., Solans, M., Mestre, M. C., Chaia, E. E. 2018. Effect of *Pinus ponderosa* afforestation on soilborne *Frankia* and saprophytic Actinobacteria in Northwest Patagonia, Argentina. *Symbiosis*.
- Argyaki, A., Kelepertzis, E., Botsou, F., Paraskevopoulou, V., Katsikis, I., Trigoni, M. 2018. Environmental availability of trace elements (Pb, Cd, Zn, Cu) in soil from urban, suburban, rural and mining areas of Attica, Hellas. *J. Geochem. Explor.*, 187, 201–213.
- Arienzo, M., Adamo, P., Cozzolino, V. 2004. The potential of *Lolium perenne* for revegetation of contaminated soil from a metallurgical site. *Sci. Total Environ.* 319: 13-25.
- Asher, C. J. 1977. Natural and synthetic culture media for spermatophytes. En: *CRC Handbook Series in Nutrition and Food*. Section G: Diets, Culture Media, Food Supplements (Ed. by M. Rechcigl Jr.), vol. 3, pp. 575-609. CRC Press, Ohio.
- Athamenh, B.M.; Salem, N.M., El-Zuraiqi, S.M., Suleiman, W., Rusan, M.J. 2015. Combined land application of treated wastewater and biosolids enhances crop production and soil fertility. *Desalination and Water Treatment* 53(12), pp. 3283-3294

- Awad, F., Römheld, V. 2000. Mobilization of heavy metals from contaminated calcareous soils by plant born, microbial and synthetic chelators and their uptake by wheat plants. *J. Plant Nutr.*, 23(11-12), 1847–1855
- Bache C A, Lisk D J. 1990. Heavy metal absorption by perennial ryegrass and swiss chard grown in potted soils amended with ashes from 18 municipal refuse incinerators. *J. Agric. Food Chem.* 38: 190-194.
- Badza, T., Tesfamariam, E. H., Cogger, C. G. 2020. Agricultural use suitability assessment and characterization of municipal liquid sludge: Based on South Africa survey. *Sci. Total Environ.*, 721, 137658.
- Baker, A.J.M. 1981. Accumulators and Excluders - Strategies in the Response of Plants to Heavy-Metals. *J. Plant Nutr.* 3: 643-654.
- Baldi, E., Cavani, L., Mazzon, M., Marzadori C, Quartieri, M., Toselli, M. 2021. Fourteen years of compost application in a commercial nectarine orchard: effect on microelements and potential harmful elements in soil and plants. *Sci. Total Environ.*, 752,141894.
- Baldivieso-Freitas, P., Blanco-Moreno, J.M., Armengot, L., Chamorro L., Romanyà, J., Sans, F.X. 2018. Crop yield, weed infestation and soil fertility responses to contrasted ploughing intensity and manure additions in a Mediterranean organic crop rotation. *Soil Tillage Res.*, 180, pp. 10-20
- Balestri, E., Menicagli, V., Ligorini, V., Fulignati, S., Raspolli Galletti, A. M., Lardicci, C. 2019. Phytotoxicity assessment of conventional and biodegradable plastic bags using seed germination test. *Ecological Indicators*, 102, 569-580.
- Barak P, Helmke P. 1993. The chemistry of Zn. En: Robson, AD (Ed) *Zinc in soils and Plants*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 1-13.
- Barceló, J. Y Poschenrieder, Ch. (2003). Phytoremediation: Principles and perspectives. *Contributions to Science*, 2(3): 333-344.
- Basta N T, Sloan J J. 1999. Bioavailability of heavy metals in strongly acidic soils treated with exceptional Quality biosolids. *J. Environ. Qual.* 28: 633-638.
- Basta NT. 2000. Example and case studies of the beneficial use of municipal by-products. En: JF Power y WA Dick, Editores, *Land Application of Agricultural, Industrial, and Municipal By-products*, Soil Science Society of American, Madison, WI, pp. 481–504
- Becerril J.M., O. Barrutia, J.I. García Plazaola, A. Hernández, J.M. Olano C. Garbisu. 2007. Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. *Ecosistemas* 16 (2): 50-55.
- Bécquer C.J. 2004. Descripción y clasificación de rizobios: Enfoque histórico, métodos y tendencias actuales. *Revista Biología* 18: 9-18.

- Bell, P.F., James B.R., Chaney R.L. 1991. Heavy metal extractability in a long term sewage sludge and metal salt amended soils. *J Environ Qual* 20: 481-486
- Bennardi, D.O., Díaz Gorostegui, A., Juan, L., Millan, G., Pellegrini, A.E., Vázquez, M.E. 2018. Evaluación de la capacidad buffer de suelos ácidos de la región pampeana, *Cienc. Suelo (Argentina)* 36 (1): 30-38, 2018
- Benson D. R., B.D. Vanden Heuvel D. Potter. 2004 Actinorhizal symbioses: diversity and biogeography. *BIOS Sc* 15:99-130.
- Bernal M P, Navarro AF, Sanchez-Monedero MA, Roig A, Cegarra J 1998. Influence of sewage sludge compost stability and maturity on carbon and nitrogen mineralization in soil. *Soil BiolBiochem* 30, 305-313.
- Berti W R, Jacobs L W. 1996. Chemistry and phytotoxicity of soil trace elements from repeated sewage sludge applications. *J. Environ. Qual* 25: 1025-1032.
- Bettiol, W., Ghini, R., 2011. Impacts of sewage sludge in tropical soil: a case study in Brazil. *Appl. Environ. Soil Sci.* 2011, 11. Article ID 212807.
- Bidar, G., Pruvot, C., Garçon, G., Verdin, A., Shirali, P., Douay, F. 2009. Seasonal and annual variations of metal uptake, bioaccumulation, and toxicity in *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal-contaminated field. *Environ Sci and Poll Research*, 16(1), 42-53.
- Bierman, P., Rosen, C. 1994. Phosphate and trace metal availability from sewage-sludge incineration ash. *J. Environ. Qual.* 23: 822-830.
- Blakemore, L., Searle, P., Daly, B. 1987. Methods for chemical analysis of soils, NZ Soil Bureau Scientific Report 80, New Zealand Soil Bureau, DSIR, Lower Hutt, New Zealand.
- Blume H P, Brummer. 1991. Prediction of heavy metal behaviour in soil by means of simple field tests. *Ecotoxicol. Envir. Safety*, 22:164-174.
- Bogusz, A., Oleszczuk, P. 2018. Sequential extraction of nickel and zinc in sewage sludge- or biochar/sewage sludge-amended soil. *Sci. Total Environ.*, 636, 927-935.
- Bolan, N. S., Adriano, D. C., Kunhikrishnan, A., James, T., McDowell, R., Senesi, N. 2011. Dissolved organic matter. *Adv. Agron.*, 1–75.
- Bolan, N; Kunhikrishnan, A; Thangarajan, R; Kumpiene, J; Park, J; Makino, T; Kirkham, M; Scheckel, K. 2014. Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize? *J. Hazard. Mater.*, 266(), 141–166.
- Bosch-Serra, A. D., Yagüe, M. R., Valdez, A. S., Domingo-Olivé, F. (2020). Dairy cattle slurry fertilization management in an intensive Mediterranean agricultural system to sustain soil quality while enhancing rapeseed nutritional value. *J. Environ. Manage.*, 273, 111092.

- Boudjabi, S., Kribaa, M., Chenchouni, H. 2019. Sewage sludge fertilization alleviates drought stress and improves physiological adaptation and yield performances in Durum Wheat (*Triticum durum*): A double-edged sword *Journal of King Saud University - Science* 31(3), pp. 336-344
- Boudsocq, S., A. Niboyet, J. C. Lata, X. Raynaud, N. Loeuille, J. Mathieu, M. Blouin, L. Abbadie, S. Barot. 2012. Plant preference for ammonium versus nitrate: A neglected determinant of ecosystem functioning? *The American Naturalist* 180: 60-69.
- Bradshaw, A. y McNeilly (1985). *Evolución y Contaminación*. Ed. Omega .82p
- Braud, A., Geoffroy, V.A., Hoegy, F., Mislin, G.L.A., Schalk, I.J., 2010. The siderophores pyoverdine and pyochelin are involved in *Pseudomonas aeruginosa* resistance against metals: another biological function of these two siderophores. *Environ. Microbiol. Rep.* 2, 419-425.
- Bremner, J., Mulvaney, C. 1982. Nitrogen-total. En: Page A, Miller R, Keeney D, editors. *Methods of soil analysis: Part 2, Agronomy Vol. 9*, American Society of Agronomy, Madison, WI, pp. 595-624.
- Briat, J. 2007. Iron Dynamics in Plants. *Advances in Botanical Research* 46, pp. 137-180
- Britto, D.T., Kronzucker, H.J. 2002. NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *J. Plant Physiol.* 159: 567-584.
- Broderick, S.R., Evans, W.B. 2017. Biosolids promote similar plant growth and quality responses as conventional and slow-release fertilizers. *HortTechnology* 27(6), pp. 794-804.
- Brodie HL, Francis RG y Lewis EC. 1994. What makes good compost? *BioCycle*, 35: 66-68.
- Bunzl, K., Schmidt, W., Sansoni, B. 1976. Kinetics of Ion Exchange in Soil Organic Matter. IV: Adsorption and Desorption of Pb²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺ and Ca²⁺ by Peat. *J. Soil Sci.* 27, 32 - 41.
- Burducea, M., Zheljzkov, V. D., Lobiuc, A., Pintilie, C. A., Virgolici, M., Sillion, M., Asandulesa M, Burducea I, Zamfirache, M.-M. 2019. Biosolids application improves mineral composition and phenolic profile of basil cultivated on eroded soil. *Scientia Horticulturae*, 249, 407-418.
- Burggraaf AJP, Shipton WA (1982) Estimates of *Frankia* growth under various pH and temperature regimes. *Plant Soil* 69:135–147.
- Busse M. D. 2000. Ecological significance of nitrogen fixation by actinorhizal shrubs in interior forests of California and Oregon. *USDA Forest Service Gen Tech Rep PSW-GTR-178*.
- Calfapietra, C., Ainsworth, E.A. Beier, De Angelis C. P. 2010. Challenges in elevated CO₂ experiments on forests. *Trends in Plant Science* 15, 5–10.
- Cambier, P., Michaud, A., Paradelo, R., Germain M, Mercier V, Guérin-Lebourg A, Revallier, A., Houot, S. 2019. Trace metal availability in soil horizons amended with various urban waste composts during 17 years - Monitoring and modelling. *Sci. Total Environ.*, 651, pp. 2961-2974.
- Campbell A G. 1990. Recycling and disposing of wood ash. *Tappi J.* 73: 141-146.

- Campillo-Cora, C., Conde-Cid, M., Arias-Estévez, M., Fernández-Calviño, D., Alonso-Vega, F. 2020. Specific adsorption of heavy metals in soils: Individual and competitive experiments. *Agronomy* 10(8), 10081113
- Canet R, Pomares F, Tarazona F, Estela M. 1998. Sequential fractionation and plant availability of heavy metals as affected by sewage sludge applications to soils. *Commun. Soil Sci Plant Anal* 29(5-6):697-716.
- Canet R, Pomares F, Tarazona F. 1997. Chemical extractability and availability of heavy metals after seven year application of organic wastes to a citrus soil. *Soil Use Manage.* 13: 117-121.
- Carlson C L, Adriano D C. 1993. Environmental impact of coal combustion residues. *J. Environ. Qual.* 22:227-247.
- Carro, L., Persson, T., Pujic, P., Alloisio, N., 2016. Organic acids metabolism in *Frankia alni*. *Symbiosis* 70 (13), 37–48.
- Carvalho, M.D.S., Rosa, L.P., Bufoni, A.L., Oliveira, L.B. 2012. Putting solid household waste to sustainable use: A case study in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Waste Manage. and Research*, 30(12), pp. 1312-1319
- Chaia EE, Fontenla SB, Vobis G, Wall LG (2006) Infectivity of soilborne *Frankia* and mycorrhizae in *Discaria trinervis* along a vegetation gradient in Patagonian soil. *J Basic Microbiol* 46(4):263–274
- Chandler, A.J., Eighmy, T.T., Hartle'n, J., Hjelm, O., Kosson, D.S., Sawell, S.E., van der Sloot, H.A., Vehlow, J., 1997. Municipal solid waste incinerator residues. *Studies in Environmental Science*, vol. 67. Elsevier, Amsterdam.
- Chaney RL, Malik M, Li YM, Brown SL, Angle JS y Baker AJM. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current opinions in biotechnology* 8: 279-284.
- Chaney, R. 1983. Potential effects of waste constituents on the food chain. En: Parr JF, Editor, *Land Treatment of Hazardous Wastes*, New Jersey, pp. 50-76.
- Chang A C, Page A L, Warneke J E, Grgurevic E. 1984. Sequential extraction of soil heavy metals following a sludge application. *J. Environ. Qual.* 13: 33-38.
- Chapman, H.D. 1965. Diagnostic criteria for plants and soils. En: Black CA., Editor, *Diagnostic Criteria for Plants and Soils*, American Society of Agronomy, No. 9, Riverside, California, pp. 902-904.
- Chevallier T., T. Woignier, J. Toucet, E. Blanchart, P. Dieuonne. 2008. Fractal structure in natural gels: effect on carbon sequestration in volcanic soils. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, vol. 48, no. 1-2, pp. 231–238, 2008.
- Chirenje T, Ma L Q. 1999. Effects of acidification on metal mobility in a papermill-ash amended soil. *J. Environ. Qual.* 28: 760-766.

- Chowdhury A, McLaren R, Cameron K, Swift R. 1997. Fractionation of Zinc in some Zealand Soils. *Commun. Soil Sci Plant Anal.* 28 : (3-5) 301-312.
- Clapp C E, Stark S A, Clay D E, Larson W E. 1986. Sewage sludge organic matter and soil properties. P. 209-253. En: Chen Y, and Avnimelech Y. (ed.) *The role of organic matter in modern agriculture.* MartinusNijhoff Publ., Dordrecht, The Netherlands.
- Clemens S., M. G. Palmgren and U. Krämer. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation, *Trends Plant Sci.*, 7, 309–315.
- Clemens, S. 2010. Zn - a versatile player in plant cell biology. En: Hell, R. and Mendel, R.-R. (eds) *Plant Cell Monographs 17, Cell Biology of Metals and Nutrients.* Springer, Berlin, pp. 281-298
- Conesa, H.M., Evangelou, M.W.H., Robinson, B.H. Schulin, R. 2012. A critical view of current state of phytotechnologies to remediate soils: Still a Promising Tool? *The Scientific World Journal*, Article ID 173829.
- Corey R B, King L B, Lue-Hing C, Fanning D S, Street J J, Walfer J M. 1987. Effects of sludge properties on accumulation of trace elements by crops. P 25-51. En *Land application of sludge-food chain implications* (eds Page A.L., Logan T J and Ryan J A), pp.25-51.. Lewis Publishers, Inc., Chelsea, MI.
- Corey RB. 1981. Adsorption vs precipitation. En: Anderson MA, Robin AJ (eds) *Adsorption of Inorganics at Solid-Liquid Interfaces.* Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI, pp 51-90.
- Cornu, J. Y., Randriamamonjy, S., Gutierrez, M., Rocco, K., Gaudin, P., Ouerdane, L., Lebeau, T. 2019. Copper phytoavailability in vineyard topsoils as affected by pyoverdine supply. *Chemosphere*, 124347.
- Cornu, J.Y., Huguenot, D., Jezequel, K., Lollier, M., Lebeau, T. 2017. Bioremediation of copper-contaminated soils by bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 26
- Corrêa, R.S, y D.J. da Silva, 2016. Effectiveness of Five Biosolids as Nitrogen Sources to Produce Single and Cumulative Ryegrass Harvests in Two Australian Soils *Rev Bras Cienc Solo*, 40:e0150216
- Corso, M., García De La Torre, V.S. 2020. Biomolecular approaches to understanding metal tolerance and hyperaccumulation in plants. *Metallomics* 12(6), pp. 840-859.
- Cotching, W.E. 2018. Organic matter in the agricultural soils of Tasmania, Australia – A review. *Geoderma* 312, pp. 170-182
- Cottenie A, Dhaese A, Camerlynck R. 1976. Plant quality response to uptake of polluting elements. *Qualitas Plantarum*;26:319 -326.
- Covacevich F., Echeverria, H.E. 2000. Caracterización química y biológica de un Hapludol bajo diferentes manejos. *Ciencia del Suelo*, 2000, 18(2), pp. 144-148
- Cunningham S.D. Ow D.W. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* 110:715-719

- Cusato, M.S., Tortosa RD. 1998. Host specificity of *Frankia* from actinorhizal plant soils of south America. *Phyton* 62:231–236
- Cusato, M. S., Tortosa, R. D., Valiente, L., Barneix, A. J., Puelles, M. M. 2007. Effects of Zn²⁺ on nodulation and growth of a South American actinorhizal plant, *Discaria americana* (Rhamnaceae). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 771–777.
- Dalal, R. C. (1979). Simple procedure for the determination of total carbon and its radioactivity in soils and plant materials. *The Analyst*, 104(1235), 151-154.
- Dann P.R., B.S. Dear, R.B. Cunningham. 1989. Comparison of sewage ash, crushed limestone and cement kiln dust as ameliorants for acid soils. *Aust. J. Exp. Agric.*, 29 (4) (), pp. 541-549.
- Darrah, P.R. 1993. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil*, 155/156, 1-20.
- Dary M., Chamber-Pérez M.A., Palomares A.J., Pajuelo E. 2010. “In situ” phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J. Hazard. Mater.* 177: 323-330.
- Dauber, J., Brown, C., Fernando, A.L., Finnan, J., Krasuska, E., Ponitka, J., Styles, D., Thrän, D., Van Groenigen, K.J., Weih, M. Zah, R. (2012) Bioenergy from “surplus” land: Environmental and socio-economic implications. *BioRisk* 7, 5–50
- Davis, C. J. and Shuman, L. M. 1993. Influence of texture and pH of kaolinitic soils on zinc fractions and zinc uptake by peanuts, *Soil Sci.* 155, 376.
- Davis, R. Beckett, P. 1978. Upper critical levels of toxic elements in plants, II. Critical levels of copper in young barley, wheat, rape, lettuce and ryegrass, and of nickel and zinc in young barley and ryegrass. *New Phytol.*, 80, 23-32
- De Conti L., C.A. Ceretta, G.W. Melo, T.L. Tiecher, L.O.S. Silva, L.P. Garlet, T. Mimmo, S. Cesco, G. 2019. Brunetto. Intercropping of young grapevines with native grasses for phytoremediation of Cu-contaminated soils *Chemosphere*, 216, pp. 147-156
- Diem, H. G., Y. R. Dommergues. 1990. Current and potential uses and management of Casuarinaceae in the tropics and subtropics. pp 317-342. En C R Schwintzer J D Tjepkema (Eds). *The biology of Frankia and Actinorhizal Plants*, Academic Press, San Diego, California.
- Domíngues H, Pedra F, Montero O, Gusmão R, Ferreira E, Henriques J. 1998. Plant uptake and soil heavy metal accumulation in irradiated urban sewage sludge-treated soil. 16^o World Congress of Soil Sci., France. CD. Scientific Registration N^o1886.
- Domingues, H., Monteiro, O.R., Pedra, F., Amaro J.T. and Gusmão, M.R. 2002. Aplicação de lamas residuais urbanas em solos agrícolas. Síntese dos estudos desenvolvidos no Departamento de Ciência de Solo, da Estação Agronômica Nacional -INIA. *Revista das Ciências Agrárias*, 25, 341-352 (2002).

- Domínguez, M.T., Marañón, T., Murillo, J.M., Schulín R. Robinson B.H. (2008) Trace element accumulation in woody plants of the Guadiamar Valley, SW Spain: A large-scale phytomanagement case study. *Environ. Pollut.* 152, 50-59.
- Dommergues, Y.R. 1997. Contribution of actinorhizal plants to tropical soil productivity and rehabilitation. *Soil Biology & Biochemistry* 29: 931-941.
- Dorn, P.B., Vipond, T.E., Salanitro, J.P., Wisniewski H. 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, Microtox(R), and plants. *Chemosphere.* 37: 845–860.
- Drechsel H, Jung G. 1998. Peptide siderophores. *J. Peptide Sci.* 4:147–181.
- Eid EM, El-Bebany AF, Alrumman SA, Hesham A, Taher MA, Fawy KF. 2017 a. Effects of different sewage sludge applications on heavy metal accumulation, growth and yield of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Int J Phytoremed* 19:340–347
- Eid, E.M., Alrumman, S.A., El-Bebany, A.F., El-Shaboury, G.A., Ahmed, M.T. 2019. Evaluation of the potential of sewage sludge as a valuable fertilizer for wheat (*Triticum aestivum* L.) crops. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 26(1), pp. 392-401
- Eid, E.M., Alrumman, S.A., El-Bebany, A.F., Hesham, A. E.-L., Taher, M.A., Fawy, K.F. 2017 b. The effects of different sewage sludge amendment rates on the heavy metal bioaccumulation, growth and biomass of cucumbers (*Cucumis sativus* L.). *Environ. Sci. Pollut. Res*24(19), pp. 16371-16382.
- El Alaoui, A., Raklami, A., Bechtaoui, N., El Gharmali, A, Ouhammou, A, Imziln,B, Achouak,W, Pajuelo, E., Oufdou, K. 2021. Use of native plants and their associated bacteria rhizobiosomes to remediate-restore Draa Sfar and Kettara mining sites, Morocco. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193(4),232
- Emmerich W E, Lund L J, Page A L, Chang A C. 1982. Movement of heavy metals in sewage sludge-treated soils. *J.Environ.Qual.*11: 174-178.
- Esperschuetz, J., Anderson, C., Bulman, S., Lense, O., Horswell, J., Dickinson, N., Hofmann R., Robinson, B. H. 2016. Production of Biomass Crops Using Biowastes on Low-Fertility Soil: 1. Influence of Biowastes on Plant and Soil Quality. *Journal of Environment Quality*, 45(6), 1960.
- European Union. 1986. Council directive of the European Communities. On the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. Nº 86/278/EEC.
- Evans, L.J. 1989. Chemistry of metal retention by soils, *Environmental Sci. Technol.* 23, 1046-1056.
- Fagnano, M., Visconti, D., Fiorentino, N. 2020. Agronomic Approaches for Characterization, Remediation, and Monitoring of Contaminated Sites. *Agronomy*, 10(9), 1335.
- Fan, J., McConkey, B.G., Liang, B.C., Cerkowniak, D.D., Smith, W.N. 2019. Increasing crop yields and root input make Canadian farmland a large carbon sink *Geoderma*, 336, pp. 49-58

- Farina M P W, Channon P. 1988. Acid subsoil amelioration: I. A comparison of several mechanical procedures. *Soil Sci Soc Am J.* 52: 169-175.
- Fernandez, J.C., Henriques, F.S. 1991. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. *Bot Rev.* 57: 246–273.
- Fernández, M., Soulages, O., Acebal, S., Rueda, E., Sánchez, R. 2015. Sorption of Zn(II) and Cu(II) by four Argentinean soils as affected by pH, oxides, organic matter and clay content. *Environmental Earth Sciences*, 74(5), pp. 4201-4214.
- Fjällborg, B., Dave, G. 2004. Toxicity of Sb and Cu in sewage sludge to terrestrial plants (lettuce, oat, radish), and of sludge elutriate to aquatic organisms (*Daphnia* and *Lemna*) and its interaction. *Water Air Soil Pollut.* 155: 3–20.
- Forsberg, L., Ledin, S. 2003. Effects of iron precipitation and organic amendments on porosity and penetrability in sulphide mine tailings. *Water Air Soil Pollut.* 142: 395–408.
- Fuentes, A., Lloréns, M., Sáez, J., Aguilar, M.I., Ortuño, J.F., Meseguer, V.F. 2004. Phytotoxicity and heavy metals speciation of stabilised sewage sludges. *J. Hazard. Mater.* 108: 161-169.
- Gahoonia, T.S., Claassen, N. Jungk, A. 1992. Mobilization of phosphate in different soils by ryegrass supplied with ammonium or nitrate. *Plant and Soil*, 140, 241-248.
- Galán, E. 2000. The role of clay minerals in removing and immobilising heavy metals from contaminated soils. En “Proceedings of the 1st Latin American Clay Conference”, vol. 1, C. Gomes, ed. Funchal, 351-361.
- Galbally, P., Ryan, D., Fagan, C. C., Finnan, J., Grant, J., McDonnell, K. 2013. Biosolid and distillery effluent amendments to Irish short rotation coppiced willow plantations: Impacts on groundwater quality and soil. *Agric. Water Manage.*, 116, 193-203.
- Gallet, S.; Jahn B.M.; Lanoe B.V.V; Dia A.; Rossello, E. 1998. Loess geochemistry and its implications for particle origin and composition of the upper continental crust. *Earth Planet Sc. Lett.* 156:157-177.
- Geiger, G., Federer, P., Sticher, H. 1993. Reclamation of heavy metal contaminated soils: field studies and germination experiments. *J. Environ. Qual.* 22: 201-207.
- Ghosh, M. S.P. Singh. 2005. A review of phytoremediation of heavy metals and utilisation of its byproducts. *Appl. Ecol. Env. Res.* 1:1-18.
- Gomiero, T. 2016. Soil degradation, land scarcity and food security: Reviewing a complex challenge. *Sustainability (Switzerland)*, 8(3),281
- Gorlach E, Gambus F, Michniak A. 1990. The effect of pH on the uptake of heavy metals by italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in the conditions of their differentiated contents in soil. *Polish Journal of Soil Sci.* 23: 17-23.

- Goss, M. J., Tubeileh, A., Goathood, D. 2013. A review of the use of organic amendments and the risk to human health. *Adv. Agron.*, 275–379.
- Guerinot, M.L. 2010. Iron. En: Hell, R. and Mendel, R.-R. (eds) *Plant Cell Monographs 17, Cell Biology of Metals and Nutrients*. Springer, Berlin, pp. 75-94.
- Gunawardana, B., N. Singhal y A. Johnson, 2010. Amendments and their combined application for enhanced copper, cadmium, lead uptake by *Lolium perenne*. *Plant Soil*, 329 (1-2): 283-294.
- Gupta S K, Chen K. 1975. Partitioning of trace metals in selective chemical fractions of nearshore sediments. *Environ.Lett.*10:129-158.
- Gupta, N., Yadav, K.K., Kumar, V., Kumar, S., Chadd, R.P., Kumar, A. 2019. Trace elements in soil-vegetables interface: Translocation, bioaccumulation, toxicity and amelioration - A review. *Sci. Total Environ.*, 651, pp. 2927-2942
- Haghighi, M., Teixeira da Silva, J.A. 2016. Application of biosolids to soil affects Cu and Zn accumulation and antioxidant activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Plant Nutr.*, 39(2), pp. 252-260
- Hallett PD, Gordon DC, Bengough AG. 2003. Plant influence on rhizosphere hydraulic properties: direct measurements using a miniaturized infiltrometer. *New Phytologist* 157: 597-603.
- Hamidpour, M., Khadivi, E., Afyuni, M. 2016. Residual effects of biosolids and farm manure on speciation and plant uptake of heavy metals in a calcareous soil. *Environ Earth Sci* 75, 1037.
- Haynes, R. J., Murtaza, G., Naidu, R. 2009. Chapter 4 Inorganic and Organic Constituents and Contaminants of Biosolids. *Adv. Agron.*, 165–267.
- Hedley, M.J. Nye, P.H. White, R.E. 1982. Plant-induced changes in the rhizosphere of rape (*Brassica napus* var. Emerald) seedlings. II. Origin of the pH change. *New Phytologist*, 91, 31-44.
- Heredia O, Fernández Cirelli A. 2008. Importancia de las propiedades de los suelos en la determinación del riesgo de contaminación de acuíferos. *CI. SUELO (ARGENTINA)* 26(2): 131-140
- Hinsinger, P. 1994. The acquisition of mineral nutrients by roots: rhizosphere processes. En: *Proceedings of the Third Congress of the European Society for Agronomy, Padova, Italy* (eds M. Borin M. Sattin), pp. 428-437. European Society for Agronomy, Colmar
- Hinsinger, P., Gilkes, R. J. 1996. Mobilization of phosphate from phosphate rock and alumina-sorbed phosphate by the roots of ryegrass and clover as related to rhizosphere pH. *Eur. J. Soil Sci.*, 47(4), 533-544.
- Hodgson, J. F., Geering, H. R., and Norvell, W. A., Micronutrient cation complexes in soil solution, *Soil Sci., Soc. Am. Proc.*, I, 29, 665, 1965; II, 30, 723, 1966.
- Hoekstra, N., Boske, T., Lantinga, E. A. 2002. Effects of cattle dung from farms with different feeding strategies on germination and initial root growth of cress (*Lepidium sativum* L.). *Agric. Ecosys. Environ.* 93: 189-196.

Hooda P S, Alloway B J 1993. Effects of time and temperature on the bioavailability of Cd and Pb from sludge-amended soils. *Journal of Soil Sci* 44: 97-110.

Hooda P S, Alloway B J. 1994. Changes in operational fractions of trace metals in two soils during two years of reaction time following sewage sludge treatment. *Intern.J. Environ.Anal.Chem.* 57:289-311.

Hooda, P. 2010. Trace elements in soils, Blackwell Publishing Ltd, 618 p.

Houba, V.J.G., Temminghoff, E.J.M., Gaikhorst, G.A., van Vark, W., 2000. Soil analysis procedures using 0.01 M calcium chloride as extraction reagent. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 31, 1299–1396.

Houben D, Pircar J, Sonnet P. 2012. Heavy metal immobilization by cost-effective amendments in a contaminated soil: effects on metal leaching and phytoavailability. *J Geochem Explor* 123:87–94

Hsiau, P., Lo. S.L. 1998. Fractionation and leachability of Cu in lime-treated sewage sludge. *Wat.Res.* 32: 1103-1108.

Hue N V, Licudine D L. 1999. Amelioration of subsoil acidity through surface application of organic manures. *Environ J. Qual.*28: 623-632.

Hue N V. 1992. Correcting soil acidity of a highly weathered ultisol with chicken manure. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 23: 241-264.

Huss-Danell 1997. Tansley Review No. 93.. Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. *New Phytologist*, 136(3), 375–405.

Iu K, Pulford I, Duncan H. 1981 a. Influence of water logging and lime or organic matter additions on the distribution of trace metals in an acidic soil. 1. Manganese and iron. *Plant and Soil* 59:317-326.

Iu, K.L., Pulford, I.D., Duncan, H.J. 1981 b. Influence of waterlogging and lime or organic matter additions on the distribution of trace metals in an acid soil - II. Zinc and copper. *Plant and Soil*, 59(2), pp. 327-333.

Jackson A P, Alloway B J. 1991. The transfer of Cadmium from sewage-sludge amended soils into the edible components of food crops. *Water, Air and Soil Pollution* 57-58:873-881.

Jackson B P, Miller W P 2000. Soil solution chemistry of a fly ash-, poultry litter-, and sewage sludge-amended soil. *J.Environ.Qual* 29: 430-436.

Jackson M L. 1982 *Análisis químico de suelos*. 4a. ed Ed Omega, Barcelona. (ISBN 84-282-0261-3), 662 p

Jackson, B.P., Miller, W.P., Schumann, A.W., Sumner, M.E. 1999. Trace element solubility from land application of fly ash/organic waste mixtures. *J. Environ. Qual.*, 28(2), pp. 639-647

Jakobsen P., I.R. Willett. 1986. Comparisons of the fertilizing and liming properties of lime-treated sewage sludge with its incinerated ash. *Fert. Res.*, 9 (3), pp. 187-197.

- Jamali, M.K., Kazi, T.G., Arain, M.B., Afridi, H.I., Jalbani, N., Memon, A.U.R., Ansari, R., Shah, A. 2007. The feasibility of using an industrial sewage sludge produce in Pakistan as agricultural fertilizer used for cultivation of *Sorghum bicolor* L. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 53: 659-671.
- Janzen, H. H. 1993. Soluble salts. En *Soil Sampling and Methods of Analysis*. M.R.Carter (ed.).Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 161-166.
- Jeng A S, Singh B M. 1993. Partitioning and distribution of cadmium and zinc in selected cultivated soils in Norway. *Soil Sci*. 156. 4:240-250.
- Ji, G.L., Li, H.Y. 1997. Electrostatic adsorption of cations. En Yu T.R. *Chemistry of variable charge soils*, Oxford University Press, New York, p. 64-70.
- Joffe JS. 1949. Pedology. En: *Pedology Publ.*, New Brunswick, NJ, p. 662.
- Jones JB. 1991. Plant tissue analysis in micronutrients. En: Mortvedt PM, Cox FR, Shuman LM, Welch RM, editors. *Micronutrients in agriculture*, 2nd edition. Madison, WI: Soil of the Science Society of America, p. 477 -522.
- Jordán, M.M., Rincón-Mora, B., Almendro-Candel, M.B. 2016. Heavy metal distribution and electrical conductivity measurements in biosolid pellets. *J Soils Sediments* 16, 1176–1182.
- Kabata-Pendias, A. 2004. Soil-plant transfer of trace elements: an environmental issue. *Geoderma* 122: 143-149.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2011. *Trace elements in soils and plants*, 4^o ed. CRC Press Inc, Boca Raton, London, New-York, Washington, DC, p. 413.
- Kabata-Pendias, A.; Sadurski, W. 2004. Trace Elements and Compounds in Soil. En: *Elements and their compounds in the environment: Occurrence, analysis and biological relevance*, pp. 79-99.
- Kaiser K., Guggenberger G. 2000. The role of DOM sorption to mineral surfaces in the preservation of organic matter in soils” *Organic Geochemistry*, vol. 31, no. 7-8, pp. 711–725, 2000.
- Kaiser K., K. Eusterhues, C. Rumpel, G. Guggenberger, and I. Kogel-Knabner. 2002. Stabilization of organic matter by soil minerals-investigations of ensity an particle-size fractions from two aci forest soils, *J. Plant Nutr. an Soil Science*, vol. 165, no. 4, pp. 451–459, 2002.
- Kapustka, L.A., Reporter, M. 1993. Terrestrial Primary Producers. En: P. Calow, Editor, *Handbook of Ecotoxicology* vol. 1, Blackwell Scientific Publishers, Oxford (1993), pp. 278-298.
- Kargas, G., Chatzigiakoumis, I., Kollias, A., Spiliotis, D., Massas, I., Kerkides, P. 2018. Soil Salinity Assessment Using Saturated Paste and Mass Soil:Water 1:1 and 1:5 Ratios Extracts. *Water*, 10(11), 1589.
- Keeling, A.A., Paton, I.K., Mullett, J.A.J. 1994. Germination and growth of plants in media containing unstable refuse-derived compost. *Soil Biol. Biochem*. 26: 767–772.

- Kelessidis, A., Stasinakis, A. S. 2012. Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. *Waste Manage.*, 32(6), 1186-1195.
- Khodaverdilo, H., Han, F. X., Hamzenejad Taghliabad, R., Karimi, A., Moradi, N., Kazery, J. A. 2020. Potentially toxic element contamination of arid and semi-arid soils and its phytoremediation. *Arid Land Research and Management*, 1–31.
- Kidd, P., Barceló, J., Bernal, M.P., Navari-Izzo, F., Poschenrieder, C., Shilev, S., Clemente, R., Monterroso, C. 2009. Trace element behaviour at the root-soil interface: Implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany* 67: 243-259
- Kirchmann, H., Pilchmayer, F., Gerzabek, K.H., 1996. Sulfur balance and sulphur-34 abundance in a long-term fertilizer experiment. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60, 174–178.
- Krämer U. 2010. Metal hyperaccumulation in plants, *Annu. Rev.Plant Biol.*, 61, 517–534.
- Krebs R, Gupta S K, Furrer G and Schulin R. 1998. Solubility and plant uptake of metals with and without liming of sludge- amended soils. *J. Environ. Qual.* 27: 18-23.
- Krüger O., A. Grabner, C. Adam. 2014. Complete survey of German sewage sludge ash *Environ. Sci. Technol.*, 48 (20), pp. 11811-11818
- Kubota, J., 1983. Copper status of United States soils and forage plants. *Agr.J* 75, 913-918.
- Kuehl R.O. 1994. Diagnosing agreement between the data and the model. En: *Statistical principles of research design and analysis* (R.O. Kuehl, Ed.), Duxbury Press. California, Estados Unidos de America, pp. 108-128.
- Latara AM, Kumar O, Singh SK, Gupta A. 2014. Direct and residual effect of sewage sludge on yield, heavy metals content and soil fertility under rice-wheat system. *Ecol Eng* 69:17–24.
- Lavado R S, Porcelli C A. 2000. Contents and main fractions of trace elements in Typic Argiudolls of the Argentinaen Pampas. *Chemical Speciation and Bioavailability.* 12(2): 67-70.
- Lavado R S, Rodriguez M B. 1999. Biosolids as zinc source for soybean. *ICOBTE 99.* Viena. Austria. I:312-313.
- Lavado RS, Zubillaga M, Alvarez R y Taboada M. 2004. Baseline levels of potentially toxic elements in pampas soils. *Soil Sediment Contamination: an International Journal* 15 (5): 329-339.
- Lavado, R.S. y Taboada, M.A. 2002. Factibilidad de valorización agrícola de biosólidos de plantas depuradoras Manual de procedimientos para la aplicación de biosólidos en el campo. *Convenio Aguas Argentinas S.A.- Facultad De Agronomía, UBA, septiembre 2002.*
- Legret, M., Colandini, V., Raimbault, G., 1993. Premie`re approche des effets des structures re`servoirs sur la qualite` des eaux pluviales et des sols. *La Houille Blanche*, 201-205
- Leita, L., De Nobilil, M. 1991. Water soluble fractions of heavy metals during composting of municipal solid waste. *J. Environ. Qual.* 20: 73-78.

- Lekfeldt, J.D.S., Kjaergaard, C., Magid, J. 2017. Long-term effects of organic waste fertilizers on soil structure, tracer transport, and leaching of colloids. *J. Environ. Qual.*, 46(4), pp. 862-870
- Lerch R N, Barbarick K A, Sommers L E, Westfall D G. 1992. Sewage sludge proteins as labile carbon and nitrogen sources. *Soil Sci Soc Am J.*56: 1470-1476.
- Li, F.M., Xiong, Z.T., Hu, H.Y. 2003. Effects of chelating agents on toxicity of copper to *Elsholtzia splendens*. *Environ. Sci.* 24: 96-100
- Li, Y., McCrory, D.F., Powell, J.M., Saam, H., Jackson-Smith, D. 2005 A survey of selected heavy metal concentrations in Wisconsin dairy feeds. *Journal of Dairy Science* 88 (8), pp. 2911-2922.
- Lindsay, W.L., y Cox F.R. 1985. Micronutrient soil testing for the tropics. *Fert. Res.* 7: 169–199.
- Liu, J.; Zhu, R.; Xu, T.; Xu, Y.; Ge, F.; Xi, Y.; Zhu, J.; He, H. 2016. Co-adsorption of Phosphate and Zinc(II) on the Surface of Ferrihydrite. *Chemosphere*, 144, 1148–55
- Llugany, M.; Tolrá, R.; Poschnrieder, C.; Barceló, J. 2007. Hiperacumulación de metales: ¿una ventaja para la planta y para el hombre? *Ecosistemas* 16(2): 1–7.
- Luo Y M, Christie P. 1998. Bioavailability of copper and zinc in soils treated with alkaline stabilized sewage sludges. *J.Environ.Qual.* 27: 335-342.
- Luo YM, Christie P. 1995. Some short term effects of a lime stabilized sewage aludge cake applied to arable and forest soil. *J.Agric. Res.* 34-78
- Luo, Y.M., Christie, P. 1998. Bioavailability of copper and zinc in soils treated with alkaline stabilized sewage sludges. *J. Environ. Qual.* 27: 335-342.
- Machado, R.M.A., Serralheiro, R.P. 2017. Soil salinity: Effect on vegetable crop growth. Management practices to prevent and mitigate soil salinization. *Horticulturae*, 3(2),30
- Madrid L. 1999. Metal retention and mobility as influenced by some organic residues added to soils: a case study, En; *Fate and transport of heavy metals in the Vadose Zone* [1 ed.], I.K. Iskandar, H. Magdi Selim editores, Lewis Publishers, 334 p.
- Madrid L. 1999. Metal retention and mobility as influenced by some organic residues added to soils: a case study, En; *Fate and transport of heavy metals in the Vadose Zone* [1 ed.], I.K. Iskandar, H. Magdi Selim editores, Lewis Publishers, 334 p.
- Mandal B. y Hazra GC. 1977. Zn adsorption in soils as influenced by different soil management practices. *Soil Sci* 162: 713-721.
- Marastoni L., M. Sandri, Y. Pii, F. Valentinuzzi, G. Brunetto, S. Cesco, T. Mimmo. 2019. Synergism and antagonisms between nutrients induced by copper toxicity in grapevine rootstocks: monocropping vs. Intercropping. *Chemosphere*, 214, pp. 563-578
- Markert, B., Kayser, G., Korhammer, S., Oehlmann, J. 2000. Chapter 1 Distribution and effects of trace substances in soils, plants and animals. *Trace Metals in the Environment*, 3–31.

- Marschner H, Römheld V. 1994. Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant Soil* 165, 261-274.
- Marschner H., Römheld V. Kissel M. 1986. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron, *J. Plant Nutr.*, 9:3-7, 695-713.
- Marschner, H., Romheld, V, Cakmak, I. 1987. Root-induced changes of nutrient availability in the rhizosphere. *J. Plant Nutr.*, 10(9), 1175-1184.
- Marx, D.H., Berry, C.R. Kormanik, P.P. 1995. Application of municipal sewage sludge to forest and degraded land. En: *Agricultural Utilization of Urban and Industrial Byproducts*. ASA Special Publication nº 68. ASA-CSSA-SSSA. Madison. Pp: 275-295.
- Mattigod S V 1981 Speciation of heavy metals in soils. En *Heavy Metals in the Environment*. International conference. Amsterdam. pp 721-727.
- MAYDS Res. 410/18. Manejo Sustentable de Barros y Biosólidos Generados en Plantas Depuradoras de Efluentes Líquidos Cloacales y Mixtos Cloacales-Industriales, Resolución 410/18, Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable, publicada en el Boletín Oficial: 16 de julio de 2018.
- Mc Bride M.B.1995. Toxicmetal accumulation from agricultural use of sludge: are USEPA regulations protective? *J. Environ. Qual.* 24: 5–8
- Mc Grath, S.P., Zha, F.J., Lombi, E. 2001. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal contaminated soils. *Plant and Soil*. 232: 207-214.
- McBride M B, Richards B, Steenhuis T, Russo J, Sauvé S. 1997. Mobility and solubility of toxic metals and nutrients in soil fifteen years after sludge application. *Soil Sci.* 162: 487-500.
- McBride, M. B.; Blasiak, J. J. 1979. Zinc and copper solubility as a function of pH in an acid soil, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 43, 866.
- McBride, M. B.; Blasiak, J. J. 1979. Zinc and copper solubility as a function of pH in an acid soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 43, pp. 866-870.
- McBride, M.B. 1989. Reactions controlling heavy metal solubility in soils. En: Stewart B.A. (eds) *Advances in Soil Science*. *Advances in Soil Science*, vol 10. Springer, New York, NY. (Chapter 1), pp 1–56.
- McBride, M.B. 1995. Toxic metal accumulation from agricultural use of sludge: Are USEPA Regulations protective? *J. Environ. Qual.* 24: 5-18.
- McGrath S P, Cegarra J. 1992. Chemical extractability of heavy metals during and after long-term applications of sewage sludge to soil. *Journal Soil Sci*, 43(2), 313-321
- McGrath S P, Zhao FJ, Dunham S J, Crosland A R, Coleman K. 2000. Long-term changes in the extractability and bioavailability of Zn and Cd after sludge application. *J. Environ. Qual* 29: 875-883.

- McGrath, S. P., Chaudri, A. M., Giller, K. E. 1995. Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(2), 94–104.
- McGrath, S.P., Micó, C., Curdy, R., Zhao, F.J. 2010. Predicting molybdenum toxicity to higher plants: Influence of soil properties. *Environ. Pollut.*, 158(10), pp. 3085-3094.
- Meima, J.A., Van Der Weijden, R.D., Eighmy, T.T., Comans, R.N.J. 2002. Carbonation processes in municipal solid waste incinerator bottom ash and their effect on the leaching of copper and molybdenum. *Applied Geochemistry* 17 (12), pp. 1503-1513.
- Middleton, K. R. y Smith, G. S. 1979. A comparison of ammoniacal and nitrate nutrition of perennial ryegrass through a thermodynamic model. *Plant and Soil*, 53, 487-504.
- Militaru, B. A., Pode, R., Lupa, L., Schmidt, W., Tekle-Röttering, A., Kazamer, N. 2020. Using sewage sludge ash as an efficient adsorbent for Pb (II) and Cu (II) in single and binary systems. *Molecules*, 25(11), 2559.
- Miller DM, Miller VP. 2000. Land application of wastes. En: *Handbook of Soil Science*, M. Summer (Ed). Florida, USA. CRC Press, G-217-G-245
- Miller, W.P., Miller, D.M. 1987. A micropipette method for soil mechanical analysis. *Commun. Soil Sci. and Plant Anal.* 18: 1-15.
- Mirdar Harijani, A., Mansour, S., Karimi, B. 2017. A multi-objective model for sustainable recycling of municipal solid waste. *Waste Manage. and Research*, 35(4), pp. 387-399
- Mizuno I, N M Arrigo, H. Svartz. 1978. Método rápido de determinación de Humedad Equivalente, VIII Reunión Argentina de la Ciencia del Suelo, pp. 59–63.
- Mohammad, S., Sen, D. N. 1990. Germination behaviour of some halophytes in Indian desert. *Int. J. Exp. Biol.* 28: 545-549.
- Monteleone M., G. Lacolla, G. Caranfa, and G. Cucci. 2016. Indirect measurement of electrical conductivity and exchangeable cations on soil water extracts: Assessing the precision of the estimates. *Soil Sci.* 181:465-471.
- Moreno, J.M. 2005 Principales conclusiones de la evaluación preliminar de los impactos en España por efecto del cambio climático. Secretaría General Técnica, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, España.
- Morera MT, Echeverría JC y Garrido JJ. 2001. Mobility of heavy metals in soil amended with sewage sludge. *Can. J. Soil. Sci.*, 81: 405-414.
- Morera, M., Echeverría, J., Garrido, J., 2002. Bioavailability of heavy metals in soils amended with sewage sludge. *Can. J. Soil Sci.* 81, 405–414.
- Mortvedt J, Cox F, Shuman L, Welch R. 1991. Micronutrients in agriculture. *Soil Sci. Soc. Am. Madison Wisconsin.* pp 662.

- Munzuroglu, O., Geckil, H. 2002. Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 43: 203-213.
- Myers, B.A. and D.I. Couper. 1989. Effects of temperature and salinity on the germination of *Puccinellia ciliata* (Bor) cv. Menemen. Australian J. of Agri. Res., 40(3): 561-571
- Neal, R.H., Sposito, G. 1986. Effects of soluble organic matter and sewage sludge amendments on Cd sorption by soils at low Cd concentrations. Soil Sci. 142: 164-172.
- Neilands J.B. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. J. Biol. Chem. 270:26723–26726
- Ngom, M., Oshone, R., Diagne, N., Cissoko, M., Svistoonoff, S., Tisa, L. S., Laplaze L., Ourèye Sy M., Champion, A. 2016. Tolerance to environmental stress by the nitrogen-fixing actinobacterium *Frankia* and its role in actinorhizal plants adaptation. Symbiosis, 70(1-3), 17–29.
- Ni, T.H., Wei, Y.Z. 2003. Subcellular distribution of cadmium in mining ecotype *Sedum alfredii*. Acta Bot. Sin. 45: 925-928.
- Nierop, K.G.J., Jansen, B., Vrugt, J.A., Verstraten, J.M. 2002. Copper complexation by dissolved organic matter and uncertainty assessment of their stability constants. Chemosphere 49(10), pp. 1191-1200
- Oberle, S.L.; D. R. Keeney. 1994. En: Clapp C. E. y Larson W. E. (Ed). Sewage sludge: land utilization and the environment. ASA, Madison, 17-20.
- Oyuela Leguizamo, M.A., Fernández Gómez, W.D., Sarmiento, M.C.G. 2017. Native herbaceous plant species with potential use in phytoremediation of heavy metals, spotlight on wetlands — A review. Chemosphere, 168, pp. 1230-1247
- Page A.L. 1982. Methods of soil analysis. Chemical and microbiological properties. 2^o ed. (Part 2), in the series Agronomy. American Society of Agronomy, Inc. SSSA, Inc. Publisher, Madison, Wisconsin, USA, 1159 pp.
- Pan, W. L., Madsen, I. J., Bolton, R. P., Graves, L., Sistrunk, T. 2016. Ammonia/ammonium toxicity root symptoms induced by inorganic and organic fertilizers and placement. Agronomy Journal, 108(6), 2485.
- Paramasivam, S., Sajwan, K.S., Alva, A.K. 2006. Incinerated sewage sludge products as amendments for agricultural soils: Leaching and plant uptake of trace elements. Water Air Soil Pollut. 171: 273-290.
- Paré T, Dinel H, Schnitzer M. 1999. Extractability of trace metals during co-composting of biosolids and municipal solid wastes. BiolFertil Soils. 29: 31-37
- Parkpain P, Sreesai S y Delaune RD. 2000. Bioavailability of heavy metals in sewage sludge-amended Thai soils. Water, Air and Soil Pollution 122: 163-182.

- Parkpain P, Sreesai S, Delaune R D. 2000. Bioavailability of heavy metals in sewage sludge-amended Thai soils. *Water, Air and Soil Pollution*. 00:1-20.
- Parkpain, P., Sirisukhodom, S., Carbonell-Barrachina, A.A. 1998. Heavy metals and nutrients chemistry in sewage sludge amended Thai soils *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 33(4), pp. 573-597
- Pascual, I., Antolín, M.C., García, C., Polo, A., Sánchez-Díaz, M. 2004. Plant availability of heavy metals in a soil amended with a high dose of sewage sludge under drought conditions. *Biol. Fertil. Soils*. 40: 291-299.
- Peckenham, J.M., Nadeau, J.A., Amirbahman, A., Behr, R.S. 2008. Release of nitrogen and trace metal species from field stacked biosolids. *Waste Manage. and Research*, 26(2), pp. 163-172
- Pedra, F., Domingues, H., Ribeiro, A. B., Polo, A., Monteiro, O. 2006. Relationship between Cu and Zn extractable foliar contents and BCR sequential extraction in soil treated with organic amendments. *Environmental Technology*, 27(12), 1357-1367.
- Pierzynski G M, Schwab A P. 1993. Bioavailability of zinc, cadmium and lead in a metal contaminated alluvial soil. *J.Environ.Qual.*22: 247-254.
- Pierzynski G M. 1994. Plant nutrient aspects of sewage sludge. En *Sewage Sludge: Land utilization and the Environment*. SSSA Miscellaneous Publication. ASA-CSSA-SSSA, 677 South Segoe Road, Madison, WI 53711, USA.21-25.
- Pinkerton A, Smith FW, Lewis DC. 1997. Pasture species. En *Plant Analysis an Interpretation Manual*, Reuter DJ, Robinson JB (eds). Inkata Press: Melbourne; 285-346.
- Pinochet D, Aguirre J y Quiroz E. 2001. Estudio de la lixiviación de cadmio, mercurio y plomo en suelos derivados de cenizas volcánicas, *Agro Sur* 30: 51-58.
- Pírez P y Gamallo G. 1994. Basura privada, servicio público. Los residuos en dos ciudades argentinas (Zárate y Resistencia), Centro Editor de América Latina, 250 p.
- Polymenakou, P.N., Stephanou, E.G. 2005. Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil Pseudomonad. *Biodegradation*. 16: 403-413.
- Ponizovsky, A.A., Allen, H.E., Ackerman, A.J. 2007, Copper activity in soil solutions of calcareous soils. *Environ. Pollut.*, 145(1), pp. 1-6
- Ponizovsky, A.A., Thakali, S., Allen, H.E., Di Toro, D.M., Ackerman, A.J. 2006. Effect of soil properties on copper release in soil solution at low moisture content. *Environ. Toxic. Chem.* 25:671–682.
- Printz B., S. Lutts, J.F. Hausman, K. Sergeant. 2016. Copper trafficking in plants and its implication on cell wall dynamics. *Front. Plant Sci.*, 7: 601
- Pujol, J.A., Calvo, J.F., Díaz, L.R. 2000. Recovery of germination from different osmotic conditions by four halophytes from southeastern Spain. *Ann. Bot.* 85: 279-286.

- Qian, P., Schoenau, J.J., Wu, T., Mooleki, S.P. 2003. Copper and zinc amounts and distribution in soil as influenced by application of animal manure in east-central Saskatchewan. *Can. J. Soil Sci.*, 83(2), pp. 197-202
- Qin, C., Yuan, X., Xiong, T., Tan, Y. Z., Wang, H. 2020. Physicochemical properties, metal availability and bacterial community structure in heavy metal-polluted soil remediated by montmorillonite-based amendments. *Chemosphere*, 261, 128010.
- Rabot, E., Wiesmeier, M., Schlüter, S., Vogel, H.-J. 2018. Soil structure as an indicator of soil functions: A review. *Geoderma* 314, pp. 122-137.
- Raffa, C.M., Chiampo, F., Shanthakumar, S. 2021. Remediation of metal/metalloid-polluted soils: A short review. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(9),4134
- Rangel, F.J. 2011. Toxic waste dumping, water contamination, and people's disablement in semi-arid rural México: Local water pond issues for the fair siting of a landfill *WIT Transactions on Ecology and the Environment* 153, pp. 185-195
- Res 97/2001. Resolución 97/01 del Ministerio de Desarrollo Social y Medio Ambiente de la Nación Argentina. Manejo sustentable de barros generados en plantas de tratamiento de efluentes líquidos. *Boletín Oficial de la Nación Argentina*. 28 de noviembre de 2001.
- Res 97/2001. Resolution 97/01 of the Ministry of Social Development and Environment of the Argentine Nation. Sustainable management of sludge generated in liquid effluent treatment plants. *Official Gazette of the Argentine Nation [Resolución 97/01 del Ministerio de Desarrollo Social y Medio Ambiente de la Nación Argentina. Manejo sustentable de barros generados en plantas de tratamiento de efluentes líquidos. Boletín Oficial de la Nación Argentina]*.
- Reubens B, Poesen J, Danjon F, Geudens G, Muys B .2007. The role of fine and coarse roots in shallow slope stability and soil erosion control with a focus on root system architecture: a review. *Trees-Struct Funct* 21:385–402
- Rhoades, J. D. and S. Miyamoto. 1990. Testing soils for salinity and sodicity. pp 229-336. En: R. L. Westerman (ed.). *Soil testing and plant analysis*. ASA, SSSAJ Book Series N° 3. Madison, WI, USA
- Richards, J. W., Glenn, D., Krumholz, M., Chval, M. S., Tisa, L. S. 2002. Heavy metal resistance patterns of *Frankia* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 923-927.
- Richards, J. W., Krumholz, G. D., Chval, M. S., Tisa, L. S. 2002. Heavy Metal Resistance Patterns of *Frankia* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 923–927.
- Richter M y Svartz H, 1984. Análisis granulométrico en escala reducida. *C. del Suelo* 2:1-8
- Robinson BH, Banuelos G, Conesa HM, Evangelon WH, Schulin R. 2009. The phytomanagement of trace elements in soil. *Critical Reviews in Plant Sciences* 38: 240-266.

- Roig, N., Sierra, J., Martí, E., Nadal, M., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., 2012. Long term amendment of Spanish soils with sewage sludge: Effects on soil Functioning. *Agric. Ecosyst. Environ.* 158, 41-48.
- Römkens, P., Hoenderboom, G., Dolfing, J. 1999. Copper solution geochemistry in arable soils. Field observations and model application. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 28: 776-783.
- Rosenfeld P E, Henry C L. 2000. Wood ash control from biosolids application. *J. Environ. Qual* 29: 1662-1668.
- Rui You, A M, Sanz Lanzas C, Cañameras N, Carazo N, Navarro-Martin L, Matamoros V, Bayona JM, Díez S. 2020. Dose effect of Zn and Cu in sludge-amended soils on vegetable uptake of trace elements, antibiotics, and antibiotic resistance genes: Human health implications. *Environmental Research*, 109879–109879.
- Russell EW. 1973. *Soil Conditions and plant growth*. Décima edición. Longman Group Limited, London. 849 p.
- Sá Mendonça, E; D Rowell, A Martins da Silva. 2006. Effect of pH on the development of acidic sites in clayey and sandy loam Oxisol from the Cerrado Region, Brasil. *Geoderma* 132:131-142.
- Sandstead H.H. 1995. Requirements and toxicity of essential trace elements illustrated by zinc and copper. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61 (3 Suppl): 621S-624S
- Sauvé S, Hendershot W, Allen H.E. 2000. Solid–solution partitioning of metals in contaminated soils. Dependence on pH, total metal burden, and organic matter, *Environ. Sci. Tech.* 34: 1125–1131.
- Sauvé S, Mc Bride M, Norvell W A, Hendershot W. 1997 a. Copper solubility and speciation of in situ contaminated soils: Effects of copper level, pH and organic matter. *Water, Air and Soil Pollut.* 100: 133-149.
- Schwenke J., M. Carú. 2001. Advances in Actinorhizal Symbiosis: host plant- *Frankia* interactions, Biology and Applications in Arid Land Reclamation. A review. *Arid Land Res Manage* 15:285 – 327
- Selim, H.M., Zhang, H. 2013. Modeling approaches of competitive sorption and transport of trace metals and metalloids in soils: A review. *J. Environ. Qual.*, 42(3), pp. 640-653.
- Senesi, N. 1992. Metal-humic substance complexes in the environment. Molecular and mechanistic aspects by multiple spectroscopic approach, in *Biogeochemistry of trace metals*, D. C. Adriano, Ed., Springer-Verlag, New York, pp. 429-496.
- Sessitsch, A., Kuffner, M., Kidd, P., Vangronsveld, J., Wenzel, W. W., Fallmann, K., Puschenreiter, M. (2013). The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. *Soil Biol. Biochem.*, 60, 182-194.
- Sharma, B., Sarkar, A., Singh, P., Singh, R. P. 2017. Agricultural utilization of biosolids: A review on potential effects on soil and plant grown. *Waste Manage.*, 64, 117-132.

- Sharma, B., Sarkar, A., Singh, P., Singh, R. P. 2017. Agricultural utilization of biosolids: A review on potential effects on soil and plant grown. *Waste Manage.*, 64, 117-132.
- Sheoran V., A. Sheoran, P. Poonia. 2011. Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: a review *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 41:168-214
- Shortall, O.K. 2013 “Marginal land” for energy crops: Exploring definitions and embedded assumptions. *Energy Policy* 62, 19–27.
- Shuman, L. M. 1999. Organic waste amendments effect on zinc fractions of two soils. *J. Environ Qual.*28:1442-1447.
- Shuman, L. M., Li Z. 1997. Amelioration of zinc toxicity in cotton using lime or mushroom compost. *J-Soil Contam.* 6:425-438.
- Shuman, L.M. 1979. Zinc, manganese and copper in soil fractions. *Soil Sci.* 127: 10-17
- Shuman, L.M. 1985. Fractionation method for soil microelements. *Soil Sci.* 140: 11-22.
- Silveira, M. L., Kohmann, M. M. 2020. Maintaining soil fertility and health for sustainable pastures. *Management Strategies for Sustainable Cattle Production in Southern Pastures*, 35-58.
- Silveira, M.L.A.; Alleoni, L.R.F. 2003. Copper adsorption in tropical Oxisols. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 46: 529-536. (in Portuguese, with English abstract).
- Simard R R, Beauchemin S, Laverdière M R. 1999. Limed sewage sludge on nutrient status and metal fractions in acidic soils. *Canadian Journal of Soil Sci* 173-182.
- Simon, E.U. 1984. Early Events in Germination, en *Seed Physiology Vol. III, Germination and Reserve Mobilization*, Ed. Morray, D.R. Academia Press, New York, 77-115.
- Sims J T, Kline J. 1991. Chemical fractionation and plant uptake of heavy metals in soils amended with co-composed sewage sludge. *J. Environ. Qual.* 20: 387-395.
- Singh RP, Agrawal M (2010 a) Effect of different sewage sludge applications on growth and yield of *Vigna radiata* L. field crop: metal uptake by plant. *Ecol Eng* 36:969–972
- Singh, M., Verma, M., Kumar, R.N. 2018. Effects of open dumping of MSW on metal contamination of soil, plants, and earthworms in Ranchi, Jharkhand, India, *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(3),139
- Sistani, K.R., J.M. Novak. 2006. Trace metal accumulation, movement, and remediation in soils receiving animal manure. p. 689-706. En M.N.V. Prasad et al.(ed.) *Trace elements in the environment. Biogeochemistry, biotechnology, and bioremediation*. Taylor and Francis, New York.
- Sloan J, Dowdy R H, Dolan M S, Linden D R. 1997. Long term effects of biosolids applications on heavy metal bioavailability in agricultural soils. *J.Environ.Qual.* 26: :966-974.
- Sloan JJ. y Basta NT. 1995. Remediation of acid soils by using alkaline biosolids, *Journal of Environmental Quality*, 24: 1097–1103.

- Smilde K W, Van Luit B, van Driel W. 1992. The extraction by soil and absorption by plants of applied zinc and cadmium. *Plant and Soil* 143:233-238.
- Smith G. S., C. M. Johnston, I. S. Cornforth. 1983. Comparison of nutrient solutions for growth of plants in sand culture. *The New Phytologist*, Vol. 94, No. 4, pp. 537-548
- Smith, R.A.H., Bradshaw, A.D., 1979. The use of metal tolerant plant populations for the reclamation of metalliferous wastes. *Journal of Applied Ecology* 16, 595-612.
- Smith, S. R. 1994. Effect of soil pH on availability to crops of metals in sewage sludge-treated soils. I. Nickel, copper and zinc uptake and toxicity to ryegrass. *Environ Poll*, 85(3), 321-327.
- Solans M, Vobis G. 2003. Actinomyces saprofiticos asociados a la rizósfera y rizoplano de *Discaria trinervis*. *Ecol Austral* 13:97-107
- Sonmez S., D. Buyuktas, F. Okturen, S. Citak. 2008. Assessment of different soil to water ratios (1:1, 1:2.5, 1:5) in soil salinity studies. *Geoderma*. 144:361-369
- Sonnevelt, C., J. van den Ende. 1971. Soil analysis by means of a 1:2 volume extract. *Plant Soil* 35:505-516.
- Soriano, A., León, R.J.C., Sala, O.E., Lavado, R.S., Deregibus, V.A., Cahuepé, M.A., Scaglia, O.A., Velázquez, C.A., Lemcoff, J.H. 1992. Río de la Plata grasslands: En: Coupland, R.T. (ed.) *Ecosystems of the world 8A. Natural grasslands. Introduction and western hemisphere*. Elsevier, New York, pp. 367-407.
- Sparks, D.L. 1995. Sorption phenomena on soils. En: Sparks, D. L. (Ed.). *Environmental soil chemistry* San Diego, California, pp. 99-139.
- Spielvogel S., J. Prietzel, I. Kogel-Knabner. 2008. Soil organic matter stabilization in acidic forest soils is preferential and soil type-specific, *Eur. J. Soil Sci.*, vol. 59, no. 4, pp. 674-692, 2008.
- Sposito G, Lund L J, Chang A C. 1982. Trace metal chemistry in arid zone fields soils amended with sewage sludge: fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in solid phases. *Soil Sci. Soc.Am.J.*46: 260-264.
- Sposito, G. 1989. *The Surface Chemistry of Soils*, Oxford University Press, New York.
- Stasta P, J. Boran, L Bebar, P Stehlik and J. Oral. 2006. Thermal processing of sewage sludge. *Applied Thermal Engineering*, 26: 1420-1426.
- Stevenson, F.J. 1994. *Humus chemistry. genesis, composition, reactions*. 2nd edition. New York, USA, Wiley Interscience. 512 pp.
- Stevenson, F.J., 1991. Organic matter-micronutrient reactions in soil. En: *Micronutrients in Agriculture*, second ed. Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp. 145-186.

- Stover, R.C., L.E. Sommers, D.J. Silivier. 1976. Evaluation of metals in waste water sludge. *J. Water Pollut. Control Fed.* 48: 2165-2175.
- Suchkova N., I. Tsiripidis, D. Alifragkis, J. Ganoulis, E. Darakas, T. Sawidis. 2014. Assessment of phytoremediation potential of native plants during the reclamation of an area affected by sewage sludge. *Ecol. Eng.*, 69: 160-169.
- Tack, F.M.G. 2010. Trace Elements: General Soil Chemistry, Principles and Processes, in: Hooda, P.S. (Ed.), *Trace elements in soils*. Wiley, Chichester, pp. 9-39. 205
- Tarakci, Z., Kucukoner, E. 2008. Comparison of basic nutrients, mineral and heavy metal contents of herby dairy products. *International Journal of Food Science and Technology* 43: 216-219.
- Tejada, M., Gonzalez, J.L. 2007. Application of different organic wastes on soil properties and wheat yield. *Agronomy Journal* 99: 1597-1606
- Thangarajan, Ramya; Bolan, Nanthi S.; Naidu, Ravi; Surapaneni, Aravind (2015). Effects of temperature and amendments on nitrogen mineralization in selected Australian soils. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 22(12), 8843–8854.
- Thomas, R.J.; El-Dessougi, H.; Tubeileh, A. 2006. Soil system management under arid and semi-arid conditions. En: Uphoff, N.; Ball, A.S.; Palm, C.; Fernandes, E.; Pretty, J.; Herren, H.; Sanchez, P.; Husson, O.; Sanginga, N.; Laing, M.; Thies, J. (Eds.) *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*. Taylor and Francis, CRC Press, Boca Raton, pp. 41-58.
- Tisdale, S.L., Nelson, W.L., Beaton, J.D., Havlin, J.L. 1993. *Soil fertility and fertilizers*. 5th edition. Macmillan Publishing Co., NY, pp 634.
- Tlustos, P., Szakova, J., Hruby, J., Hartman, I., Najmanova, J., Nedelnik, J., Pavlikova, D., Batysta, M. 2006. Removal of As, Cd, Pb, and Zn from contaminated soils by high biomass producing plants. *Plant Soil Environment*, 52 (9): 413-423.
- Tokalioglu, S. and Kartal, S. 2003. Relationship between vegetable metal and soil-extractable metal contents by the BCR sequential extraction procedure: chemometrical interpretation of the data. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 83, pp 935-952.
- Tordoff, G.M., Baker, A.J.M. Willis, A.J. 2000. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous wastes. *Chemosphere* 41, 219-228.
- Torrey, J. G. 1978. Nitrogen fixation by actinomycete-nodulated angiosperms. *BioScience* 28:586-592.
- Torri S. 2001. Distribución y biodisponibilidad de Cd, Cu, Pb y Zn en un Hapludol típico, Natracuol típico y Argiudol típico fertilizados con biosólidos y biosólidos más cenizas. Tesis de Magister Scientiae en Ciencias del Suelo, Escuela para Graduados, Facultad de

- Torri S.I. 2009. Feasibility of using a mixture of sewage sludge and incinerated sewage sludge as a soil amendment. En: Sludge: Types, Treatment Processes and Disposal. Editor: Richard E. Baily, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY 11788. ISBN: 978-1-60741-842-9. pp. 187-208, 317p
- Torri S.I., Alberti C. 2012. Characterization of organic compounds from biosolids of Buenos Aires City. J. Soil Sci. PlantNut. 12 (1), 143-152.
- Torri S.I., Alvarez R, Lavado R. 2003. Mineralization of carbon from sewage sludge in three soils of the Argentine pampas. Commun. Soil Sci. and Plant Anal. 34: 2035-2043.
- Torri S.I., Corrêa R.S., Renella G. 2017. Biosolids application to agricultural land: a contribution to global phosphorus recycle, Pedosphere 27(1): 1–16, ISSN 1002-0160/CN 32-1315/P
- Torri S.I., Lavado R. 2002. Distribución y disponibilidad de elementos potencialmente tóxicos en suelos representativos de la provincia de Buenos Aires enmendados con biosólidos. Ciencia del Suelo. 20 (2): 98-109. ISSN 0326-3169
- Torri S.I., Lavado R. 2008 a. Dynamics of Cd, Cu and Pb added to soil through different kinds of sewage sludge. Waste Manage. 28(5), 821-832.
- Torri S.I., Lavado R. 2008 b. Zn distribution in soils amended with different kinds of sewage sludge. J Environ Manage. 88: 1571-1579.
- Torri S.I., Lavado R. 2009 a. Plant absorption of trace elements in sludge amended soils and correlation with soil chemical speciation. Journal of Hazardous Materials, 166: 1459-1465. ISSN: 0304-3894.
- Torri S.I., Lavado R. 2009 b. Fate of cadmium, copper, lead and zinc on soils after the application of different treated sewage sludge in soils of the Pampas region. En: Sewage Treatment: Uses, Processes and Impact. Editors: Anna Stephens and Mark Fuller, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY 11788. 95-123. 394p.
- Torri S.I., Urricariet A.S, Lavado R. 2011. Micronutrient availability in crop soils of the Pampas region, Argentina. En: Soil Nutrients. Editor: M. Miransari, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY 11788. ISBN: 978-1-61324-785-3. pp.277-296, 336 p.
- Torri S.I., Zubillaga M, Cusato M. 2009 a. Potential of *Discaria americana* for metal immobilization on soils amended with biosolid and ash-spiked biosolids. Int. J. Phytoremediat. 11(2), 187-199.
- Torri, S.I. 2020. Nutrición vegetal con micronutrientes. Dinámica de los micronutrientes en los suelos, fuente de micronutrientes y tecnologías de fertilización. Editorial Académica Española, ISBN: 978-620-0-42870-7, 217 p.
- Torri, S.I., Cabrera M. 2017. Environmental impact of biosolids land application. En: Organic Waste: Management Strategies, Environmental Impact and Emerging Regulations, Editor: M Collins, Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY 11788, ISBN: 978-1-53610-936-8, 185-208, 226 pp

Torri, S.I., S. Urricariet y R.S. Lavado. 2005. Micronutrientes y otros elementos traza. En Echeverría, H. y F. O. García (editores). Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. INPOFOS-INTA Balcarce, Pcia. Bs. Aires.189-205. ISBN 987-521-192-3

Torri, S.I., Urricariet A.S, Lavado R. 2015. Micronutrientes. En: Fertilidad de suelos y fertilización de cultivos. García F y Echeverría H. Ediciones INTA, Balcarce, ISBN 978-987-521-565-8, 357-377. 908 p.

Tortosa, R.D. 1983. El género *Discaria* (Rhamnaceae). Bol. Soc. Argent. Bot. 22: 301–335.

Tsadilas C D, Matsi T, Barbayiannis N, Dimoyiannis D.1995. Influence of sewage sludge application on soil properties and on the distribution and availability of heavy metal fractions. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 26 (15-16), 2603-2619.

Ure A.M., Davidson C.M., Thomas R.P. 1995. Single and sequential extraction schemes for trace metal speciation in soil and sediment. En: Quality assurance for environmental analysis, Elsevier Science B.V., 20: 505–523

Ure, A.M., Quevauviller, P., Griepink, B. 1993. Speciation of heavy metals in soils and sediments an account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the commission of the european communities. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 51(1-4), pp. 135-151

US EPA 1992. 40-CFR Part 503 and Chapter 173-308 WAC.

US Soil Taxonomy 1999. Soil Taxonomy, A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys, United States Department of Agriculture Agriculture Handbook, Natural Resources Conservation Service

USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1993. Standards for use and disposal sewage sludge. CFR parts 257, 403 and 503. Washington DC,

USEPA (United States Environmental Protection Agency). 2000. Folletos Informativos de Biosólidos de la EPA. Aplicación de biosólidos al terreno. Parte 1. Office of Water. Washington, D.C. EPA 832-F-00-064.

USEPA. 1982. Seed germination/root elongation toxicity test. EG-12, Office of Toxic Substances, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

USEPA. 1993. 40 CFR, part 503. Standards for the use or disposal of sewage sludge. Fed. Reg. 58: 9387-9404.

USEPA. 2000. Folletos Informativos de Biosólidos de la EPA. Aplicación de biosólidos al terreno. Parte 1. Office of Water. Washington, D.C. EPA 832-F-00-064.

Usman A.R.A., Kuzyakov Y, y Stahr K. 2004. Sorption, Desorption, and Immobilization of Heavy Metals by Artificial Soil. Eurosoil2004 Conference in Freiburg, Germany.

- Van Breemen N, J Mulder, Driscoll C T. 1983. Acidification and alcalinization of soils. *Plan and soil* 75: 283-308.
- van der Ent A., Baker A.J.M., Reeves R.D., Pollard A.J., Schat H. 2013. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fictions. *Plant and Soil* 362: 319-334
- Van Rensburg, H; A Claassens D Beukes. 2009. Relationships between soil buffer capacity and selected soil properties in a resource-poor farming area in the Mpumalanga Province of South Africa. *South African Journal of Plant and Soil* 26:237-243.
- Vangronsveld J, Cunningham SD. 1998. Introduction to the concepts. En: Vangronsveld J, Cunningham SD (eds) *Metal-contaminated soils: in-situ inactivation and phytoremediation*. Springer, Berlin, ISBN 1-57059-531-3, pp 1-15.
- Vangronsveld, J., Van Assche, F., Clijsters, H. 1991. Reclamation of a 'desert like' site in the North east of Belgium: Evolution of the metal pollution and experiments in situ. En: Farmer JG, editor. *Proceedings of the International Conference of Heavy Metals in the Environment*, Edinburgh: CEP Consultants, 1991. pp 58–61.
- Vangronsveld, J., Van Assche, F., Sterckx, J., Clijsters, H. 1993. Rehabilitation studies on an old non-ferrous waste dumping ground: effects of metal immobilization and revegetation. En: Allen RJ, Nriagu JO, editors. *Proceedings of the International Conference of Heavy Metals in the Environment*, Edinburgh: CEP Consultants, 1993. pp 563-566.
- Viehweger, K. 2014. How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, 55(1), 35.
- Violante A, Pigna M, Cozzolino V, Huang PM. 2012. Impact of soil physical, chemical and biological interactions on the transformation of metals and metalloids. En: Huang PM, Li Y, Sumner ME, editors. *Handbook of soil sciences. Resource management and environmental impact*, Chapter 8. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Wagai R., L. M. Mayer. 2007. Sorptive stabilization of organic matter in soils by hydrous iron oxides, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 71, no. 1, pp. 25–35.
- Walter, I., y Cuevas, G. 1999. Chemical fractionation of heavy metals in a soil amended with repeated sewage sludge application. *Sci. Total Environ.*, 226(2-3), 113-119.
- Wang, C. Sun, S.X., Gao, Wang, L.S., Han, S.K. 2001. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*, *Chemosphere*. 44: 1711-1721.
- Wang, L., Chen, Q., Jamro, I. A., Li, R., Li, Y., Li, S., Luan, J. 2016. Geochemical modeling and assessment of leaching from carbonated municipal solid waste incinerator (MSWI) fly ash. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23(12), 12107-12119.
- Wang, M., Chen, H., Liu, S., Xiao, L. 2021. Removal of pathogen and antibiotic resistance genes from waste activated sludge by different pre-treatment approaches. *Sci. Total Environ.* 763,143014

- Wang, M.J. 1997. Land application of sewage sludge in China. *Sci. Total Environ.*, 197: 149-160.
- Wang, W. 1992. Use of plants for the assessment of environmental contaminants. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*. 126: 87-127.
- Wang, W., Keturi, P. 1990. Comparative seed germination tests using ten plant species for assessing effluent toxicity from a metal engraving sample. *Water Air Soil Pollut.* 52: 369-376.
- Wang, X., Qin, Y., Qin, J., Long X, Qi T, Chen R, Xiao, K., Tan, J. 2021. Spectroscopic insight into the pH-dependent interactions between atmospheric heavy metals (Cu and Zn) and water-soluble organic compounds in PM_{2.5}. *Sci. Total Environ.* 767,145261.
- Wang, X; C Tang; S Mahony; JA Baldock CR Butterly. 2015. Factors affecting the measurement of soil pH buffer capacity: approaches to optimize the methods. *Eur. J. Soil Sci.* 66:53-64.
- Weng, L.P., Temminghoff, E.J.M., van Riemsdijk, W.H. 2001. Contribution of individual sorbents to the control of heavy metal activity in sandy soil. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4436-4443.
- Whalen J, Chang C, Clayton G, Carefoot J. 2000. Cattle manure amendments can increase the pH of acid soils. *Soil Sci Soc Am J.* 64: 962-966
- White P.J. and Greenwood, D.J. 2013. Properties and management of cationic elements for crop growth. En: Gregory, P.J. and Nortcliffe, S. (eds) *Soil Conditions and Plant Growth*, 12th edn. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 160-194.
- White PJ, George TS, Dupuy LX, Karley AJ, Valentine TA, Wiesel L, Wishart J. 2013. Root traits for infertile soils. *Frontiers in Plant Science* 4, 193.
- Whiting, S, Reeves, RD., Richards, D., Johnson M., Cooke, J., Malaisse, F.; A. Paton, J. Smith, J. Angle, R. Chaney, R. Ginocchio, T. Jaffré, R. Johns, T. McIntyre, O. Purvis, D. Salt, H. Schat, F.J. Zhao; Baker, A. J. M. 2004. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. *Restoration Ecology*, 12(1), 106–116.
- Wijesekara, H., Bolan, N.S., Thangavel, R., Seshadri, B., Surapaneni, A., Saint, C., Hetherington, C., Matthews, P., Vithanage, M. 2017. The impact of biosolids application on organic carbon and carbon dioxide fluxes in soil. *Chemosphere* 189, pp. 565-573.
- Williams, L.E. and Pittman, J.K. 2010. Dissecting pathways involved in manganese homeostasis and stress in higher plants. En: Hell, R. and Mendel, R.-R. (eds) *Plant Cell Monographs 17, Cell Biology of Metals and Nutrients*. Springer, Berlin, pp. 95-117.
- Wong, J. Lai, K. Fang, M. Ma, K. 1998. Effect of sewage sludge amendment on soil microbial activity and nutrient mineralization. *Environment International*, Hong Kong, Baptist University. 24: 935-943.
- Wong, J.W., Li, K., Fang, M., Su, D.C., 2001. Toxicity evaluation of sewage sludges in Hong Kong, *Environ. Int.* 27: 373-380.

- Wong, M.H. 1985. Phytotoxicity of refuse compost during the process of maturation. *Environ. Pollut.* 40: 127–144.
- Wong, M.H. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere.* 50: 775-780.
- Wong, M.H., Bradshaw, A.D. 1982. A comparison of the toxicity of heavy metals using root elongation of Rye Grass, *Lolium perenne*. *New Phytol.* 91: 255-261.
- Wong, M.H., Cheung, Y.H., Cheung, C.L. 1983. The effects of ammonia and ethylene oxide in animal manure and sewage sludge on seed germination and root elongation of *Brassica parachinensis*, *Environ. Pollut.* 30: 109-123.
- Wu J, Laird A D, Thompson M L. 1999b. Sorption and desorption of copper in soil clay components. *J. Environ. Qual.* 28:334-338.
- Wu X, Aasen I. 1994. Models for predicting soil zinc availability for barley. *Plant Soil* 163, 279–285.
- Xiao, C., Ma, L., Sarigumba, T. 1999. Effects of soil on trace metal leachability from paper sludges and sludge. *J. Environ. Qual.* 28: 321-333.
- Xu, L., Cheng, S., Fang, H., Xin, X., Xu, X., Tang, H. 2019. Soil inorganic nitrogen composition and plant functional type determine forage crops nitrogen uptake preference in the temperate cultivated grassland, Inner Mongolia. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 1-10.
- Yilmaz, DD, Temizgül A. 2014. Determination of heavy-metal concentration with chlorophyll contents of wheat (*Triticum aestivum*) exposed to municipal sewage sludge doses. *Commun Soil Sci Plant* 45:2754–2766
- Yu, S., He, Z.L., Huang, C.Y., Chen, G.C. Calvert, D.V. 2004. Copper fractionation and extractability in two contaminated variable charge soils. *Geoderma*, 123, 163-175.
- Yutong, Z., Qing, X., Shenggao, L. 2016. Chemical fraction, leachability, and bioaccessibility of heavy metals in contaminated soils, Northeast China. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23(23), pp. 24107-24114.
- Zanetti, F., Zegada-Lizarazu, W., Lambertini, C., Monti, A. 2019. Salinity effects on germination, seedlings and full-grown plants of upland and lowland switchgrass cultivars. *Biomass and Bioenergy*, pp. 273-280
- Zar J. H. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall. Nueva Jersey, USA. 663 pp.
- Zárate, M.A. 2003. Loess of southern South America. *Quaternary Sci. Rev.* 22:1987-2006.
- Zeid, I.M., Abou El Ghatte, H.M. 2007. Response of bean to some heavy metals in sewage water. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 10: 874-87.

- Zevenbergen C, Vander Wood T, Bradley JR Van der Broeck P, Orbons AJ, Van Reeuwijk LR 1994. Morphological and chemical properties of MSWI bottom ash with respect to the glassy constituents. *Hazardous Waste and Hazardous Mat.* 11:371-383.
- Zhang F.S., S. Yamasaki, M. Nanzyo. 2002. Waste ashes for use in agricultural production: I. Liming effect, contents of plant nutrients and chemical characteristics of some metals. *Sci. Total Environ.*, 284 (1–3), pp. 215-225
- Zhang, F. S., M. Treeby; V. Römheld; H. Marschner. 1991 b. Mobilization of iron by phytosiderophores as affected by other micronutrients, 130(1-2), 173–178.
- Zhang, F. S., Römheld, V., Marschner, H. 1991a. Diurnal rhythm of release of phytosiderophores and uptake rate of zinc in iron deficient and iron sufficient wheat. *Soil Sci. Plant Nutr.* 37, 671-678.
- Zhang, F.-S., Yamasaki, S., Kimura, K. 2001. Rare earth element content in various waste ashes and the potential risk to Japanese soils. *Environment International*, 27(5), 393–398.
- Zhang, F.-S., Yamasaki, S.-I., Nanzyo, M. 2001. Application of waste ashes to agricultural land - Effect of incineration temperature on chemical characteristics *The Sci. Total Environ.* 264: 205-214.
- Zhao F, McGrath SP, Dunham SJ 1999. Factors affecting the solubility of zinc, cadmium, copper and nickel in sewage sludge amended soils. En: *Proceedings of Fifth International Conference on the Biogeochemistry of Trace Metals*, Vienna, 11–15, pp. 270–271.
- Zhao, F., McGrath, S.P., Crosly, R., 1994. Comparison of three wet digestion methods for the determination of plant sulphur by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES). *Comm Soil Sci Plant Anal.* 25, 407-418.
- Zheljazkov, V., Warman, P. 2004. Phytoavailability and fractionation of copper, manganese, and zinc in soil following application of two composts to four crops. *Environ. Poll.* 131: 187-195.
- Zhongze, A. Torrey, G., 1985. Studies of an effective strain of *Frankia* from *Allocasuarina lehmaniana* of *Casuarinaceae*. *Plant and Soil.* 87: 61-78.
- Zhu B, Alva A K. 1993. Distribution of trace metals in some sandy soils under citrus production. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 57: 350-355.
- Zucconi, F., Monaco, A., Forte, M.E., De Bertoldi, M. 1985. Phytotoxins during the stabilization of organic matter, in: J.K.R. Gasser (Ed.), *Composting of agricultural and other wastes*, Elsevier, London, pp. 73–86.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M.E., De Bertoldi, M. 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle.* 22: 54-57.

Anexo A

Torri, Silvana Irene; Zubillaga, Martha; Cusato, Martha (2009). POTENTIAL OF DISCARIA AMERICANA FOR METAL STABILIZATION ON SOILS AMENDED WITH BIOSOLIDS AND ASH-SPIKED BIOSOLIDS. *International Journal of Phytoremediation*, 11(2), 187–199. doi:10.1080/15226510802378475

POTENTIAL OF DISCARIA AMERICANA FOR METAL STABILIZATION ON SOILS AMENDED WITH BIOSOLIDS AND ASH-SPIKED BIOSOLIDS

Silvana Irene Torri,¹ Marta Zubillaga,¹ and Martha Cusato²

¹Cátedra de Fertilidad y Fertilizantes, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

²Cátedra de Microbiología, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Biosolids (B) may contain various types of environmental pollutants, which can exert phytotoxic effects in plants. The effect of aqueous extracts on seed germination and the primary root growth of discaria (Discaria americana) obtained from different soil- application rates of B and a mixture of B and incinerated B were investigated. The objective was to evaluate the potential use of discaria for the stabilization of B-amended soils. Ryegrass (Lolium perenne L.) was used for comparison. Compared to ryegrass, relative seed germination (RSG) was significantly lower for discaria. RSG of discaria and rye grass was inversely correlated to the electrical conductivity of extracts, although a significant adverse effect was only observed for ryegrass with the highest dose of the mixture of B and incinerated B. This dose also produced a reduction in the germination index of discaria, which could not be correlated with the parameters studied. The B extracts did not exert any significant adverse effect on the relative root growth of both species. An increase in relative root growth and germination index was observed for discaria with a field application rate equivalent of 156 t DW ha⁻¹ of B, suggesting a stimulating effect of the amendment. The results obtained in this study suggest that germinated seedlings of discaria might be used for the stabilization of B-amended soils. However, further greenhouse and field experiments should be performed to confirm these findings.

Key words *Discaria americana*, *Lolium perenne* L., phytostabilization, biosolids (B), incinerated biosolids

INTRODUCTION

Land application of biosolids (B) is a feasible way to restore degraded or marginal soils. Amelioration of soil properties is related to the increase of organic carbon provided by the stable organic matter pool of B (Torri, Alvarez, and Lavado, 2003). Agricultural application of B also offers the possibility of recycling nitrogen (N), phosphorus (P), and other plant nutrients (Wong *et al.*, 2001). However, the concentration and availability of potentially toxic elements (PTEs) in B represent a risk of soil contamination. Copper

Address correspondence to Silvana Irene Torri, Cátedra de Fertilidad, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Avda. San Martín 4453, Ciudad Autónoma de Buenos Aires 1417, Argentina. E-mail: torri@agro.uba.ar

(Cu) and zinc (Zn) are the most important PTEs found in the B of Buenos Aires City, Argentina (Torri and Lavado, 2002). The agricultural land application of sewage sludge is not a common practice in Argentina, where it is discarded in non-agricultural soils as landfarming after aerobic stabilization, and to a minor extent as land filling.

Worldwide, B production as a result of wastewater treatment is rapidly increasing. Therefore, incineration is being used in some countries for volume reduction and energy recovery (Bierman and Rosen, 1994). This practice results in a sterile ash in which organic compounds have been destroyed, removing unpleasant odor, reducing the original volume, and thus facilitating handling of waste. The liming potential of incinerated B is derived from the hydrolysis of Na_2O , K_2O , and CaO and losses of acidic anions are accompanied with emissions of acidic gases (Zhang, Yamasaki, and Nanzyo, 2001). Nonetheless, disposal of resulting ash still poses an important waste-management problem, because non-volatile elements such as PTE are concentrated in ash and it cannot be directly land applied. Mixing B with its own ash may offer a potentially viable utilization of both wastes as soil amendment, because B may act as an adsorptive medium for the PTE concentrated in the ash, decreasing PTE availability (Torri, 2001). Moreover, the studies performed over three soil samples of representative soils of the Pampas region of Argentina showed that the use of B with 30% DM of its own incinerated ash (ash-spiked biosolids) as a soil amendment may not pose a significant risk of soil, water, or plants contamination with Cd, Cu, lead (Pb), or Zn (Torri and Lavado 2008a; Torri and Lavado, 2008b), providing supporting evidence for the protection theory (McBride, 1995).

Ash-spiked biosolids (AB) may also be a possibility for rehabilitating massive wastes from metal mining such as tailings. Mine tailings are generally deficient in plant nutrients and have a low water-holding capacity (Forsberg and Ledin, 2003). Moreover, weathering factors may produce exhaustive leaching of PTE, resulting in the migration of metals to the surrounding environment and contributing to soil contamination and groundwater pollution. These metals may be stabilized in non-available forms within the organic and inorganic matrix of AB. In this way, metal toxicity is reduced and the amendment may serve to improve physical characteristics of tailings and as a slow-release nutrient source (Wong, 2003). Nevertheless, AB have to be carefully tested before large-scale application, even in marginal or degraded soils, due to its high metal content.

Plants have been used in recent years for the cleanup and/or in situ immobilization of available PTE from B-amended soils (Mc Grath, Zha, and Lombi, 2001). Rhizosphere-induced adsorption and precipitation reduce PTE availability (Vangronsveld, Van Assche, and Clijsters, 1991; Vangronsveld *et al.*, 1993), and the plant cover prevents PTS dispersion caused by water or wind erosion. It has been suggested that the soil application of B might provide PTE in potentially toxic, labile forms (McBride, 1995), which can inhibit or delay seed germination and plant growth. Another problem arising from the land application of non-digested B is the potentially phytotoxic nature of the compounds generated as a result of the intense organic matter mineralization (Zucconi *et al.*, 1985), such as ammonia (Britto and Kronzucker, 2002), ethylene oxide (Wong, Cheung, and Cheung, 1983), low molecular weight organic acids (Chaney, 1983), or organic pollutants such as phenolic compounds (Polymenakou and Stephanou, 2005).

Seed germination is the first step in plant development; any adverse effect at this stage will have a direct impact on the plant's survival (Wang, 1992). Bioassays based on seed germination and primary root growth are simple and rapid methods to assess phytotoxicity (Zucconi *et al.*, 1985), as well as present several advantages such as sensitivity, simplicity, and low cost (Wang *et al.*, 2001; Munzuroglu and Geckil, 2002). These bioassays are

also useful to select species that are tolerant to contaminants and for screening the dose of B for land application. Ryegrass (*Lolium perenne* L.) has been extensively used in B-amended soils (Pascual *et al.*, 2004) and for the revegetation of metalliferous waste (Arienzo, Adamo, and Cozzolino, 2004). This species produces high dry matter yields and accumulates elevated amounts of PTE. Discaria (*Discaria americana*) is an actinorhizal xerophytic shrub widely distributed from southeastern Brazil to northern Patagonia in Argentina (Tortosa, 1983). This species lives in symbiosis with an actinomycete of the genus *Frankia*. The symbiosis occurs in root nodules and biological nitrogen fixation takes place, making actinorhizal plants ecologically important as pioneer community plants in land reclamation, reforestation, and soil stabilization (Richards *et al.*, 2002). Discaria has been recently found to tolerate Zn concentrations up to 2000 mg Zn²⁺ kg⁻¹ dry soil (Cusato *et al.*, 2007), but its behavior when grown on sludge-amended soils is still unknown.

The objective of the present study was to investigate the effect of aqueous extracts of different soil-application rates of B or AB on seed germination and primary root growth of discaria (*Discaria americana*) compared with ryegrass (*Lolium perenne* L.), with the aim of evaluating the potential use of discaria for metal stabilization of B-amended soils.

MATERIALS AND METHODS

Soils, B, and AB Characterization

Non-digested B from the southwestern outskirts of Buenos Aires City was provided by the local water operator, Aguas Argentinas S.A. The B was dried at 60 °C before grinding and sieving (<2 mm) and then split into two portions. One portion was incinerated at 500 °C in a muffle furnace. The obtained ash was thoroughly mixed with a portion of the sieved B, resulting in a new mixed waste of B plus 30% dry matter weigh of its own incinerated ash (AB).

Composed soil samples (10 subsamples, 0–15-cm depth) of a Typic Hapludoll (U.S. Soil Taxonomy) of the Pampas region of Argentina, were taken near the town of Carlos Casares. The soil was air-dried, ground, and passed through a 2-mm sieve.

Amendments

Increasing land-application rates of B or AB were evaluated at a maximum field-application rate equivalent of 156 t DW ha⁻¹ or 267 t DW ha⁻¹, respectively. The highest dose of AB was calculated to apply the same amount of organic matter as in the highest B treatment dose. Both amendments were mechanically mixed with the soil. Four replicates were made for each treatment and included:

1. Control: soil without amendment
2. BS2: soil amended with 2% (DW/DW) of B
3. BS 4: soil amended with 4% (DW/DW) of B
4. BS 6: soil amended with 6% (DW/DW) of B
5. ABS 2: soil amended with 2% (DW/DW) of AB
6. ABS 4: soil amended with 4% (DW/DW) of AB
7. ABS 6: soil amended with 6% (DW/DW) of AB
8. ABS 8: soil amended with 8% (DW/DW) of AB
9. ABS 10: soil amended with 10% (DW/DW) of AB

Seed Germination Test

A germination bioassay based on the standard procedure developed by Zucconi et al. (1981) was carried out. Water extracts of the nine treatments were prepared by mixing 5 g of dry control or amended soils with 50 mL distilled water. The suspensions were stirred mechanically for 30 min, maintained for 60 h at 60 °C, centrifuged at 3600 rpm for 45 min, and filtered through Whatman N° 42 filter paper. Seeds of discaria (*Discaria americana*) were collected in its natural habitat, on coastal dunes in La Lucila del Mar, Buenos Aires, Argentina (36° 22'S, 56° 43'W). Forty seeds of ryegrass (*Lolium perenne* L.) or discaria were placed on two layers of sterile filter paper in 10-cm Petri dishes and a 6 mL aliquot of each extract was added. The dishes were placed in a germination chamber and maintained at 27 °C in the dark at 75% of humidity. Distilled water was used to keep seeds moist if necessary. Seeds were considered germinated when the primary root reached 5 mm (USEPA, 1982). Seed germination and root length were measured. Percentages of RSG, relative root growth (RRG), and germination index (GI) after exposure to B extracts were calculated according to the formula proposed by Zucconi *et al.* (1985) and Hoekstra, Boske, and Lantinga (2002):

$$\text{RSG (\%)} = \frac{\text{number seeds germinated in amendment extract}}{\text{number of seeds germinated in control}} \times 100$$

$$\text{RSG (\%)} = \frac{\text{mean root length in the sludge extract}}{\text{mean root length in control}} \times 100$$

$$\text{GI (\%)} = \frac{\text{RSG} \times \text{RRG}}{100}$$

Analytical Procedure

Soil and amendments. Total organic carbon (TOC) content was determined by wet oxidation (Amato, 1983), total N was measured using the Kjeldhal method (Bremner and Mulvaney, 1982) while total P was determined as described by Blakemore, Searle, and Daly (1987). Cation exchange capacity (CEC) was determined using a sodium acetate method (Chapman, 1965). Soil particle-size distribution was determined with the pipette method (Miller and Miller, 1987), and the pH and EC were measured using a 1:2.5 sample/water ratio. Total Zn, Cd, Cu, and Pb in soil B and AB were solubilized by acid digestion with a 2:5 mixture of hydrofluoric and nitric acids (Shuman, 1985) and determined with a flame atomic absorption spectrophotometer (FAAS). The detection limits for Cd, Cu, Pb, and Zn were 0.5, 0.1, 0.5, and 0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively. A standard B, codified as CRM 145 and certified by the BCR (the Community Bureau of Reference, now the European Union "Measurement and Testing Programme"), has been used as a reference material to know the reliability of the acid-digestion procedure. Results showed a good agreement between the obtained and certified values for the metals analysed (accuracy <10%).

Water extracts. Total N, dissolved organic carbon (DOC), pH, and electrical conductivity (EC) were determined in the water extracts of the nine treatments. The DOC in the water extracts was measured immediately after centrifugation and filtering of the solution samples, using a Shimadzu TOC-5000 analyzer (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, MD, USA). Total Cd, Cu, Pb, and Zn were also determined in all extracts by FAAS.

Statistical Analysis

The effects of amendments on RSG, RRG, and GI were analysed using the Statistics package (Statistics 7.0, 2000). One-way analysis of variance was carried out to compare the means of different treatments; where significant F-values were obtained, differences between individual means and the control mean were tested using the Tukey test at a 0.05 level of probability. Correlations among variables were analyzed by linear regression and stepwise linear regression.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of Soil, B, and AB

Characteristics of the Typic Hapludoll, B and the AB are presented in Table 1. Total N contents in B or AB were moderate. Argentine regulations for land application of B are similar to USEPA 503 rule (USEPA, 1993). These regulations apply to any B containing material and would therefore limit the use of B or AB mixtures in land application. Cd and Cu in both amendments were below the maximum permissible concentration of PTE, since the “exceptional quality” B (EQ) limit is 39 mg kg⁻¹ for Cd and 1500 mg kg⁻¹ for Cu. Total Zn concentration in B was 2500 mg kg⁻¹, which is very close to the EQ limit of 2800 mg kg⁻¹, but Zn in AB was higher than the EQ limit. On the other hand, Pb concentration in both amendments was higher than the EQ concentration of 200 mg kg⁻¹. Based on these analyses, it would appear that large applications of these amendments would have the greatest potential to increase soil concentrations and plant tissue concentrations of Pb and Zn.

EC, pH, total N, DOC, and total Cu and Zn concentrations in the nine extracts are shown in Table 2. In all cases, Cd and Pb were below the analytical detection limits. Increasing the application rates of B or AB resulted in significant higher total N and EC values in the extracts as compared to the control. The EC was related to the amounts of soluble salts in the B, which were accumulated during the treatment of sewage sludge with chemicals such as Ca(OH)₂ as flocculating and conditioning agents (AGN, 2006). Higher levels of B or AB in soils resulted in higher EC values. However, no significant

Table 1 Selected properties of the Typic Hapludoll, pure B and AB

	Typic Hapludoll	B	AB
Clay (%)	19.2		
Silt (%)	23.2		
pH	5.12	5.82	6.17
TOC (g kg ⁻¹) *	28.6	251	176
Total N (mg g ⁻¹)	2.62	19.3	21.3
Total P (mg g ⁻¹)	1.07	7.2	8.6
EC (dS m ⁻¹)	0.61	0.9	0.89
CEC (cmol _(c) kg ⁻¹)	22.3	12.0	nd
Total Cd (mg kg ⁻¹)	< 0.5	10.1	13.1
Total Cu (mg kg ⁻¹)	22	490.6	662.8
Total Pb (mg kg ⁻¹)	18	407.6	554.4
Total Zn (mg kg ⁻¹)	55	2500	3150

*TOC—Total organic carbon; nd = not determined.

Table 2 General chemical characterization of substrates under assessment: control, soils amended with increasing doses of BS or ABS. Different letters in the same column indicate significant differences at the 0.05 probability level ($n = 4$).

	In the soil		In treatment extract					
	Total Cu (mg kg ⁻¹)	Total Zn (mg kg ⁻¹)	EC (dS/m)	pH	Total N (μg l ⁻¹)	DOC (μg C.l ⁻¹)	Cu (μg l ⁻¹)	Zn (μg l ⁻¹)
Control	22.00a	55.00a	0.060e	7.64b	0.0093d	0.073d	0.0010c	0.0030b
B 2	31.37a	103.9a	0.114de	7.64b	0.0156cd	0.168cd	0.0100b	0.0305ab
B 4	40.74a	152.8a	0.198cd	7.83ab	0.0124cd	0.107cd	0.0115b	0.0515a
B 6	50.11a	201.7a	0.33b	7.86ab	0.0374ab	0.379ab	0.0225a	0.0420a
AB 2	34.82a	116.9a	0.144cde	7.83ab	0.0203bcd	0.192bcd	0.0185a	0.0350a
AB 4	47.63a	178.8a	0.202cd	8.23a	0.0218bcd	0.209bcd	0.0240a	0.0405a
AB 6	60.45a	240.7a	0.225c	7.94ab	0.0218bcd	0.209bcd	0.0230a	0.0595a
AB 8	73.26a	302.6a	0.342ab	7.76b	0.0296abc	0.294abc	0.0215a	0.0545a
AB10	86.08a	364.5a	0.439a	7.61b	0.0420a	0.430a	0.0195a	0.0515A

differences in EC were observed among soil amended with B (BS) 2 and soil amended with AB (AB 2 or BS 4 and ABS 4 Salinity from unweathered ash is usually considered to be the most important limiting factor for plant production (Paramasivan, Sajwan, and Alva, 2006). However, AB did not initially increase the amounts of soluble salts in the amended soils compared to B-amended soils. Total N concentration in the extracts increased in soil that was amended with B or AB, due to the low molecular weighproteinc material contents in the amendments (Torri, 2001). The pH value of the extracts varied from 7.61 to 8.23, with no statistical differences between control and amended soils. It is well known that B tends to increase the acidity of the soils as a result of proton release from organic matter decomposition and mineralization of $\text{NH}_4^+\text{-N}$. On the other hand, carbonation has been recognized to be an important weathering process affecting alkaline metallic oxides produced during B incineration, resulting in a decrease in pH (Meima *et al.*, 2002). However, no organic matter mineralization or weathering processes occurred at the moment the extracts were made, so the pH values obtained in the extracts may be ascribed to the slightly higher pH of amendments as compared to unamended soil.

Cu and Zn concentrations significantly increased in BS and ABS extracts compared to the control. Moreover, an increment in Cu and Zn concentration with increasing doses of B was observed. The results of the multiple-regression analysis performed separately for the two amendments indicated that Cu concentration in BS extracts was positively correlated with soil parameters like DOC and total Cu content (Table 3). The effect of DOC on Cu solubility is well documented: due to Cu high binding affinity for DOC, soluble Cu–DOC complexes are stable and DOC is able to mobilize Cu from the solid phase into solution (Römken, Hoenderboom, and Dolfing, 1999). On the contrary, the Zn concentration in BS extracts was negatively correlated with DOC and pH (Table 3). Zn is less easily complexed by organic matter than Cu and in soil solution it occurs mostly in free forms or as inorganic complexes (Xiao, Ma, and Sarigumba, 1999). On the other hand, research has shown that Zn has a relatively high affinity for sorption on the surfaces of Fe and Mn oxides, especially with an increase in soil pH (Luo and Christie, 1998; Zheljzakov and Warman, 2004). The increased sorption with an increase of soil pH, and the fact that minimum Zn solubility occurs at pH 7 to 8 (Xiao *et al.*, 1999) explains the negative correlation between soil pH and Zn concentration in BS extracts.

Although Cu and Zn concentrations significantly increased in all ABS extracts compared to the control, increasing rates of AB did not result in significant increases ($P < 0.05$) in Cu or Zn concentration in the extracts. The availability of Cu and Zn in AB-amended soils depends on the chemical forms of these metals in the amendment. Cu and Zn are likely to be tightly retained by sorption mechanisms on the inorganic and organic components of this material instead of being released to soil solution (Torri and Lavado,

Table 3 Multiple linear regression coefficients for soluble Cu and Zn in the extracts of substrates under assessment

	Treatment		R ²	SD
Cu	BS	$-0.0099 + 0.029 \text{ DOC} + 4.42 \cdot 10^{-4} \text{ Cu}_{\text{soil}}$	0.9546	0.00450
	ABS	$-0.161 + 0.021 \text{ pH} + 2.52 \cdot 10^{-4} \text{ Cu}_{\text{soil}}$	0.73	0.00450
Zn	BS	$-0.034 - 0.006 \text{ pH} - 0.105 \text{ DOC} + 6.29 \cdot 10^{-5} \text{ Zn}_{\text{soil}}$	0.89	0.0087
	ABS	$0.009 + 1.43 \cdot 10^{-4} \text{ Zn}_{\text{soil}}$	0.52	0.01517

Cu_{soil} : total Cu concentration in amended soil (mg kg^{-1}); Zn_{soil} : total Zn concentration in amended soil (mg kg^{-1}).

2008a; Torri and Lavado, 2008b). The results of the multiple-regression analysis in ABS treatments indicate that the Cu solution concentration increased with an increase in pH and total Cu in soils (Table 3). This seems to be a contradiction, for an increase in soil pH implies increased metal sorption due to deprotonation of surface sites. Nonetheless, in lime-treated B, Hsiau and Lo (1998) reported a shift of Cu from the organically bound fraction to the exchangeable fraction. Some other authors have also reported that liming increased Cu availability (Aarab *et al.*, 2006; Jamali *et al.*, 2007) and attributed this fact to the irreversible dissolution of organically bound Cu, which enhanced the formation of DOC–Cu complexes (Leita and De Nobili, 1991). Such complexes are more mobile and less readily adsorbed in soil (Neal and Sposito, 1986); thus, they are more easily extracted. The Zn concentration in ABS extracts was positively correlated with total Zn content (Table 3). Although pH is a major factor that significantly affects metal availability, no correlation was observed between the Zn concentration in ABS extracts and this soil parameter. This result suggests that the stabilization of Zn that was achieved by incineration does not depend on soil pH in the 7.6–8.2 range, in which the minimum Zn solubility occurs (Xiao *et al.*, 1999).

The Cu and Zn levels in extracts of all treatments used in this work were below toxicity limits for a wide range of vegetable species (Geiger, Federer, and Sticher, 1993); thus, no phytotoxic effects were expected for discaria. Cusato *et al.* (2007) reported that even 2000 mg kg⁻¹ of Zn delayed discaria growth, but caused no phytotoxic symptoms.

Phytotoxicity Assays

Seed germination. Seed germination and root length in each plate were measured for ryegrass seeds after 6 d and for discaria seeds after 13 d. No germination delay was observed among treatments for ryegrass or discaria seeds. The percentages of RSG remained at a high level for all treatments in ryegrass assay, in spite of the increasing application rates of B or AB. Although there was a trend of decreasing the percentage of ryegrass RSG accompanied with increasing application rate of B (Table 4), a significant decrease of ryegrass RSG ($P < 0.05$) was only observed when the seeds were treated with the highest concentration of AB (ABS 10). These results could not be attributed to high Cu or Zn concentration, for there were no statistical differences among Cu or Zn concentrations

Table 4 Percentages of RSG, RRG, and GI of ryegrass (*Lolium perenne L.*) and discaria (*Discaria Americana*); different letters in the same column indicate significant differences at the 0.05 probability level based on Tuckey test

	Ryegrass			Discaria		
	RSG	RRG	GI	RSG	RRG	GI
BS 2%	101.1a	87.4a	88.6a	71.3a	103.0ab	73.4ab
BS 4%	94.2ab	92.4a	87.2a	70.5a	93.6ab	66.0ab
BS 6%	93.4ab	91.7a	86.0a	99.5a	146.6a	145.9a
ABS 2%	97.6a	107.7a	105.0a	95.0a	94.2ab	89.5ab
ABS 4%	94.8ab	88.9a	84.4a	70.5a	93.74ab	66.1ab
ABS 6%	90.9ab	89.7a	81.7a	66.0a	91.8ab	60.6ab
ABS 8%	96.4ab	94.8a	92.3a	59.3a	130.8a	77.6ab
ABS 10%	83.8c	90.2a	77.3a	54.5a	76.6ab	41.7B

within all AB extracts. Besides, it has been reported that concentrations of Cu up to 0.5 mg kg^{-1} and of Zn up to 30 mg kg^{-1} did not show primary toxicity for ryegrass seed germination (Wong and Bradshaw 1982). The concentrations of Cu and Zn in B or AB extracts in this study were almost 10-fold lower. Our data suggest that the inhibition of ryegrass seed germination in ABS 10 was mostly due to an osmotic effect. Salts can affect seed germination either by restricting the supply of water and/or causing specific injury to the metabolic machinery through ions (Mohammed and Sen, 1990; Pujol, Calvo, and D'iaz, 2000). We observed a negative correlation between seed germination of ryegrass and EC in both BS and ABS extracts ($\text{CE (dS m}^{-1}) = -35.90 \text{ RSG} + 102.96$, $R^2 = 0.60$, $P < 0.05$).

Compared to ryegrass, RSG was significantly lower for discaria, indicating that germination of this species was more sensitive than ryegrass to B-soluble components. RSG varied in a range from 54 to 99.5%. According to Zucconi *et al.* (1981), there is a phytotoxic effect when RSG is lower than 80–85%. No significant differences on RSG between B or AB treatments were observed (Table 4). As in ryegrass, there was a trend of decreasing values of RSG along with increasing concentration of AB dose (Table 4). Even though salinity did not cause significant decreases in RSG for discaria, a negative correlation was observed between seed germination of discaria and EC in AB treatments ($\text{EC (dS m}^{-1}) = -113.6 \text{ RSG} + 99.7$, $R^2 = 0.73$, $P < 0.05$). This tendency was not observed in B treatments. On the contrary, an increase in RSG in BS6 was observed. It has been reported that Cu and Zn uptake had a stimulating effect on the activity of hydrolytic enzymes of bean seeds during germination (Zeid and Abou El Ghate, 2007). In our case, there appeared to be no clear relation between discaria RSG in BS 6 treatment and the parameters measured. Further experiments should be performed to study this finding.

RRG. Root elongation has been regarded as a more sensitive method than seed germination when used as a bioassay for the evaluation of phytotoxicity (Wang and Keturi, 1990). According to Kapustka and Reporter (1993), seed germination is rather insensitive to many toxic substances: first, many chemicals cannot pass through seed coats and, second, the embryonic plant derives its nutritional requirements internally from the seed storage materials, making it isolated from the environment. Several other authors agree with this evidence (Dorn *et al.*, 1998; Alvarenga *et al.*, 2007). It has been reported that the toxic effects of metals on root elongation occurs through disturbing the equilibrium among ions when metal ions enter plants, inhibiting natural ion absorption, transportation, infiltration, and adjustment, resulting in metabolic disorders (Fernandez and Henriques, 1991; Li, Xiong, and Hu, 2003; Ni and Wei, 2003). In this study, no significant differences in RRG of ryegrass were observed with increasing B or AB application rates (Table 4). These results differ from those recorded by Wong and Bradshaw (1982), who reported a reduction of 50% in root growth of ryegrass at Cu solution concentrations of $0.02 \mu\text{g l}^{-1}$.

For the discaria seeds, slight differences in RRG could be observed (Table 4). In some cases, RRG exceeded 100% when seeds were in contact with BS or ABS extracts, suggesting a stimulating effect on root growth. An atypical increase in RRG was observed in BS 6 treatment. These results are difficult to be explained since RRG did not correlate with EC, DOC, pH, total N or Cu, and Zn content in the extracts.

GI. GI is usually considered to be the most sensitive parameter that is able to account for the low toxicity affecting root growth and seed germination (Zucconi *et al.*, 1981). A GI above 80–85% has been regarded as an indicator of phytotoxin-free composts (Zucconi *et al.*, 1981), whereas GI values over 100% suggest a growth-stimulating effect on plant

growth (Keeling, Paton, and Mullett, 1994). GI values for ryegrass varied from 105% to 77%, with no significant differences among treatments (Table 4). GI values for discaria varied from 41.7% to 145.9%, with the highest value in BS 6 and the lowest value in ABS 10. The reduction of GI has been attributed by other authors to the release of high concentrations of ammonia or low molecular weight organic acids (Wong, 1985; Fja'llborg and Dave, 2004; Fuentes et al., 2004). Unfortunately, we did not measure both parameters. Although EC, total N, and DOC were significantly higher in ABS 10 compared to the other treatments, we found no relationship between GI values for discaria and total N or DOC concentration in the extracts ($r = 0.0010$).

CONCLUSIONS

The results obtained in this study show that the concentration of Cd, Cu, Pb, and Zn in B- and AB-amended soils extracts were low enough to cause no phytotoxic effect on discaria or ryegrass species. In general, total N, Cu and Zn concentration, EC, and DOC in the extracts increased with increasing doses of both amendments. The use of AB did not show dramatic differences in these parameters as compared with B. Relative seed germination was generally lower for discaria compared to ryegrass, indicating that this species is more sensitive to B-soluble components during the germination period. A negative correlation could be established between relative seed germination of ryegrass and discaria and EEC. The RRG and GI of ryegrass were not significantly affected with the increasing B- or AB-application rate. An increase in RRG and GI was observed for discaria with a B field-application rate equivalent to 156 t DW ha⁻¹, suggesting a stimulating effect of the amendment. As seed germination of discaria was more sensitive to phytotoxic substances than root elongation, germinated seedlings of discaria might be a feasible option to be applied for metal stabilization in B-amended soils. However, further greenhouse and field experiments should be performed to confirm these findings.

REFERENCES

- Aarab, T., Smeyers, M., Remy, M., Godden, B., and Delhay, J.P. 2006. The storage of sewage sludge: Influence of liming on the evolution of copper chemical fractions. *Waste Manag.* 26, 1024–1032.
- AGN 2006. Auditoría General de la Nación, Informe sobre el Ente Tripartito de Obras y Servicios Sanitarios, Memoria 2006, 62 p.
- Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, A.P., Fernandes, R.M., Cunha-Queda, A.C., Duarte, E., and Vallini, G. 2007. Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. *Environ. Int.* 33, 505–513.
- Amato, M. 1983. Determination of 12C and 14C in plant and soil. *Soil Biol. Biochem.* 15, 611–612.
- Arienzo, M., Adamo, P., and Cozzolino, V. 2004. The potential of *Lolium perenne* for revegetation of contaminated soil from a metallurgical site. *Sci. Total Environ.*

- 319, 13–25.
- Bierman, P. and Rosen, C. 1994. Phosphate and trace metal availability from sewage-sludge incineration ash. *J. Environ. Qual.* **23**, 822–830.
- Blakemore, L., Searle, P., and Daly, B. 1987. *Methods for Chemical Analysis of Soils*. NZ Soil Bureau Scientific Report 80, DSIR, Lower Hutt, New Zealand, New Zealand Soil Bureau.
- Bremner, J. and Mulvaney, C. 1982. Nitrogen-total. In: *Methods of Soil Analysis*, pp. 595–624. (Page, A., Miller, R., and Keeney, D., Eds.). Part 2, vol. 9, Madison, WI, American Society of Agronomy.
- Britto, D.T. and Kronzucker, H.J. 2002. NH₄⁺ toxicity in higher plants: A critical review. *J. Plant Physiol.* **159**, 567–584.
- Chaney, R. 1983. Potential effects of waste constituents on the food chain. In: *Land Treatment of Hazardous Wastes*, pp. 152–240 (Parr, J.F., Marsh, P. B., and Kla, J. M. Eds.). Park Ridge, New Jersey, Noyes Data Corp.
- Chapman, H.D. 1965. Diagnostic criteria for plants and soils. In: *Diagnostic Criteria for Plants and Soils*, pp. 902–904. (Black, C.A., Ed.). Riverside, CA, American Society of Agronomy.
- Cusato, M.S., Tortosa, R.D., Valiente, L., Barneix, A.J., and Puelles, M.M. 2007. Effects of Zn²⁺ on nodulation and growth of a South American actinorhizal plant, *Discaria americana* (Rhamnaceae). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 771–777.
- Dorn, P.B., Vipond, T.E., Salanitro, J.P., and Wisniewski, H. 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, Microtox(R), and plants. *Chemosphere* **37**, 845–860.
- Fernandez, J.C. and Henriques, F.S. 1991. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. *Bot. Rev.* **57**, 246–273.
- Fjällborg, B. and Dave, G. 2004. Toxicity of Sb and Cu in sewage sludge to terrestrial plants (lettuce, oat, radish), and of sludge elutriate to aquatic organisms (Daphnia and Lemna) and its interaction. *Water Air Soil Pollut.* **155**, 3–20.
- Forsberg, L. and Ledin, S. 2003. Effects of iron precipitation and organic amendments on porosity and penetrability in sulphide mine tailings. *Water Air Soil Pollut.* **142**, 395–408.
- Fuentes, A., Lloréns, M., Sáez, J., Aguilar, M.I., Ortuño, J.F., and Meseguer, V.F. 2004. Phytotoxicity and heavy metals speciation of stabilised sewage sludges. *J. Hazard. Mat.* **108**, 161–169.
- Geiger, G., Federer, P., and Sticher, H. 1993. Reclamation of heavy metal contaminated soils: Fieldstudies and germination experiments. *J. Environ. Qual.* **22**, 201–207.
- Hoekstra, N., Boske, T., and Lantinga, E.A. 2002. Effects of cattle dung from farms with different feeding strategies on germination and initial root growth of cress (*Lepidium sativum* L.). *Agric. Ecosys. Environ.* **93**, 189–196.
- Hsiau, P. and Lo, S.L. 1998. Fractionation and leachability of Cu in lime-treated sewage sludge. *Wat. Res.* **32**, 1103–1108.
- Jamali, M.K., Kazi, T.G., Arain, M.B., Afridi, H.I., Jalbani, N., Memon, A.U.R., Ansari, R., and Shah, A. 2007. The feasibility of using an industrial sewage sludge produce in Pakistan as agricultural fertilizer used for cultivation of Sorghum bicolor L. *Arc. Agron. Soil Sci.* **53**, 659–671.
- Kapustka, L.A. and Reporter, M. 1993. Terrestrial primary producers. In: *Handbook of Ecotoxicology*, vol. 1, pp. 278–298. (Calow, P., Ed.). Oxford, UK, Blackwell Scientific.
- Keeling, A.A., Paton, I.K., and Mullett, J.A.J. 1994. Germination and growth of plants in

- media containing unstable refuse-derived compost. *Soil Biol. Biochem.* **26**, 767–772.
- Leita, L. and De Nobili, M. 1991. Water soluble fractions of heavy metals during composting of municipal solid waste. *J. Environ. Qual.* **20**, 73–78.
- Li, F.M., Xiong, Z.T., and Hu, H.Y. 2003. Effects of chelating agents on toxicity of copper to *Elsholtzia splendens*. *Environ. Sci.* **24**, 96–100.
- Luo, Y.M. and Christie, P. 1998. Bioavailability of copper and zinc in soils treated with alkaline stabilized sewage sludges. *J. Environ. Qual.* **27**, 335–342.
- McBride, M.B. 1995. Toxic metal accumulation from agricultural use of sludge: Are USEPA Regulations protective? *J. Environ. Qual.* **24**, 5–18.
- McGrath, S.P., Zha, F.J., and Lombi, E. 2001. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal contaminated soils. *Plant Soil* **232**, 207–214.
- Meima, J.A., Van Der Weijden, R.D., Eighmy, T.T., and Comans, R.N.J. 2002. Carbonation processes in municipal solid waste incinerator bottom ash and their effect on the leaching of copper and molybdenum. *Appl. Geochem.* **17**(12), 1503–1513.
- Miller, W.P. and Miller, D.M. 1987. A micropipette method for soil mechanical analysis. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **18**, 1–15.
- Mohammad, S. and Sen, D.N. 1990. Germination behaviour of some halophytes in Indian desert. *Int. J. Exp. Biol.* **28**, 545–549.
- Munzuroglu, O. and Geckil, H., 2002. Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **43**, 203–213.
- Neal, R.H. and Sposito, G. 1986. Effects of soluble organic matter and sewage sludge amendments on Cd sorption by soils at low Cd concentrations. *Soil Sci.* **142**, 164–172.
- Ni, T.H. and Wei, Y.Z. 2003. Subcellular distribution of cadmium in mining ecotype *Sedum alfredii*. *Acta Bot Sin* **45**, 925–928.
- Paramasivam, S., Sajwan, K.S., and Alva, A.K. 2006. Incinerated sewage sludge products as amendments for agricultural soils: Leaching and plant uptake of trace elements. *Water, Air, Soil Pollut.* **171**, 273–290.
- Pascual, I., Antolín, M.C., García, C., Polo, A., and Sánchez-Díaz, M. 2004. Plant availability of heavy metals in a soil amended with a high dose of sewage sludge under drought conditions. *Biol. Fert. Soils* **40**, 291–299.
- Polymenakou, P.N. and Stephanou, E.G. 2005. Effect of temperature and additional carbon sources on phenol degradation by an indigenous soil Pseudomonad. *Biodegradation* **16**, 403–413.
- Pujol, J.A., Calvo, J.F., and D'iaz, L.R. 2000. Recovery of germination from different osmotic conditions by four halophytes from southeastern Spain. *Ann. Bot.* **85**, 279–286.
- Richards, J.W., Glenn, D., Krumholz, M., Chval, M.S., and Tisa, L.S., 2002. Heavy metal resistance patterns of Frankia strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 923–927.
- Römken, P., Hoenderboom, G., and Dolfing, J. 1999. Copper solution geochemistry in arable soils. Field observations and model application. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* **28**, 776–783.
- Shuman, L.M. 1985. Fractionation method for soil microelements. *Soil Sci.* **140**, 11–22.
- Torri, S. 2001. Distribución y biodisponibilidad de Cd, Cu, Pb y Zn en suelos fertilizados con biosólidos. (Distribution and availability of Cd, Cu, Pb y Zn in sewage sludge amended soils). M.Sci. dissertation. University of Buenos Aires, Faculty of Agronomy, Buenos Aires, Argentina.

- Torri, S., Alvarez, R., and Lavado, R. 2003. Mineralization of carbon from sewage sludge in three soils of the Argentine pampas. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **34**, 2035–2043.
- Torri, S. and Lavado, R. 2002. Distribución y disponibilidad de elementos potencialmente tóxicos en suelos representativos de la provincia de Buenos Aires enmendados con biosólidos. (Distribution and availability of potentially toxic elements in representative soils of Buenos Aires Province as a result of biosolids application). *Ciencia del Suelo* **20**, 98–109.
- Torri, S. and Lavado, R. 2008a. Dynamics of Cd, Cu and Pb added to soil through different kinds of sewage sludge. *Waste Manag.* **28**, 821–832.
- Torri, S. and Lavado, R. 2008b. Zn distribution in soils amended with different kinds of sewage sludge. *J. Environ. Manag.* **88**, 1571–1579.
- Tortosa, R.D. 1983. El género *Discaria* (Rhamnaceae). *Bol. Soc. Argent Bot.* **22**, 301–335.
- USEPA 1982. Seed germination/root elongation toxicity test. EG-12, Office of Toxic Substances, Washington, DC, U.S. Environmental Protection Agency.
- USEPA 1993. 40 CFR, part 503. Standards for the use or disposal of sewage sludge. *Fed. Reg.* **58**, 9387–9404.
- Vangronsveld, J., Van Assche, F., and Clijsters, H. 1991. Reclamation of a 'desert like' site in the north east of Belgium: Evolution of the metal pollution and experiments in situ. In: *Proceedings of the International Conference of Heavy Metals in the Environment*, 58–61. (Farmer, J.G., Ed.). Edinburgh, UK, CEP Consultants.
- Vangronsveld, J., Van Assche, F., Sterckx, J., and Clijsters, H. 1993. Rehabilitation studies on an old non-ferrous waste dumping ground: Effects of metal immobilization and revegetation. In: *Proceedings of the International Conference of Heavy Metals in the Environment*, pp. 563–566. (Allen, R.J., Nriagu, J.O., Eds.). Edinburgh, UK, CEP Consultants.
- Wang, C., Sun, S.X., Gao, S., Wang, L.S., and Han, S.K. 2001. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. *Chemosphere* **44**, 1711–1721.
- Wang, W. 1992. Use of plants for the assessment of environmental contaminants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **126**, 87–127.
- Wang, W. and Keturi, P. 1990. Comparative seed germination tests using ten plant species for assessing effluent toxicity from a metal engraving sample. *Water, Air, Soil, Pollut.* **52**, 369–376.
- Wong, J.W., Li, K., Fang, M., and Su, D.C. 2001. Toxicity evaluation of sewage sludges in Hong Kong. *Environ. Int.* **27**, 373–380.
- Wong, M.H. 1985. Phytotoxicity of refuse compost during the process of maturation. *Environ. Pollut.* **40**, 127–144.
- Wong, M.H. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* **50**, 775–780.
- Wong, M.H. and Bradshaw, A.D. 1982. A comparison of the toxicity of heavy metals using root elongation of rye grass, *Lolium Perenne*. *New Phytol.* **91**, 255–261.
- Wong, M.H., Cheung, Y.H., and Cheung, C.L. 1983. The effects of ammonia and ethylene oxide in animal manure and sewage sludge on seed germination and root elongation of *Brassica parachinensis*. *Environ. Pollut.* **30**, 109–123.
- Xiao, C., Ma, L., and Sarigumba, T. 1999. Effects of soil on trace metal leachability from pape rashes and sludge. *J. Environ. Qual.* **28**, 321–333.
- Zeid, I.M. and Abou El Ghatte, H.M. 2007. Response of bean to some heavy metals in sewage water. *Pakistan J. Biol. Sci.* **10**, 874–887. Zhang, F.-S., Yamasaki, S.-I., and

- Nanzyo, M. 2001. Application of waste ashes to agricultural land—Effect of incineration temperature on chemical characteristics. *Sci. Tot. Environ.* **264**, 205–214.
- Zheljaskov, V. and Warman, P. 2004. Phytoavailability and fractionation of copper, manganese, and zinc in soil following application of two composts to four crops. *Environ. Pollut.* **131**, 187–195.
- Zucconi, F., Monaco, A., Forte, M.E., and De Bertoldi, M. 1985. Phytotoxins during the stabilization of organic matter. In: *Composting of Agricultural and Other Wastes*, pp. 73–86. (Gasser, J.K.R., Ed.). London, Elsevier.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M.E., and De Bertoldi, M., 1981. Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle* **22**, 54–57.