



UNIVERSIDAD
DE
CÓRDOBA



Universidad de Córdoba
Instituto de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

**EVALUACIÓN DEL BIOCARBÓN COMO ENMIENDA CORRECTORA DE LA CLOROSIS
FÉRRICA**

Realizado por

Marta Cabello Bermúdez

Máster Cambio Global:
Recursos Naturales y Sostenibilidad

Julio 2013

Universidad de Córdoba
Instituto de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

**EVALUACIÓN DEL BIOCARBÓN COMO ENMIENDA CORRECTORA DE LA CLOROSIS
FÉRRICA**

Realizado por

Marta Cabello Bermúdez

Fdo:

Bajo la dirección de

Dr. José Antonio Albuquerque Méndez y María del Carmen del Campillo García

Fdo:

Fdo:

Quienes autorizan su presentación como requisito parcial para la obtención del grado
de **Máster Cambio Global: Recursos Naturales y Sostenibilidad**

Julio 2013

Índice

Pág.

Agradecimientos	i
Resumen	ii
Abstract	iv
1.Introducción	1
1.1.Biocarbón.....	1
1.2.El hierro.....	5
1.3.Clorosis férrica.....	9
2.Materiales y métodos	11
2.1. Suelo.....	11
2.2. Biocarbón.....	11
2.3. Experimento de crecimiento en cámara de cultivo.....	13
2.4. Análisis estadístico.....	16
3.Resultados y discusión	17
3.1. Efecto de la fertilización con hierro.....	17
3.2. Efecto de la adición de biocarbón.....	20
4.Conclusión	28
5.Bibliografía	29

Agradecimientos

Este estudio ha sido realizado en el marco del “Proyecto Biocar: Estudio del biocarbón como sumidero de carbono” (Ref.: IPT-440000-2010-8), financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Programa Nacional de Cooperación Público-Privada, Subprograma INNPACTO) y fondos FEDER “Fondo Europeo de Desarrollo Regional, una manera de hacer Europa”.

Mi agradecimiento a los directores de este trabajo, José y Campi, por haberme enseñado tanto y por su apoyo y tiempo dedicado. Sin vosotros, el camino a la meta habría sido muy duro.

A mis compañeros de clase por hacer de este año un magnífico año, en especial a mi amiga Rebeca por compartir conmigo grandes momentos en el laboratorio y a mi amigo Carlos, por su ayuda prestada durante las “maratones” de escribir los proyectos.

A mis padres, por haberme animado tanto en momentos de agobio y por creer siempre en mi. A ti también, Peluso.

A todos vosotros, gracias.

Resumen

EVALUACIÓN DEL BIOCARBÓN COMO ENMIENDA CORRECTORA DE LA CLOROSIS FÉRRICA

Realizado por
Marta Cabello Bermúdez

Máster Cambio Global: Recursos Naturales y Sostenibilidad

Bajo la dirección de Dr. José Antonio Albuquerque Méndez y María del Carmen del Campillo García.

El biocarbón es un material que se obtiene mediante la descomposición térmica de biomasa residual a temperaturas relativamente bajas (<700°C) y bajo condiciones limitantes de oxígeno (pirólisis). En la actualidad, el biocarbón está generando un enorme interés debido a que puede contribuir a mitigar los efectos del cambio climático y puede ejercer efectos beneficiosos sobre los cultivos agrícolas y forestales, incrementando la producción y limitando el uso de fertilizantes.

El objetivo de nuestro estudio es evaluar el efecto del biocarbón sobre la disponibilidad de hierro en un suelo altamente inductor de clorosis férrica. Como cultivo se utilizó el altramuza (*Lupinus Albus* L.), realizando un diseño factorial con 2 tipos de biocarbón (uno procedente de poda de olivo y otro elaborado a partir de astilla de pino) y 2 fuentes de hierro (sulfato ferroso y quelato de hierro).

Los resultados obtenidos indicaron que el biocarbón de poda de olivo produjo un aumento en la producción de altramuza en condiciones de deficiencia de Fe. Además, la combinación de éste con las fuentes de hierro presentó mejores resultados en algunas de las variables estudiadas (peso seco parte aérea, hoja y SPAD) que la sola aplicación

de Fe como fertilizante. Estos resultados implican que la enmienda de suelo con biocarbón no sólo es beneficiosa desde el punto de vista de fijación de carbono y mitigación del cambio climático, sino que en condiciones de limitación de nutrientes puede ejercer un papel fundamental para aumentar la fertilidad del suelo.

Palabras clave: biocarbón, fuentes de hierro, clorosis férrica

Abstract

ASSESSMENT OF BIOCHAR AS A CORRECTIVE FOR IRON CHLOROSIS

By

Marta Cabello Bermúdez

Master Global Change: Nature Resources and Sustainability

Under the supervision of Dr. José Antonio Alburquerque Méndez and María del Carmen del Campillo García.

Biochar is a material obtained from thermal decomposition of residual biomass at relatively low temperatures (<700 °C) and under oxygen-limited conditions (pyrolysis). Nowadays, biochar is generating a great interest as tool to mitigate the effects of climate change and exert beneficial effects on agricultural and forest crops, increasing plant yield and limiting the use of fertilizers.

The aim of our study was to evaluate the effect of biochar on the availability of iron in a calcareous soil showing iron chlorosis. Lupine (*Lupinus Albus* L.) was used as tested crop, performing a factorial design with two biochar types (coming from olive-tree pruning or pine woodchip) and 2 sources of iron (ferrous sulfate and iron chelate).

Our results indicated that the olive-tree pruning biochar led to an increase in the yield of lupine under Fe-deficient conditions. In addition, biochar in combination with iron sources presented better results in some of the studied variables (aerial part dry weight, leaf dry weight and SPAD) compared to the single application of the Fe fertilizer. These results imply that soil amending with biochar can led to beneficial effects in terms of carbon sequestration and climate change mitigation, as also it can play an important role on soil fertility under nutrient-deficient conditions.

Keywords: Biochar, iron sources, iron chlorosis

1. Introducción

1.1. Biocarbón

El biocarbón ("*biochar*", en inglés) es un material que se obtiene mediante la descomposición térmica de biomasa residual a temperaturas relativamente bajas (<700 °C) y bajo condiciones limitantes de oxígeno (pirólisis). De esta pirólisis se obtienen aceites, gas de síntesis (fuente de energía) y biocarbón. Las fuentes principales para generar biocarbón son residuos agroindustriales y forestales. Junto al aprovechamiento energético de estos residuos, la producción de biocarbón y su aplicación al suelo disminuye la cantidad de dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O) que pueden desprender por descomposición, por lo que es considerado una buena opción para mitigar el cambio climático (Lehmann y Rondon 2006). Así por ejemplo, en experimentos de invernadero las emisiones de N₂O se redujeron en un 80% y las emisiones de CH₄ eran completamente suprimidas con adiciones de biocarbón de 20 g kg⁻¹ (Rondon et al. 2005). No se conoce con exactitud la razón de las reducciones de las emisiones de CH₄ y N₂O, aunque en este último caso pueden deberse a la baja nitrificación, como consecuencia de una menor mineralización, resultante de una mayor relación C:N o de la naturaleza recalcitrante del carbono presente en el biocarbón.

En general, el biocarbón contiene carbono en una forma estable más resistente a la descomposición que el de la biomasa sin pirolizar. Esta estabilidad del carbono se debe a las condiciones del proceso de pirólisis (velocidad del proceso, presión, temperatura, etc.). Se estima que entre un 80 y 90% del carbono aplicado con la biomasa sin pirolizar se descompone en un plazo de 5-10 años, mientras que si se añade en forma de biocarbón es inferior al 60% (Lehmann y Rondon 2006).

Por otra parte, hay que valorar la reducción de las emisiones de CO₂ que supondría la sustitución de combustibles fósiles por la producción energética en base al

aprovechamiento de los aceites y el gas de síntesis que se produce durante la pirólisis de biomasa residual.

Se ha estimado a nivel mundial que dedicando un 1% de la biomasa vegetal residual a la producción de biocarbón, se podría reducir hasta el 10% de las emisiones de carbono producidas por el hombre (Lehmann y Rondon 2006; Lehmann y Joseph 2009). Además, el uso del biocarbón como enmienda para suelos, presenta un gran potencial para la mejora de la producción agrícola. Algunas propiedades beneficiosas para los suelos descritas hasta ahora son: mejora de la retención hídrica, disminución de la pérdida de nutrientes por lixiviación, aporte de nutrientes, mejora de la capacidad de intercambio catiónico, y aumento de la actividad microbiana (Sohi et al. 2010). Además, la incorporación de biocarbón puede modificar la estructura del suelo, su porosidad, textura y densidad, provocando así una mejora en las propiedades físicas del suelo (Amonette y Joseph 2009; Sohi et al. 2010).

Las propiedades del biocarbón pueden variar de forma considerable haciendo que reaccionen de modo diferente en los suelos, por eso es necesaria una buena descripción de sus características para entender y predecir su impacto en la agricultura (Atkinson et al. 2010).

A modo de resumen (Figura 1), el biocarbón está generando en la actualidad un enorme interés debido a :

- Mitiga los efectos del cambio climático al actuar como sumidero de carbono.
- Ejerce efectos beneficiosos sobre cultivos, incrementando su producción y limitando el uso de fertilizantes.
- Reduce el impacto ambiental de los residuos tratados.

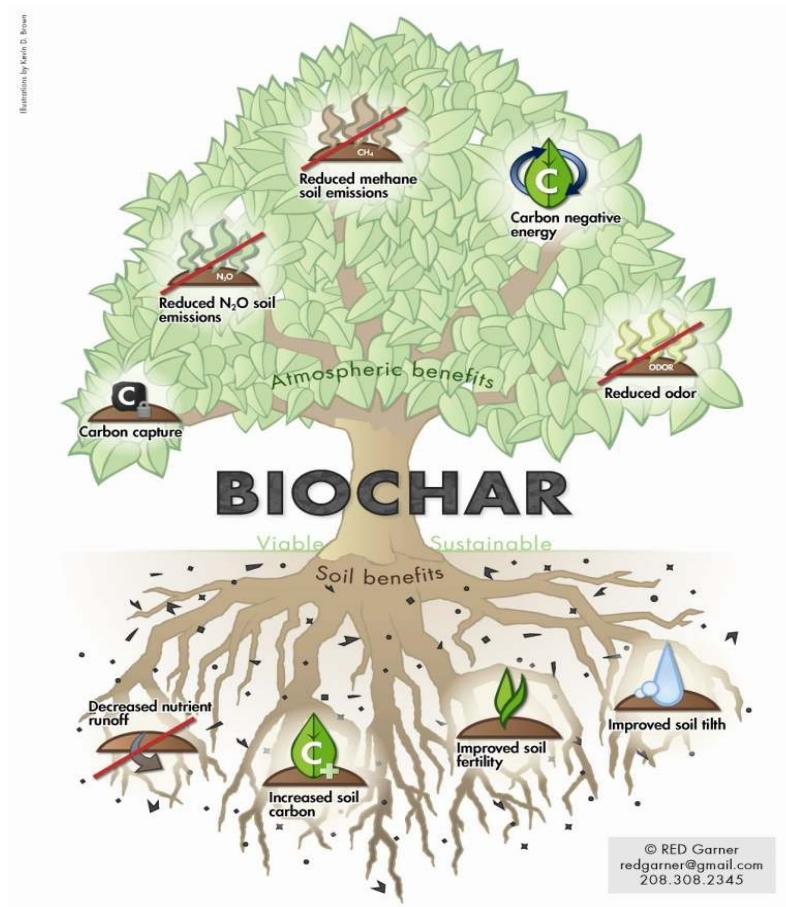


Figura 1. Esquema de los beneficios en la atmósfera y en el suelo de la aplicación del biocarbón (© RED Garner).

Se han realizado numerosos estudios que evalúan los efectos de la adición de biocarbón sobre la producción y el rendimiento de distintos cultivos, aunque éstos no son concluyentes, presentando respuestas negativas, nulas o positivas. La mayoría de estudios atribuyen la respuesta positiva de los cultivos a aumentos en la disponibilidad de nutrientes más que a un aporte directo de nutrientes por parte del biocarbón (Iswaran et al. 1980; Wardle et al. 1998; Hoshi 2001; Chan et al. 2007; Zwieter et al. 2007), aumentando la eficiencia en el uso de fertilizantes (Sohi et al. 2010). Así por ejemplo, Chan et al. (2007) no encontraron incrementos en materia seca debido al biocarbón en un cultivo de rábano. Sin embargo, se observaron incrementos superiores al 250% en materia seca al combinar fertilizante nitrogenado y biocarbón. Asai et al.

(2009) también observaron incrementos en producción de arroz combinando fertilización nitrogenada y biocarbón. Hossain et al. (2010) obtuvieron incrementos con respecto al control en la producción de tomate superiores al 60% al añadir biocarbón, y cercanos al 100% al combinar biocarbón y fertilizante mineral. Según los autores, estos resultados no se deben sólo al aporte de nutrientes efectuado con la fertilización mineral, sino a una mejora de las propiedades del suelo, así como a su efecto encalante que se manifiesta en un aumento del pH del suelo.

La capacidad de los suelos para retener cationes en forma intercambiable y, por lo tanto disponibles para la planta (capacidad de intercambio catiónico, CIC) aumenta en proporción a la cantidad de materia orgánica del suelo. Sin embargo, el biocarbón tiene una capacidad aún mayor que la materia orgánica de los suelos para adsorber cationes por unidad de carbono (Sombroek et al. 1993) debido a su mayor área superficial, mayor superficie de carga negativa, y una mayor densidad de carga (Liang et al. 2006). Al tener esta alta CIC se favorece la retención de nutrientes y se evitan pérdidas por lixiviación de iones como amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-), entre otros. Además, la aplicación de biocarbón al suelo incrementa el aporte directo de nutrientes como potasio, fósforo, calcio, cinc y cobre (Lehmann y Rondon 2006). Por otra parte, la capacidad de intercambio de cationes de la materia orgánica suele ser nula a pH muy bajo y aumenta conforme se eleva el pH. Lo mismo ocurre con el biocarbón, su potencial de CIC incrementa al ascender los valores de pH (Lehmann 2007).

También se han realizado estudios donde la adición de fertilizante combinada con biocarbón no ha incrementado la producción. Así, Zhang et al. (2010) obtuvieron aumentos en la producción de arroz con la adición de biocarbón, pero estos resultados no mejoraron al combinar el biocarbón con fertilización mineral. Gaskin et al. (2010) tampoco obtuvieron incrementos en producción de maíz al combinar biocarbón y fertilización mineral.

Por lo tanto, resulta del máximo interés evaluar la interacción biocarbón-nutriente,

especialmente en los casos en los que las condiciones del suelo favorecen la deficiencia de éstos, limitando la producción agrícola.

1.2. El hierro

1.2.1. El hierro en las plantas

El hierro (Fe) es un nutriente esencial para las plantas. Este elemento juega un papel fundamental en la síntesis de la clorofila. Por su participación en la formación de clorofila, una deficiencia de Fe en las plantas disminuye la concentración de carotenos y xantofilas en ellas, ocasionando una disminución en la actividad de los transportadores de electrones y en los fotosistemas (Römheld y Marschner 1991), originando una merma significativa de la fotosíntesis neta y, en consecuencia, una disminución del tamaño del follaje y una disminución de la capacidad de fijación y reducción de CO₂ (Terry y Abadia 1986).

Por tanto, cuando las plantas se encuentran sometidas a una deficiencia de Fe, disminuye la actividad de algunas enzimas y el resultado es el fenómeno de clorosis férrica. Este fenómeno puede definirse como una deficiencia de clorofila en hojas de plantas producida por un desarreglo en la nutrición de Fe. El efecto más visible de esta clorosis se observa en las hojas más jóvenes de plantas verdes en donde se produce una disminución del contenido de clorofila, lo que conlleva un amarilleamiento, aunque las nerviaciones mantienen su color original. En casos extremos, si la carencia persiste, pueden aparecer zonas necróticas en las hojas, en especial en los bordes foliares.

Es un problema importante ya que se da generalmente en suelos calizos y en España aproximadamente el 50% de los suelos son calizos. En estos suelos se produce un bloqueo del Fe para las plantas, aunque su contenido sea abundante, debido a que predominan las formas oxidadas que son poco solubles a pH elevado. Por esto, la

clorosis es frecuente en suelos calcáreos y alcalinos con elevados niveles de bicarbonato (Chen et al. 1982).

Las plantas tienen una serie de mecanismos para luchar contra la deficiencia de Fe (Römheld y Marschner 1986):

-Mecanismos específicos:

- Dicotiledóneas y no gramíneas: acidificación de la rizosfera.
- Gramíneas: liberación de fitosideróforos que movilizan el Fe (III) inorgánico y favorecen la disponibilidad de este nutriente para la planta en condiciones de deficiencia (Takagi et al. 1984; Marschner et al. 1986; Walker y Welch 1986).

-Mecanismos no específicos:

- Absorción de cationes que producen una acidificación de la rizosfera: así se provoca una reducción de Fe(III) a Fe(II) que es la forma soluble en la que las plantas lo absorben.
- Compuestos de bajo peso molecular: intervienen como agentes quelantes del Fe.

Por tanto, la deficiencia de Fe en la planta, a pesar de ser un nutriente requerido en pequeña cantidad por las especies vegetales, puede producir una dramática diferencia en el crecimiento vegetal, el desarrollo de raíces y la producción de semillas o frutos, provocando bajos rendimientos y una menor calidad del cultivo y los frutos.

En Andalucía, las pérdidas económicas causadas por la clorosis férrica son importantes

especialmente en frutales como olivo, vid, cítricos, etc.

1.2.2. El hierro en el suelo

La mayor parte del Fe en el suelo se encuentra en forma de silicatos ferromagnesianos. La meteorización de estos silicatos libera Fe (II) que se oxida rápidamente a Fe (III), el cual precipita más tarde como óxidos e hidróxidos. Estas formas de Fe son muy estables debido a su baja solubilidad. Así, el contenido de Fe soluble en el suelo es menor que el contenido de Fe total.

Hay una deficiencia de Fe en plantas cultivadas en suelos calizos debido a que los niveles de Fe inorgánico son muy bajos. En los suelos ácidos hay una mayor concentración de este elemento.

Hay una serie de propiedades del suelo que inciden en la clorosis férrica y son:

- Propiedades de los carbonatos. La clorosis férrica se observa fundamentalmente en suelos calizos, puesto que el pH está tamponado entre 7.5 y 8.5 (Lindsay y Schwab 1982), así como el alto contenido de bicarbonato (Romera et al. 1992).
- Propiedades de las formas de Fe. Se ha observado que la fuente de Fe para las plantas en suelos calcáreos son los óxidos de Fe no cristalinos extraíbles con oxalato amónico ácido (Loeppert et al. 1988; del Campillo y Torrent 1992; Sánchez-Alcalá et al. 2013).
- Materia orgánica. A veces, las aplicaciones de materia orgánica al suelo reducen la severidad de la clorosis (Chen et al. 1982; Matocha 1984). La materia orgánica es un buen agente quelante del Fe (III) (Schnitzer y Khan 1972; Bloom 1981) y puede estabilizar los compuestos de Fe más solubles,

al reducir la transformación a formas más estables y, por tanto, menos solubles (Loeppert y Hallmark 1985).

- Arcilla. Por término medio, un 2% del peso de las arcillas lo constituye el Fe estructural (Carson et al. 1976).
- Volumen de raíces y edad de la planta. A mayor volumen, mayor liberación de compuestos por exudación y, así, se mejora la respuesta de la planta en situaciones de deficiencia de Fe. Las cepas más jóvenes son más sensibles a la clorosis férrica.
- Interacciones con otros elementos. El manganeso (Mn) puede competir con el Fe en la absorción, ya sea a nivel radicular o en la síntesis de clorofila (Nason y McElroy 1963). El fósforo del suelo puede agravar la clorosis férrica porque se adsorbe fácilmente sobre la superficie de los óxidos de Fe y reduce la solubilidad de los mismos; además, podría inhibir los mecanismos de respuesta que la planta tiene para defenderse de la deficiencia de este elemento (Chaney y Coulombe 1982; Inskeep y Bloom 1986).
- Temperaturas extremas. Bajas temperaturas en la zona radicular pueden producir clorosis férrica en algunas especies. La temperatura puede estar relacionada con la deficiencia de Fe en las plantas, debido a que cuando la temperatura es baja, el crecimiento de las raíces y la actividad radicular son más lentas, pudiéndose provocar así una disminución en la absorción de Fe. Por el contrario, cuando son bastante altas, el crecimiento de la planta es relativamente más rápido y necesita mayor absorción de Fe.

1.3. Clorosis férrica

1.3.1. Causas

La clorosis férrica raramente está causada por una deficiencia “absoluta” de Fe, que no es habitual en los suelos calcáreos. El contenido total de Fe en el suelo se encuentra generalmente en el intervalo de 10-50 g kg⁻¹, concentración más que suficiente para satisfacer las necesidades de la mayoría de cultivos agrícolas (Lindsay 1974). Por tanto, el problema no es de deficiencia de Fe en el suelo, sino de disponibilidad para la planta. La baja disponibilidad de Fe en suelos calcáreos ha sido atribuida a la disminución de la solubilidad del Fe en suelos con pH alcalino (Miller et al. 1984; Mengel 1994).

La composición de la disolución del suelo influye en la aparición de la clorosis. Uno de los componentes principales es el anión bicarbonato (HCO₃⁻). Diversos investigadores han observado que el grado de clorosis aumenta con la concentración de HCO₃⁻ (Boxma 1972; Inskip y Bloom 1984; Mengel et al. 1984; Clements 1990; Romera et al. 1992) y cuando se riega con aguas que tienen altos contenidos de HCO₃⁻. La concentración en el suelo de este último componente está controlada por el carbonato cálcico (CaCO₃) del suelo y por la presión parcial de CO₂.

1.3.2. Corrección

Los métodos actualmente utilizados para remediar la deficiencia de Fe se basan en incrementar la cantidad de Fe soluble en el suelo o añadir este elemento a la planta.

Los métodos encaminados para corregir la clorosis férrica consisten en la aplicación de:

- Compuestos orgánicos:
 - Quelatos de hierro: los más utilizados son FeEDTA (ácido

etildiamintetraacético), su forma hidratada (FeDTPA) y acetato etilendiamindihidroxifenilacético (FeEDDHA). El problema de los quelatos de Fe es que tienen un elevado coste y, aunque su acción es rápida y eficaz, su efecto es temporal, teniendo que realizarse varias aplicaciones al año.

- Sustancias húmicas: existen evidencias del incremento en la disponibilidad de Fe debido a la presencia de compuestos orgánicos en el suelo (de Santiago y Delgado 2007).
- Compuestos inorgánicos:
 - Sulfato ferroso: es uno de los tratamientos más empleados para prevenir la clorosis férrica gracias a su bajo coste aunque con escasa eficacia (Tagliavini y Rombolà 2001) cuando se aplica superficialmente.
 - Vivianita (fosfato ferroso) y Siderita (carbonato ferroso): desarrollado en la Unidad de Edafología de la Universidad de Córdoba (Grupo de Investigación AGR-165). Son productos alternativos de bajo coste y capaces de liberar el Fe lentamente para satisfacer las necesidades de la planta. Se ha observado que la vivianita ha sido eficaz y persistente durante 3-5 años en olivar (Rosado et al. 2002) y, al menos, 3 años en viña. La siderita también ha corregido la clorosis férrica en olivar durante 3 años (Sánchez-Alcalá 2012).

Objetivo

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto del biocarbón sobre la disponibilidad de Fe en un suelo calcáreo altamente inductor de clorosis férrica.

2. Materiales y métodos

2.1. Suelo

El suelo que se utilizó en esta experiencia se tomó de la capa arable de una finca dedicada al cultivo de la vid y situada en el término municipal de "La Palma del Condado" (Huelva, Latitud 37°21'48'' N y Longitud 6°31'29'' O). La textura de este suelo es franco-arenosa (71,0% arena, 16,5% limo y 12,5% arcilla), una capacidad de intercambio catiónica de 7,3 cmol⁽⁺⁾ kg⁻¹ y capacidad de campo del 22%. El contenido en carbonato cálcico es del 30%, el pH (1:2:5) de 8,7, el contenido en carbono orgánico total del 0,3%, el contenido total de óxidos de Fe (Fe_d) es 2,5 g kg⁻¹ y la conductividad eléctrica (1:5) de 87 μS cm⁻¹. Este suelo fue seleccionado debido a que mostró ser inductor de deficiencia de Fe en garbanzo y cacahuete (Sánchez-Alcalá 2012), ya que el contenido de óxidos de Fe no cristalinos era bajo (0,2 g Fe kg⁻¹ extraíble con oxalato-amónico, y 0,4 g Fe kg⁻¹ extraíble con citrato/ascorbato). Además, el Fe extraíble con DTPA (1,8 mg kg⁻¹) también se encontraba por debajo del nivel crítico (4,5 mg kg⁻¹) establecido por Lindsay y Norvell (1978).

2.2. Biocarbón

Se evaluaron dos tipos de biocarbón: uno producido con poda de olivo (BPO) y otro producido a partir de astilla de pino (BAP). Los dos tipos se prepararon industrialmente a una temperatura de 450°C y un tiempo de residencia del material en el interior del reactor de 15 minutos, en una planta de pirólisis a escala piloto con una capacidad de procesamiento de 10-15 kg h⁻¹. Los biocarbones producidos se molieron (<2mm), homogeneizaron y posteriormente se mezclaron con el suelo para conseguir una dosis de aplicación del 2% (expresada en porcentaje sobre peso seco). Las características de ambos se incluyen en la Tabla 1.

El pH y la conductividad eléctrica (CE) de las muestras de biocarbón se determinaron

en el extracto acuoso 1:10 (p/v), después de agitar mecánicamente durante 2 horas la mezcla. El pH se midió en el líquido sobrenadante en un pH-metro con electrodo de vidrio y la CE con un puente de conductividad, después de centrifugar y filtrar. Los resultados de CE se expresaron en $\mu\text{S cm}^{-1}$ a 25°C. La basicidad o alcalinidad (capacidad ácido neutralizante), expresada en equivalentes de carbonato cálcico, se determinó de acuerdo con la técnica descrita por el TMECC (2002). Se consideró como materia orgánica la disminución de peso por calcinación a 550°C durante 24 horas de la muestra previamente secada (TMECC 2002). El carbono orgánico total y el nitrógeno total se determinaron empleando un analizador elemental (EuroVector), previa destrucción de los carbonatos con ácido clorhídrico (HCl) diluido. La capacidad de campo (agua retenida en un suelo después de 48 horas de un riego o lluvia abundante) se determinó colocando el suelo en embudos de 10 cm de forma cilíndrica, añadiendo agua sin llegar al borde inferior y determinando el porcentaje de agua retenida a las 48 horas. Las muestras de biocarbón fueron digeridas por vía seca (calcinación) y las cenizas obtenidas disueltas con HCl 1:1 (TMECC 2002). Posteriormente, el potasio se determinó por fotometría de llama (JENWAY PFP7), mientras que el calcio, magnesio, hierro, manganeso, cinc y cobre mediante espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer AAnalyst 200 AAS) y el fósforo por colorimetría mediante la reducción del complejo fosfomolibdato de amonio con ácido ascórbico (Watanabe y Olsen 1965). La CIC se determinó mediante una modificación del método de acetato de amonio (Gaskin et al. 2008).

Tabla 1. Características principales de los biocarbones utilizados.

VARIABLE	BIOCARBÓN PODA DE OLIVO	BIOCARBÓN ASTILLA DE PINO
Carbono orgánico total (%)	75,72	83,71
Materia orgánica (%)	90,03	98,19
Capacidad de intercambio catiónico (cmol kg ⁻¹)	36,6	12,6
Equivalente en carbonato (%)	8	0,7
pH	9,34	7,52
Conductividad eléctrica (μS cm ⁻¹)	2430	256
Nitrógeno total (%)	1,10	0,36
P (mg kg ⁻¹)	1464	148
K (mg kg ⁻¹)	9159	1708
Ca (mg kg ⁻¹)	28525	3316
Mg (mg kg ⁻¹)	2088	574
Fe (mg kg ⁻¹)	496	200
Mn (mg kg ⁻¹)	50	153
Cu (mg kg ⁻¹)	114	134
Zn (mg kg ⁻¹)	24	107

Como se observa en la tabla, ambos biocarbones mostraron propiedades bien contrastadas. Así, BPO es más alcalino que BAP; la CIC, CE y la concentración de algunos nutrientes también es más elevada en BPO en comparación con BAP.

2.3. Experimento de crecimiento en cámara de cultivo

El experimento de crecimiento en cámara de cultivo se puso en marcha el día 3 de Abril de 2013, usando como especie a cultivar el altramuz (*Lupinus albus* L.) por su especial sensibilidad a la deficiencia de Fe (del Campillo et al. 1994). A lo largo del experimento las condiciones de la cámara fueron: temperatura de $27,4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa del $60,8 \pm 2,8\%$ (día) y temperatura de $20,9 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa del $77,2 \pm 2,4\%$ (noche), fijando un periodo día/noche de 16/8 horas.

Se emplearon macetas con una capacidad de 240 g de suelo (previamente tamizado a

2mm) o mezcla suelo-biocarbón. Las semillas de altramuz se colocaron en placas de petri con papel húmedo en cámara a 25°C y oscuridad durante 3 días previos a la plantación, para estimular su germinación. Posteriormente, se sembraron 2 semillas por maceta y una vez germinadas se eliminó una de ellas. Las macetas se colocaron sobre una mesa, distribuidas en cinco bandejas (Figura 2) y cada dos días se procedía a la rotación de estas bandejas para evitar la influencia de la variabilidad microclimática.



Figura 2. Aspecto de las 5 bandejas de macetas en la cámara de cultivo.

Se realizó un diseño factorial (Tabla 2) con 2 tipos de biocarbón y dos fuentes de Fe, con 5 repeticiones por tratamiento. Las fuentes de Fe ensayadas fueron: una inorgánica en forma de sulfato ferroso (SUL) y otra orgánica en forma de quelato (FE-EDDHA, ED), ambas utilizadas en la práctica agrícola. Estas se combinaron con los dos tipos de biocarbón ensayados: BPO y BAP, manteniendo tratamientos control (sin Fe).

Tabla 2. Diseño factorial.

TRATAMIENTO	SUELO	BIOCARBON		QUELATO DE HIERRO	SULFATO FERROSO
		BPO	BAP		
S	X				
S+ED	X			X	
S+BPO	X	X			
S+BAP	X		X		
S+SUL	X				X
S+BPO+ED	X	X		X	
S+BAP+ED	X		X	X	
S+BPO+SUL	X	X			X
S+BAP+SUL	X		X		X

Inicialmente, la humedad del suelo se ajustó hasta alcanzar el 75% de la capacidad de campo del suelo y ésta se mantuvo durante el ciclo de cultivo con riegos diarios, registrando además el peso de cada maceta para obtener la evapotranspiración total del cultivo a lo largo del experimento. Esta variable se calculó como la suma de la pérdida de agua por maceta (debidas a evaporación y transpiración de las plantas). Además, a lo largo del ciclo de cultivo se realizaron estimaciones periódicas de clorofila mediante SPAD (Minolta SPAD-502).

Durante el ciclo de cultivo, se aplicó una fertilización mineral a todos los tratamientos con el objetivo de mantener el resto de nutrientes en el rango óptimo, suministrando un total de 25 ml (fraccionados mediante aplicaciones semanales) de una solución nutritiva Hoagland completa (sin Fe). La aplicación del Fe-EDDHA también se fraccionó durante el ciclo de cultivo, suministrando un total de 10 ml de una disolución 25 mM. La aplicación del sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) se efectuó sobre el suelo seco (con la ayuda de un pulverizador para asegurar un reparto homogéneo hasta alcanzar una dosis de aplicación de $0,3 \text{ g Fe kg}^{-1}$ suelo). Las dosis aplicadas de las distintas formas de Fe (ED y SUL), la fertilización mineral y los biocarbones se basaron en experiencias previas realizadas con altramuz.

Al final del experimento se determinó el contenido de clorofila con el objetivo de validar las medidas de SPAD en laboratorio. Para ello se colocó una porción de hoja (peso y área conocida) en etanol durante 24 h en oscuridad. En el extracto obtenido se midieron la clorofila a y b a 663 y 645 nm, respectivamente, con un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 3. El contenido total de clorofila se expresó en $\mu\text{g cm}^{-2}$ según el método descrito por Wintermans y de Mots (1965).

La cosecha del cultivo se realizó el 24 de Abril de 2013. En la cosecha de la parte aérea, las plantas se separaron en hojas y tallo, y se obtuvo el peso fresco por maceta. Se escanearon todas las hojas para calcular el área foliar. Posteriormente, las muestras de tallos y hojas se colocaron en sobres individuales y se llevaron a una estufa donde se secaron a 70°C durante una semana, para así obtener el peso seco y poder determinar después el área foliar específica (calculada como la relación área/peso hoja).

Por último, la determinación del hierro disponible en el suelo se evaluó mediante una extracción con DTPA (ácido dietilentriaminpentacético) según el método de Lindsay y Norvell (1978) mediante espectrofotometría de absorción atómica (Perkin Elmer AAnalyst 200 AAS).

2.4. Análisis estadístico

Los resultados quedan expuestos como valores medios de las réplicas \pm desviación estándar correspondientes a cada tratamiento. Mediante un análisis de la varianza de dos factores (TIPO DE BIOCARBÓN Y FUENTE DE Fe) se analizaron los datos. Para la realización de los análisis estadísticos se utilizó el programa STATISTICA™ (versión 8, StatSoft™).

3. Resultados y Discusión

El estudio estadístico de las variables evaluadas durante el experimento mostró los siguientes resultados (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de los resultados ANOVA para las distintas variables. SLA: área foliar específica, CE: conductividad eléctrica, +: aumento, -: disminución, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, NS: no significativo.

VARIABLE		FUENTE DE HIERRO (Fe)	BIOCARBON (B)	Fe×B
EVAPOTRANSPIRACION		+*	NS	NS
VARIABLES FOLIARES	SLA	_-***	NS	NS
	CLOROFILA	+***	+***	***
	AREA FOLIAR	+*	+***	**
	Nº HOJAS	NS	NS	NS
PESO SECO	HOJA	+***	+***	NS
	TALLO	+***	NS	NS
	PARTE AEREA	+***	+***	NS
OTRAS VARIABLES	pH	_-***	_-**	*
	CE	+***	NS	***
	Fe-DTPA	+***	_*	*

3.1. Efecto de la fertilización con hierro

La adición al suelo de fuentes de Fe, tanto en forma de quelato (ED) como de sulfato (SUL), provocaron un aumento de la evapotranspiración, de la biomasa de la parte aérea (Figura 3.1), del peso seco de hoja (Figura 3.2) y tallo, del contenido de clorofila en hoja (Figura 3.3) y del área foliar (Figura 3.4). Por el contrario, disminuyó el área foliar específica (SLA, Figura 3.5).

El aumento observado con la adición de Fe del peso seco de la parte aérea (biomasa de la planta, sólo se indica la parte aérea pero debemos suponer que en la raíz ocurre igual) y de la evapotranspiración, debe de relacionarse con un mejor desarrollo y crecimiento de la planta al corregir la deficiencia de Fe del suelo sin enmendar. Cabe recordar que el Fe participa en la síntesis de clorofila, por lo que la deficiencia de este elemento en la planta se manifiesta con el síntoma conocido como clorosis férrica (donde la planta presenta una amarillez, que comienza en las hojas nuevas), tal y como se presenta en la Figura 4, limitando el desarrollo del cultivo. Además, se observó un aumento del área foliar y de la biomasa de la planta con la adición de Fe, siendo evidencias de que la productividad aumentó.



Figura 4. Clorosis férrica en altramuz.

La adición de Fe provocó que las hojas tuvieran una menor área foliar específica (SLA, Figura 3.5), determinado principalmente por una mayor densidad de las hojas (mayor contenido de materia seca) y mayor grosor de la hoja. Este incremento en el grosor y la densidad del tejido foliar puede ser debido a un aumento en el parénquima en empalizada (Hamilton et al. 1991), ya que este tejido se compone de células muy empaquetadas y presenta una relación positiva con la densidad y grosor de la hoja

(Villar et al. 2013). Este incremento en parénquima en empalizada estaría asociado al aumento en concentración de clorofila observado en nuestro estudio, y con la tasa de fotosíntesis y el crecimiento de la planta.

No existen muchos trabajos que evalúen la influencia del Fe sobre SLA y sus componentes. En la revisión de Poorter et al. (2009) sobre los factores que afectan a SLA, se concluye que una disminución fuerte de nutrientes está relacionada con una disminución de SLA, que sería lo contrario a lo que se ha encontrado en nuestro estudio. Sin embargo, es de destacar que la mayoría de los estudios realizados se centran en la limitación de N y P y, por tanto, los resultados del efecto de la limitación de nutrientes sobre SLA, puede diferir dependiendo del tipo de nutriente. Es importante señalar que en la revisión de Poorter et al. (2009) se comenta también que el efecto de los nutrientes sobre SLA es principalmente a través de un cambio en la densidad de los tejidos, como de hecho aparece en nuestro estudio. En los pocos trabajos sobre este tema, destaca el estudio de Göransson (1993) sobre los efectos de la limitación de Fe sobre el crecimiento y sus componentes en plántulas de abedul (*Betula pendul, R.*). En su trabajo, concluye que la limitación de Fe, hace crecer a las plantas a una menor velocidad y tiene el efecto de aumentar el SLA, por lo tanto, al añadir Fe al suelo, el SLA disminuye tal y como hemos visto en nuestro estudio.

Respecto a las propiedades del suelo evaluadas, la adición de SUL provocó un ligero descenso del pH del suelo (Figura 3.6) y un aumento significativo de la CE (Figura 3.7) debido a la naturaleza de dicho fertilizante; así como un aumento del Fe disponible para la planta (Figura 3.8). La acidificación del suelo es algo favorable debido a que las formas oxidadas de Fe en suelos calcáreos son poco solubles a pH elevado, causando la no disponibilidad de este elemento.

El contenido de Fe, determinado mediante DTPA, sufrió un gran aumento cuando se añadió SUL al suelo, encontrándose valores próximos a 16 mg kg^{-1} , siendo éstos del orden de unas ocho veces mayor con respecto al suelo control y al suelo con ED.

3.2. Efecto de la adición de biocarbón

Con la adición de biocarbón aumentó el peso de la parte aérea y de la hoja, especialmente con BPO (Figuras 3.1 y 3.2). Por otro lado, la adición de BPO también provocó un aumento significativo de la estimación del contenido de clorofila en hoja (unidades SPAD) respecto al control, aunque el BAP no lo hizo (Figura 3.3) y también aumentó el área foliar (Figura 3.4). El aumento en estas dos últimas variables se vio reforzado cuando se combinó biocarbón con fuentes de Fe.

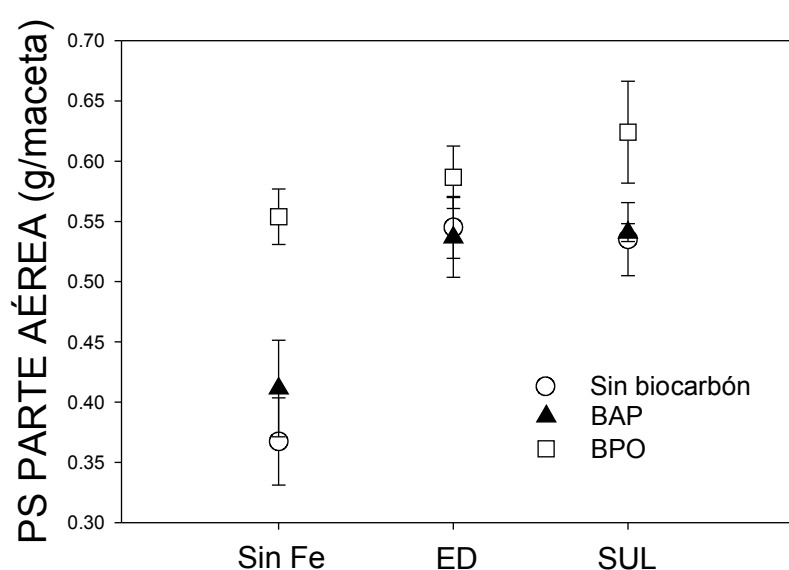


Figura 3.1. Peso seco (valor medio \pm error estándar) de la parte aérea de las plantas cultivadas en los suelos control (sin Fe), BPO y BAP; en el suelo fertilizado con Fe-EDDHA (ED), en su combinación con los biocarbones (BPO+ED, BAP+ED); y en el suelo con sulfato ferroso (SUL), en su combinación con los biocarbones (BPO+SUL, BAP+SUL).

El aumento observado con la adición de BPO del peso seco total de la parte aérea (Figura 3.1) y del peso seco de hoja (Figura 3.2) puede indicar que la planta invierte más energía en producir hojas, sin olvidar que la parte aérea del altramuz está compuesta en su mayoría por hojas (Figura 5).

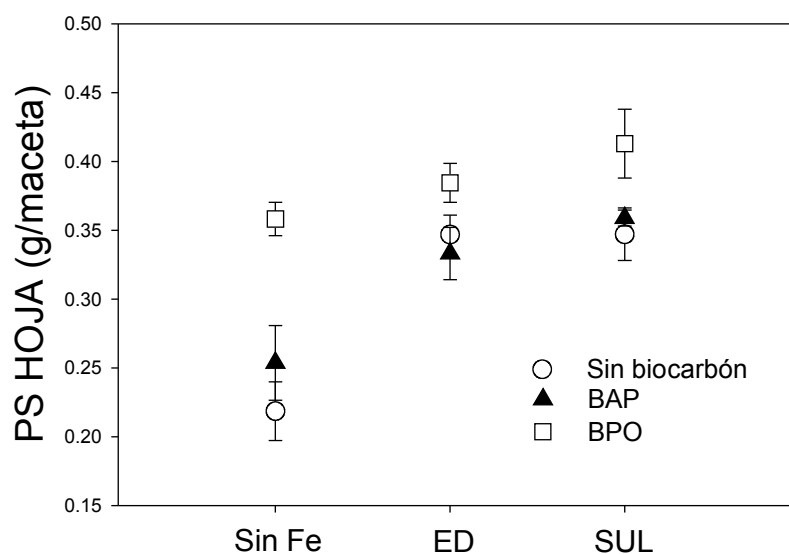


Figura 3.2. Peso seco (valor medio \pm error estándar) de las hojas de las plantas cultivadas en los suelos control (sin Fe), BPO y BAP; en el suelo fertilizado con Fe-EDDHA (ED), en su combinación con los biocarbones (BPO+ED, BAP+ED); y en el suelo con sulfato ferroso (SUL), en su combinación con los biocarbones (BPO+SUL, BAP+SUL).



Figura 5. Plantas de altramuz con BPO Y SUL el día de la cosecha del cultivo.

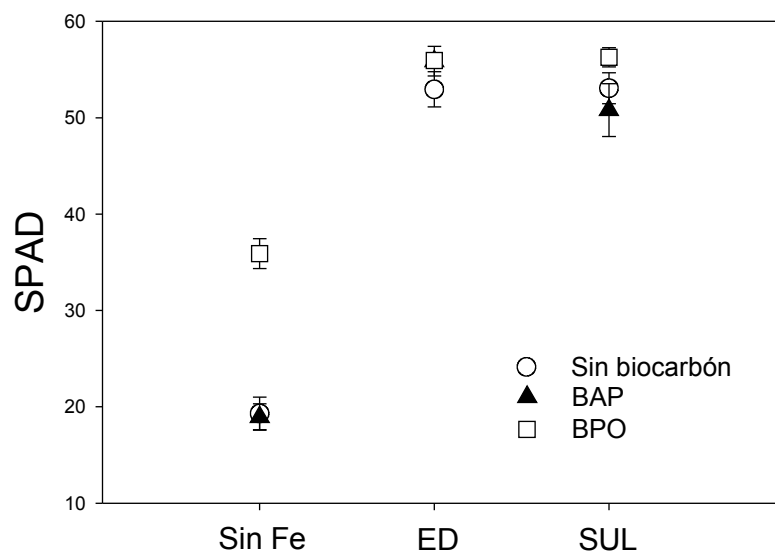


Figura 3.3. Estimación de la clorofila de las hojas (unidades SPAD) (valor medio \pm error estándar) de las plantas cultivadas en los suelos control (sin Fe), BPO y BAP; en el suelo fertilizado con Fe-EDDHA (ED), en su combinación con los biocarbones (BPO+ED, BAP+ED); y en el suelo con sulfato ferroso (SUL), en su combinación con los biocarbones (BPO+SUL, BAP+SUL).

En cuanto a la estimación del contenido de clorofila en hoja, la Figura 3.3 muestra que la enmienda del suelo con BPO produjo un aumento del valor del SPAD, que era intermedio entre el control y los fertilizantes de Fe (ED o SUL). La combinación de BPO con cualquiera de las dos fuentes de Fe estudiadas incrementó ligeramente los valores SPAD obtenidos en las plantas fertilizadas con Fe.

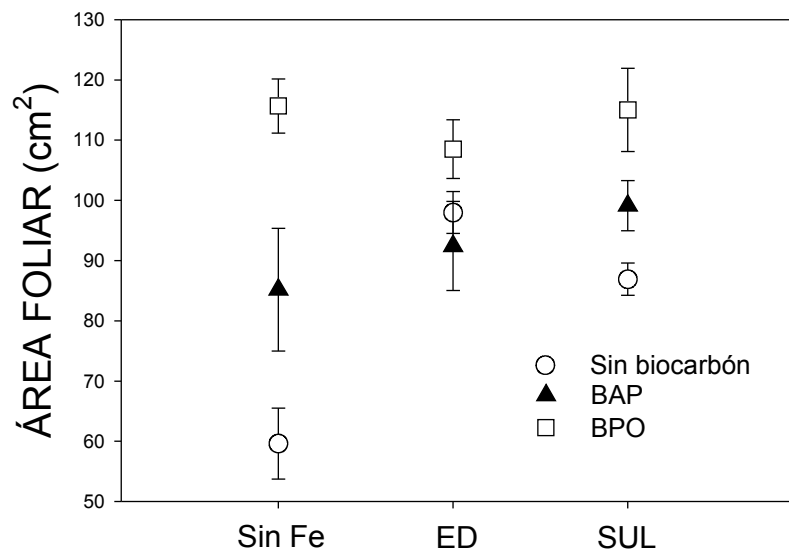


Figura 3.4. Área foliar (valor medio \pm error estándar) de las plantas cultivadas en los suelos control (sin Fe), BPO y BAP; en el suelo fertilizado con Fe-EDDHA (ED), en su combinación con los biocarbones (BPO+ED, BAP+ED); y en el suelo con sulfato ferroso (SUL), en su combinación con los biocarbones (BPO+SUL, BAP+SUL).

Con respecto al área foliar (Figura 3.4), se observó que con la aplicación de BPO y BAP al suelo aumentaron significativamente los valores de área foliar respecto al control, de tal forma que se pueden ordenar ($B0 < BAP < BPO$). La mezcla de BPO y las fuentes de Fe (ED y SUL) aumentaron el área foliar respecto a los sustratos que solamente recibieron ED o SUL. Sin embargo, la mezcla de BAP sólo produjo mayor área foliar cuando se mezcló con la fuente de hierro SUL.

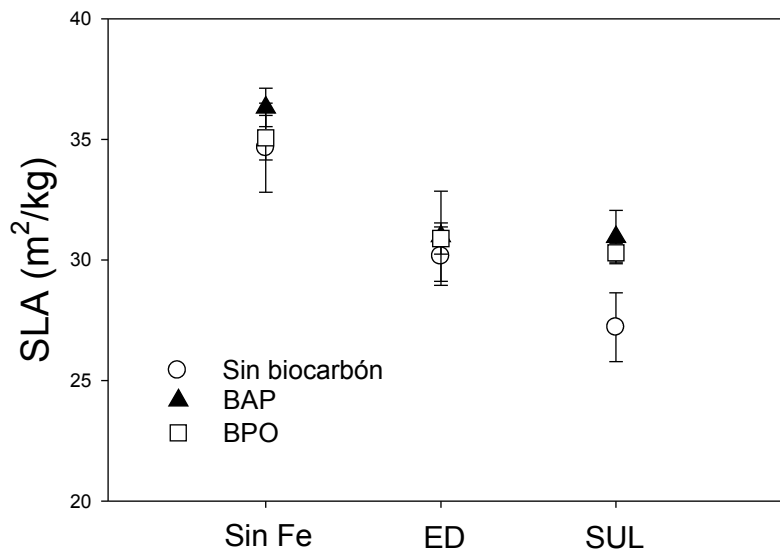


Figura 3.5. Área foliar específica (SLA, valor medio \pm error estándar) de las plantas cultivadas en los suelos control (sin Fe), BPO y BAP; en el suelo fertilizado con Fe-EDDHA (ED), en su combinación con los biocarbones (BPO+ED, BAP+ED); y en el suelo con sulfato ferroso (SUL), en su combinación con los biocarbones (BPO+SUL, BAP+SUL).

El área foliar específica disminuyó al aumentar la disponibilidad de Fe en suelo (ED y SUL) o su combinación con los biocarbones (Figura 3.5). Sin embargo, el efecto de los biocarbones sobre SLA no fue tan significativo como el observado sobre el área foliar. Únicamente cuando los biocarbones se combinaron con SUL, el SLA aumentó respecto a las plantas cultivadas en el suelo fertilizado solamente con SUL.

Los aumentos observados en el área foliar y en los pesos secos de hoja y biomasa aérea indican un efecto beneficioso de la adición de biocarbón sobre el cultivo de altramuz. En las condiciones ensayadas de deficiencia de Fe, los biocarbones (especialmente BPO) aumentaron el contenido de clorofila en hoja. Sin embargo, este aumento fue por lo general inferior al producido por la adición de Fe (ED y SUL).

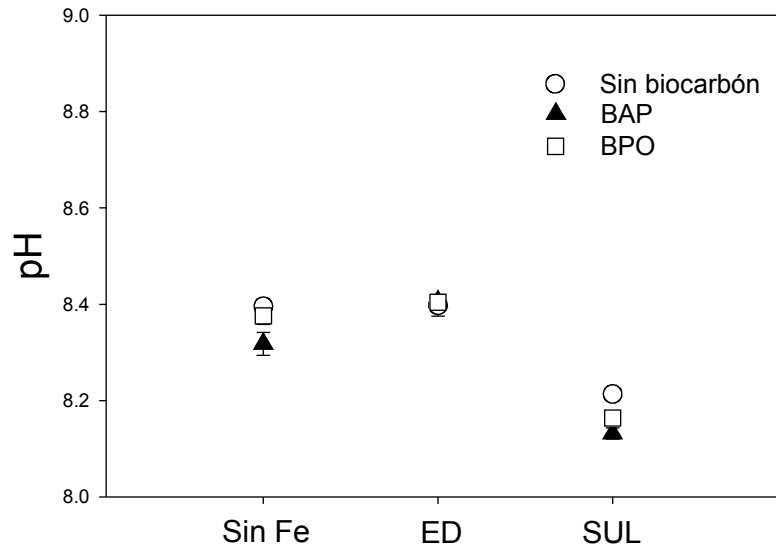


Figura 3.6. Valores de pH (valor medio \pm error estándar) en los suelos control (sin Fe), BPO y BAP; en el suelo fertilizado con Fe-EDDHA (ED), en su combinación con los biocarbones (BPO+ED, BAP+ED); y en el suelo con sulfato ferroso (SUL), en su combinación con los biocarbones (BPO+SUL, BAP+SUL).

La sola adición de BAP disminuyó ligeramente el pH del suelo, aunque no se observaron diferencias significativas entre el suelo con la adición de BPO y el suelo control (Figura 3.6). Cuando se combinó BAP con SUL la disminución del pH fue más pronunciada. Cabe recordar que la adición al suelo de SUL, por sí misma, disminuye el pH.

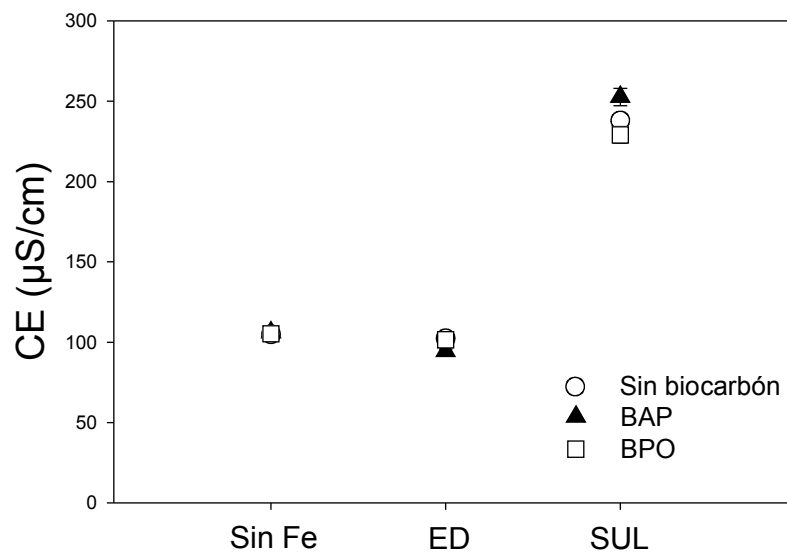


Figura 3.7. Conductividad eléctrica (valor medio \pm error estándar) en las muestras de suelo control (sin Fe), BPO y BAP; en el suelo fertilizado con Fe-EDDHA (ED), en su combinación con los biocarbones (BPO+ED, BAP+ED); y en el suelo con sulfato ferroso (SUL), en su combinación con los biocarbones (BPO+SUL, BAP+SUL).

La aplicación de biocarbón al suelo no influyó de forma significativa en la CE (Figura 3.7). Así, la combinación de BAP con ED produjo una disminución de la CE, mientras que BAP con SUL la aumentó (en ambos casos de forma ligera).

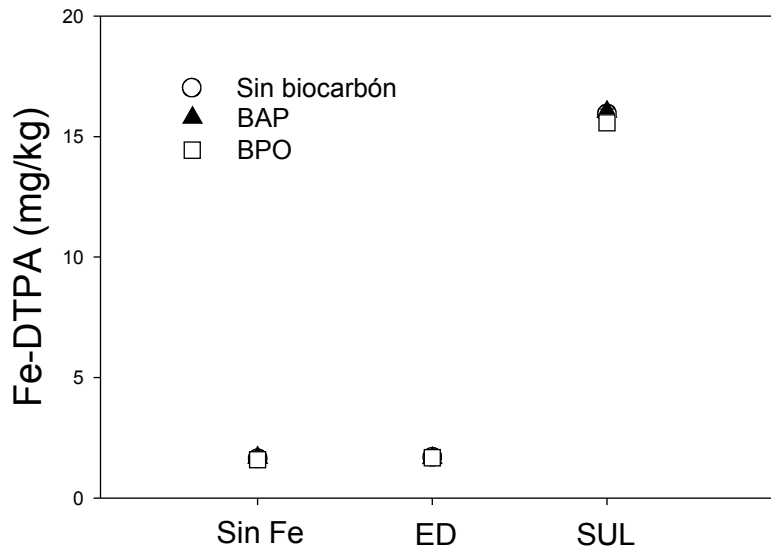


Figura 3.8. Cantidad de Fe disponible (valor medio \pm error estándar) en los suelos control (sin Fe), BPO, BAP; en el suelo fertilizado con Fe-EDDHA (ED), en su combinación con los biocarbonos (BPO+ED, BAP+ED); y en el suelo con sulfato ferroso (SUL), en su combinación con los biocarbonos (BPO+SUL, BAP+SUL).

Al igual que se expuso anteriormente, los valores más altos de Fe disponible del suelo se observaron con la adición de SUL. La sola adición de biocarbón o su combinación con fuentes de Fe no ejerció efectos significativos sobre el contenido de Fe asimilable por la planta, medido como Fe extraíble en DTPA (Figura 3.8).

Es bien conocido que la adición de biocarbón disminuye la densidad aparente del suelo y aumenta la capacidad de retención de agua, aspectos que pueden mejorar la producción (Shackley y Sohi 2010; Sohi et al. 2010; Karhu et al. 2011). Con carácter general, no se debe olvidar que el aumento en producción no tiene porqué ser consecuencia directa de un aumento en el contenido de nutrientes en el suelo, sino de

un aumento en la disponibilidad de estos para la planta (Lehmann et al. 2003; Sohi et al. 2009; Hossain et al. 2010).

Comparando los biocarbones entre sí, el biocarbón que proporcionó un aumento en la producción del cultivo fue BPO, que ocasionó aumentos en variables de crecimiento y en el área foliar. Es importante recordar que BPO presenta un contenido más alto en macronutrientes que BAP (ver tabla 1 del apartado 2.2). Además, BPO tiene mayor CIC que BAP, lo que favorece la retención de nutrientes.

La adición de las fuentes de Fe ensayadas tiene ciertos inconvenientes. En el caso de ED, el efecto es temporal, tiene un alto coste de aplicación y la necesidad de ser aplicado varias veces a lo largo del cultivo. En el caso de SUL el coste no es tan alto pero la eficacia disminuye al ser aplicado en superficie.

En condiciones de deficiencia de Fe en el suelo, la adición de biocarbón puede aportar beneficios extra al uso de fertilizantes de Fe e incluso reducir la cantidad empleada. El biocarbón sólo requiere de una aplicación, ya que tiene una extraordinaria persistencia en el suelo. Además, otra ventaja es la mejora de la fertilidad del suelo, así como la mitigación de efectos del cambio climático y reducción de emisiones de gases de efecto invernadero.

4. Conclusión

La adición de BPO al suelo aumentó algunas de las variables medidas de producción en altramuz (peso seco parte aérea, hoja y SPAD) con respecto al control o la aplicación de BAP.

Las fuentes de Fe (ED y SUL) también mejoraron estas variables, proporcionando Fe asimilable para la planta y corrigiendo la deficiencia de este micronutriente.

El biocarbón por sí solo no fue capaz de corregir por completo la severa deficiencia de Fe mostrada en el suelo ensayado. Sin embargo, la adición de BPO logró paliar en gran medida su efecto depresor sobre el crecimiento de altramuz. Además, la combinación de este biocarbón con ED o SUL provocó un rendimiento superior (evaluado en peso seco de biomasa aérea) a la sola aplicación de Fe.

5. Bibliografía

Amonette, J. E. y Joseph, S. (2009). Characteristics of biochar: microchemical properties *Earthscan*. 33–52.

Asai, H., Samson, B. K., Haefele, S. M., Songyikhangs, K., Homma, K., Kiyono, Y., Inoue, Y., Shiraiwa, T. y Horie, T. (2009). Biochar amendment techniques for upland rice production in Northern Laos. 1. Soil physical properties, leaf SPAD and grain yield. *Field Crops Research*. 111, 81–84.

Atkinson, C. J., Fitzgerald, J. D. y Higgs, N. A. (2010). Potential mechanisms for achieving agricultural benefits from biochar application to temperate soils: a review. *Plant Soil*. 337, 1-18.

Bloom, P. R. (1981). Metal organic matter interactions in soil. *Chemistry in the soil environment*. 44, 129-150.

Boxma, R. (1972). Bicarbonate as the most important soil factor in lime induced chlorosis in the Netherlands. *Plant Sci*. 27, 233-234.

Carson, C. D., Kittrick, J. A., Dixon, J. B. y McKee, T. R. (1976). Comparison of iron and aluminium hydroxy interlayers in montmorillonite and vermiculite. *Soil Sci. Soc. Am.*

Proc. 34, 517-526.

Chan, K. Y., Zwieten, L. V., Meszaros, I., Downie, A. y Joseph, S. (2007). Agronomic values of greenwaste biochar as a soil amendment. *Australian Journal of Soil Research*. 45, 629-634.

Chaney, R. L. y Coulombe, B. A. (1982). Effect of phosphate on regulation of Fe-stress-response in soybean and peanut. *J.Plant Nutr.* 5, 469-487.

Chen, Y., Navrot, J. y Barak, P. (1982). Remedy of lime induced chlorosis with iron enriched muck. *J.Plant Nutr.* 5, 297-940.

Clements, G. (1990). Charakterisierung und Melioration von Chlorosestandorten. *Ph.D. Thesis. University of Hohenheim*. 105.

de Santiago, A., Delgado, A. (2007). Effects of humic substances on iron nutrition of lupin. *Biol Fertil Soils*. 43, 829–836.

del Campillo, M. C., Torrent, J. (1992a). Predicting the incidence of iron chlorosis in calcareous soils of southern Spain. *Comm. Soil Scil. And Plant Anal.* 23, 399.

del Campillo, M. C., Barrón, V. y Torrent, J. (1994). Prevención de la clorosis férrica: el uso de diversos fosfatos de hierro. *Hortofruticultura*. 3, 63-66.

Gaskin, J. W., Speir, R. A., Harris, K., Das, K. C., Lee, R. D., Morris, L. A. y Fisher, D. S. (2010). Effect of peanut hull and pine chip biochar on soil nutrients, corn nutrient status, and yield. *Agronomy Journal* .102(2), 623-633.

Gaskin, J. W., Steiner, C., Harris, K. y Bibens, B. (2008). Effect of low-temperature pyrolysis conditions on biochar for agricultural use. *Asabe*. 51, 2061–2069.

Göransson, A. (1993). Growth and nutrition of small *Betula pendula* plants at different relative addition rates of iron. *Trees*. 8, 31-38.

Hamilton, P., Franklin, R. y Eichhorn, S. (1991). Biology of plants (fourth edition). *INC New York*.

Hoshi, T. (2001). Growth promotion of tea trees by putting bamboo charcoal in soil. *Proceedings of 2001 International Conference on O-cha (Tea) Culture and Science, Tokyo, Japan*.

Hossain, M. K., Strezov, V., Chan, K. Y. y Nelson, P. F. (2010). Agronomic properties of wastewater sludge biochar and bioavailability of metals in production of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere*. 78, 1167-1171.

Inskeep, W. P. y Bloom, P. R. (1984). A comparative study of soil solution chemistry associated with chlorotic and nonchlorotic soybeans in Western Minnesota. *J. Plant Nutr.* 7, 513-531.

Inskeep, W. P. y Bloom, P. R. (1986). Effects of soil moisture on pCO₂, soil solution bicarbonate, and iron chlorosis in soybeans. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 50, 946-952.

Iswaran, V., Jauhri, K. S. y Sen, A. (1980). Effect of charcoal, coal and peat on the yield of moog, soybean and pean. *Soil Biology and Biochemistry*. 12, 191-192.

Karhu, K., Mattila, T., Bergström, I. y Reginac, K. (2011). Biochar addition to agricultural soil increased CH₄ uptake and water holding capacity – Results from a short-term pilot field study. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 140, 309-313.

Lehmann, J. (2007). Bio-energy in the black. *Front Ecol Environ*. 5(7), 381-387.

Lehmann, J. y Joseph, S. (2009). Biochar for environmental management: Science and technology. *Earthscan*.

Lehmann, J. y Rondon, M. (2006). Bio-char soil management on highly weathered soils in the humid tropics. *Biological Approaches to Sustainable Soil Systems*. N. Uphoff, A. S. Ball, C. Palmet al. Boca Raton, FL, CRC Press. 517-530.

Lehmann, J., da Silva, J. P., Steiner, C., Nehls, T., Zech, W. y Glaser, B. (2003). Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. *Plant Soil*. 249, 343-357.

Liang, B., Lehmann, J., Solomon, D., Kinyangi, J., Grossman, J., O'Neill, B., Skjemstad, J. O., Thies, J., Luizao, F. J., Peterson, J. y Neves, E. G. (2006). Black carbon increases cation exchange capacity in soils. *Soil Sci Soc Am J*. 70, 1719–1730.

Lindsay, W. L. y Schwab, A. P. (1982). The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J. Plant Nutr*. 5, 821–840.

Lindsay, W. P. y Norvell, W. A. (1978). Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J*. 42, 421.

Lindsay, W. L. (1974). Role of chelation in micronutrient availability. *The plant root and its environment*. (Carso E.W. Ed.). University Press of Virginia.

Loeppert, R. H y Hallmark, C. T. (1985). Indigenous soil properties influencing the availability or iron in calcareous soils. *Soil Sci. Soc. Am. J*. 49, 597-603.

Loeppert, R. H., Geiger, S. C., Hartwig, R. C y Morris, D. R. (1988). A comparison of indigenous soil factors influencing the Fe-deficiency chlorosis of sorghum and soybean in calcareous soils. *J. Plant Nutr*. 11, 1481-1492.

Marschner, H., Römheld, V. y Kissel, M. (1986). Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *J. Plant Nutr.* 9, 895-713.

Matocha, J. E. (1984). Grain sorghum response to plant residue recycled iron and other iron sources. *J.Plant Nutr.* 7, 259-270.

Mengel, K. (1994). Iron availability in plant tissue – iron chlorosis on calcareous soils. *Plant and Soil.* 165,275-283.

Mengel, K., Bubl , K. W. y Scherer, H. W. (1984). Iron distribution in vine leaves with bicarbonate induced chlorosis. *J.Plant Nutr.* 7, 715-724.

Miller, D. C., Jumars, P. A. y Nowell, A. R. M. (1984). Effects of sediment transport on deposit feeding scaling arguments. *Limnol Oceanogr.* 29, 1202-1217.

Nason, A. y McElroy, W. D. (1963). Modes of action of essential mineral elements. *Plant Physiology Vol.III.* 451-536.

Poorter, H., Niinemets, U., Poorter, L., Wright, I. J. y Villar, R. (2009). Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytologist.* 182, 565-588.

Romera, F. J., Alcántara, E. y de la Guardia, M. D. (1992b). Effects of bicarbonate, phosphate and high pH on the reducing capacity of Fe-deficient sunflower and cucumber plants. *J. Plant Nutr.* 15, 1519–1530.

Römheld, V. y Marschner, H. (1991). Functions of micronutrients in plants. *Micronutrients in Agriculture, 2nd end. Book Series.* 4, 297-328.

Römheld, V. y Marschner, H. (1986). Mobilization of iron in the rhizosphere of different

plant species. *Adv. Plant Nutr.* 2, 155-204.

Rondon, M., Ramirez, J. A. y Lehmann, J. (2005). Charcoal additions reduce net emissions of greenhouse gases to the atmosphere. *Proceedings of the 3rd USDA Symposium on Greenhouse Gases and Carbon Sequestration in Agriculture and Forestry.* 21-24.

Rosado, R., del Campillo, M. C., Barrón, V. y Torrent, J. (2002). Long-term effect of vivianita in preventing iron chlorosis in olives on calcareous soils. *10th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants. Houston, USA.*

Sánchez-Alcalá, I. (2012). Bioavailability of iron in calcareous soils: microbial reduction and nanofertilizer application. *PhD. Universidad de Córdoba.* 169.

Sánchez-Alcalá, I., del Campillo, M., Barrón, V. y Torrent, J. (2013). Evaluation of preflooding effects on iron extractability and phytoavailability in highly calcareous soil in containers. *J. Plant Nutr.* 176 (3).

Schnitzer, M. y Khan, S. U. (1972). Humic substances in the environment. *Marcel Dekker, Inc, New York.* 327.

Shackley, S. y Sohi, S. (2010). An assessment of the benefits and issues associated with the application of biochar to soil. *A report commissioned by the United Kingdom Department for Environment, Food and Rural Affairs, and Department of Energy and Climate Change.*

Sohi, S. P., Krull, E., Lopez-Capel, E. y Bol, R. (2010). A review of biochar and its use and function in soil. *Advances in Agronomy.* 105, 47-82.

Sohi, S. P., Lopez-Capel, E., Krull, E. y Bol, R. (2009). Biochar, climate change and soil: A

review to guide future research. *CSIRO Land and Water Science Report* 05/09.

Sombroek, W. G., Nachtergaele, F. O. y Hebel, A. (1993). Amounts, dynamics and sequestrations of carbon in tropical and subtropical soils. *Ambio*. 22, 417-426.

Tagliavini, M. y Rombolà, A. D. (2001). Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. *Eur. J. Agron.* 15, 71–92.

Takagi, S., Nomoto, K. y Takemoto, T. (1984). Physiological aspect of mugenic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *J.Plant Nutr.* 7, 469-477.

Terry, N. y Abadía, J. (1986). Function of iron in chloroplasts. *J.Plant Nutr.* 9, 609-646.

TMECC (2002). Test Methods for the Examination of Composting and Compost. *U. S. C. Council, Bethesda, MD.*

Villar, R., Ruíz-Robledo, J., Ubera, J. L. y Poorter, H. (2013). Exploring variation in leaf mass per area (LMA) from leaf to cell: an anatomical analysis of 26 woody species. *American Journal of Botany*, *en prensa*.

Walker, C. D. y Welch, R. M. (1986). Nicotianamine and related phytosiderophores: their physiological significance and advantages for plant metabolism. *J.Plant Nutr.* 9, 523-534.

Wardle, D. A., Zackrisson, O. y Nilsson, M. C. (1998). The charcoal effect in Boreal forests: Mechanisms and ecological consequences. *Oecologia*. 115, 419-426.

Watanabe, F. S. y Olsen, S. K. (1965). Test an ascorbic method for determining phosphorus in water and NaHCO₃ extracts from soil. *Soil Sci. Am. Proc.* 29, 677-678.

Wintermans, J. y de Mots, A. (1965). Spectrophotometric of chlorophyll a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochem. Biophys.* 109, 448-453.

Zhang, A., Cui, L., Pan, G., Li, L., Hussain, Q., Zhang, X., Zheng, J. y Crowley, D. (2010). Effect of biochar amendment on yield and methane and nitrous oxide emissions from a rice paddy from Tai Lake plain, China. *Agriculture, Ecosystems and Environment* .139, 469-475.

Zwieten, L. V., Kimber, S., Downie, A., Chan, K. Y., Cowie, A., Wainberg, R. y Morris, S. (2007). Papermill char: Benefits to soil health and plant production. *Proceedings of the Conference of the International Agrichar Initiative, Terrigal, NSW, Australia.*