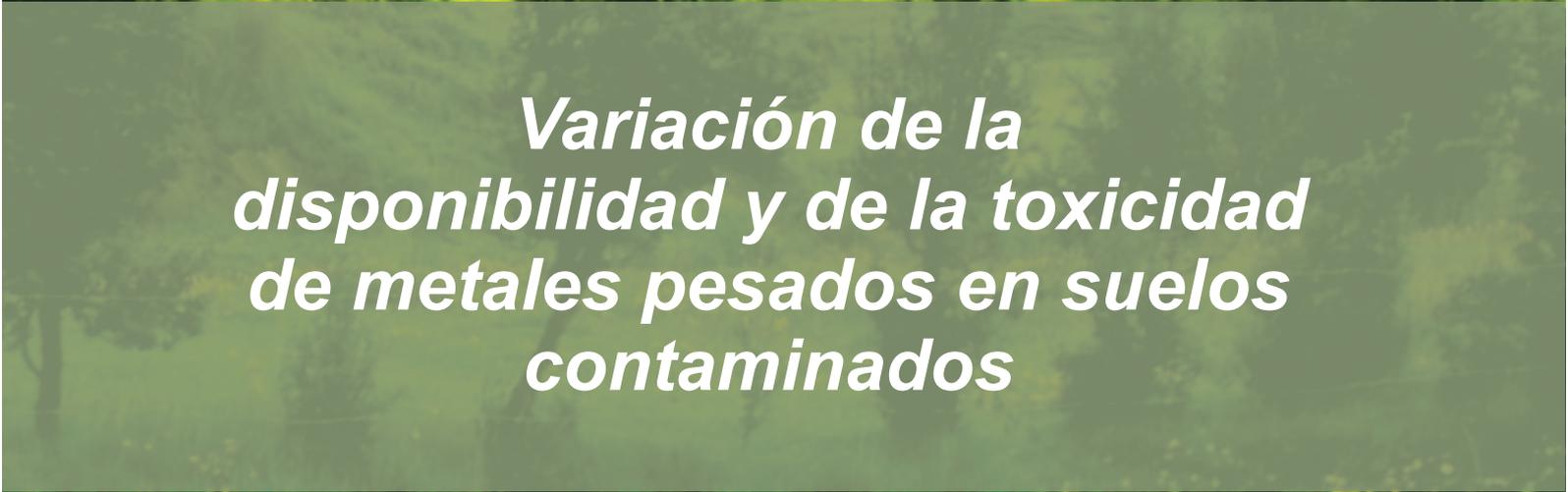




Paisaje que debe ser perdurable



***Variación de la
disponibilidad y de la toxicidad
de metales pesados en suelos
contaminados***



***Rocío Pastor Jáuregui
2021***

Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Departamento de Edafología y Química Agrícola



Programa de Doctorado en Ciencias de la Tierra

Tesis Doctoral

**Variación de la disponibilidad y de la
toxicidad de metales pesados en suelos
contaminados**

Rocío del Pilar Pastor Jáuregui

Granada, 2021

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Rocío del Pilar Pastor Jáuregui
ISBN: 978-84-1117-175-5
URI: <http://hdl.handle.net/10481/72061>



**Universidad
de Granada**



**Universidad Nacional
Agraria La Molina**

Variación de la disponibilidad y de la toxicidad de metales pesados en suelos contaminados

Memoria presentada por Rocío del Pilar Pastor Jáuregui, bajo la supervisión del Prof. Dr. Manuel Sierra Aragón, para obtener el grado de Doctora.

Esta tesis se ha realizado en el marco del programa de doctorado en Ciencias de la Tierra, bajo las líneas de investigación Ciencias del Suelo y Contaminación, en la Universidad de Granada.

Candidata a Doctora

Rocío del Pilar Pastor Jáuregui

Director de tesis

Prof. Dr. Manuel Sierra Aragón

Durante el tiempo de realización de esta Tesis Doctoral he gozado de Licencia con Goce de Haber, otorgada por la Universidad Nacional Agraria La Molina (Perú).

Esta investigación ha sido financiada por el Proyecto de Investigación RTI 2018-094327-B-I00 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades) y por los Grupos de Investigación RNM-269 y RNM-101 (Junta de Andalucía, España).

La investigación presentada en esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Granada.

*A mis hijos
Renato, Rafael y Del,
Quienes son parte de mí misma,
Por apoyarme para cumplir mi sueño.
A mi padre
Sangre de su sangre
La persona más sabia que conozco.*

*Me he esforzado mucho para llegar
donde estoy y poder jactarme de no
haber tenido que pedir favores.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Agraria La Molina (Lima, Perú), por autorizarme y facilitarme para realizar el doctorado.

Al Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Granada, donde realicé el doctorado.

Al Dr. Carlos Dorronsorro, porque gracias a él me contacté con el Departamento de Edafología y Química Agrícola.

Al Dr. Francisco José Martín Peinado (Paco), a quien admiro como profesional y amigo, no solo por el apoyo brindado sino por ser como es.

Al Dr. Manuel Sierra Aragón (Manolo), director de mi tesis, por aceptarme, aunque no compartamos algunas ideas.

A Mario, Azmán, Mikel y Marino, mis compañeros en el laboratorio, por ayudarme, apoyarme y compartir momentos agradables.

A los Drs. Francisco Javier Martínez Garzón, Emilia Fernández Ondoño, Irene Ortiz Bernad y Manuel Sánchez Marañón, docentes del Departamento de Edafología y Química Agrícola, por estar siempre dispuestos a cualquier consulta mía.

A Manoli y Yolanda, por el apoyo brindado y las gratas conversaciones, donde aprendí mucho sobre Granada.

A la siempre bella ciudad de Granada, que me acogió como si fuera nativa.

CONTENIDO

Resumen/ Summary		19
CAPÍTULO 1	Introducción general	35
CAPÍTULO 2	Materiales y métodos	57
CAPÍTULO 3	Evolución de la contaminación residual en suelos, después de tratamientos de biorremediación	75
CAPÍTULO 4	Evaluación de los tratamientos de remediación aplicados	95
CAPÍTULO 5	Evaluación de riesgos ecotoxicológicos	123
CAPÍTULO 6	Discusión general	153
CAPÍTULO 7	Conclusiones	171
Bibliografía		177
Anexos		209

Resumen

Variación de la disponibilidad y de la toxicidad de metales pesados en suelos contaminados

La actividad humana es la principal fuente para que los elementos potencialmente contaminantes (EPCs) lleguen al suelo, al agua y al aire, es decir al medio ambiente, pudiendo perjudicar a todo ser viviente.

La minería es la actividad que brinda a la sociedad los minerales necesarios para su desarrollo, pero esta actividad, durante la extracción, el transporte y por accidentes que pueden ocurrir, representa una fuente de contaminantes, porque los metales pesados y otros elementos acompañantes, como el arsénico, pueden llegar a los suelos y acumularse en concentraciones potencialmente tóxicas para muchos organismos.

La recuperación de un suelo contaminado no es nada sencilla. Por lo tanto, los proyectos de explotación minera deben tener en cuenta los costes derivados del impacto ambiental, ya que la contaminación de los suelos afecta a este recurso no renovable y puede comprometer la seguridad alimentaria del ser humano en el futuro.

El **objetivo general** de la presente tesis doctoral es evaluar la variación de la disponibilidad y de la toxicidad de metales pesados en suelos contaminados a través del tiempo, para lo cual se eligió el Corredor Verde del río Guadiamar (CVG) como área de estudio.

La restauración de suelos debido a la contaminación del vertido de la mina de Aznalcóllar es la más importante que se ha hecho en España y una de las más importantes realizadas en Europa, primero por el grado de contaminación tan alto al que se vieron afectados los suelos y segundo por la gran superficie afectada.

En el **capítulo 1** se realiza una introducción general al tema a desarrollar, señalando que la salud del suelo está relacionada con la salud humana, con el bienestar humano y con los Objetivos de Desarrollo Sostenible. También se

realiza un resumen de lo sucedido tras el vertido de la mina de Aznalcóllar (España), ocurrido en 1998, explicando cómo se contaminaron los suelos del área afectada, cuál fue la evolución inicial y las medidas de remediación llevadas a cabo, que culminaron con la creación del CVG en el año 2003.

En el **capítulo 2** se describe la zona de estudio y se indican detalladamente los materiales y procedimientos seguidos para realizar los diferentes análisis y ensayos en laboratorio, así como los análisis estadísticos realizados a partir de la base de datos obtenida.

En el **capítulo 3** se estudian las propiedades edáficas y el grado de contaminación de los suelos del CVG dos décadas después del accidente a tres profundidades (0-10, 10-30 y 30-50 cm). Se analizaron las propiedades fisicoquímicas del suelo y se midió la concentración total de Pb, As, Zn y Cu mediante XRF; se aplicó un bioensayo con *Lactuca sativa* L. para evaluar la toxicidad potencial. Nuestros resultados indican que veinte años después del accidente, persisten suelos afectados por contaminación residual en el área. Según los NGR de la Junta de Andalucía, las concentraciones de Pb y As se superan en cerca del 13% y el 70%, respectivamente, en los primeros 10 cm de los suelos del CVG. El cambio de las propiedades de los suelos después de los tratamientos de biorremediación favoreció la reducción de la movilidad potencial de los contaminantes por el aumento del pH, del contenido de CaCO₃ y del carbono orgánico. De todos modos, el bioensayo con *Lactuca sativa* L. indicó que alrededor del 25% de los suelos presentan indicios de toxicidad, puestos de manifiesto por la reducción de la elongación radicular en relación con las muestras control. Los resultados indican que aún se necesita monitorear el CVG y aplicar medidas de recuperación de los suelos para reducir la toxicidad potencial en algunos sectores del área afectada.

Los resultados de este trabajo fueron publicados en el artículo científico: Pastor-Jáuregui, R.; Paniagua-López, M.; Martínez-Garzón, J.; Martín-Peinado, F.; Sierra-Aragón, M. Evolution of the Residual Pollution in Soils after Bioremediation Treatments. *Applied Sciences* **2020**, *10*, 1006. Doi: 10.3390/app10031006.

En el **capítulo 4** se realiza la evaluación, veinte años después, de los tratamientos de remediación aplicados durante la recuperación del CVG, comparando la situación de los suelos afectados los años 1998, 2004 y 2018. La recuperación de los suelos se realizó mediante la aplicación de diferentes dosis de enmiendas orgánicas (compost y estiércol) e inorgánicas (suelos ricos en óxidos de hierro y residuos de la industria azucarera ricos en carbonatos). Las combinaciones de enmiendas que se aplicaron en diferentes sectores en función de las propiedades del suelo y el grado inicial de contaminación se han agrupado en cuatro tratamientos. T1: enmienda orgánica, rica en óxidos de hierro y más de 20 t ha⁻¹ de enmienda rica en carbonatos, T2: enmienda orgánica y se aplicaron más de 20 t ha⁻¹ de enmienda rica en carbonatos, pero no se aplicó enmienda rica en óxidos de hierro, T3: enmienda orgánica, rica en óxidos de hierro y 20 t ha⁻¹ de enmienda rica en carbonatos y T4: enmienda orgánica y se aplicaron 20 t ha⁻¹ de enmienda rica en carbonatos, pero ninguna enmienda rica en óxidos de hierro. Para evaluar el grado de recuperación de los suelos, se determinaron a lo largo del tiempo las propiedades fisicoquímicas y la concentración total, soluble en agua y biodisponible de los principales contaminantes que persisten en la zona (Pb, As, Zn y Cu) en los primeros 10 cm de suelo. Nuestros resultados indican que los tratamientos aplicados aumentaron el pH, CaCO₃ y carbono orgánico de los suelos, redujeron la CE y disminuyeron la movilidad de contaminantes, lo que indica que los tratamientos de remediación fueron eficientes en la recuperación de los suelos contaminados por EPCs. Sin embargo, veinte años después del accidente, las concentraciones totales de Pb y As aún superan los niveles de intervención de la normativa vigente en determinadas zonas. Estas áreas se ubican preferentemente en los sectores más cercanos a la mina, donde se aplicaron los tratamientos T1 y T2. En estos casos, la adición de enmienda orgánica, suelos ricos en óxido de hierro y encalante no fueron suficientemente eficaces, por lo que se recomienda la aplicación de nuevos tratamientos para completar la total recuperación del CVG.

Los resultados de este trabajo fueron publicados en el artículo científico: Pastor-Jáuregui, R; Paniagua-López, M.; Aguilar-Garrido, A.; Martín-

Peinado, F.; Sierra-Aragón, M. Long-term assessment of remediation treatments applied to an area affected by a mining spill. *Land Degradation and Development* **2021**, 32, 2481–2492. Doi: 10.1002/ldr.3911.

En el **capítulo 5** se evalúa la toxicidad potencial de los suelos del CVG, debido a que veinte años después del accidente continúan apareciendo en el área algunos suelos afectados por contaminación residual. Se evaluó el riesgo de toxicidad para el ecosistema mediante bioensayos con lechuga (*Latuca sativa* L.), lombrices (*Eisenia andrei*) y determinando la actividad microbiana mediante la respiración heterotrófica basal y el coeficiente metabólico bacteriano, en suelos a nivel superficial (0-10 cm). Los 84 suelos muestreados a lo largo del CVG se dividieron en 4 subsectores, atendiendo a sus propiedades fisicoquímicas, lo que permitió establecer cuatro tipos de suelos (SS1-SS4). Los suelos SS1 y SS2 de texturas más gruesas y mayor acidez y salinidad, y que se localizan fundamentalmente en el tercio del CVG más próximo a la mina, son los que presentan un mayor riesgo de toxicidad ambiental, mostrando una reducción media de la elongación radicular de las semillas de lechuga del 57% y 34%, respectivamente, respecto del control, así como un mayor coeficiente metabólico (23.9 y 18.1 ng C_{CO2} μg C_{microb}⁻¹ h⁻¹), significativamente superior a los medidos en los suelos SS3 y SS4. Los suelos de las manchas (zonas sin vegetación) son ácidos, con elevada salinidad y alta concentración total de EPCs. Los bioensayos de elongación radicular y de respiración heterotrófica basal confirmaron una respuesta tóxica en estos suelos, reduciéndose la respuesta de la semilla de lechuga y la tasa de respiración 9 y 5 veces, respectivamente, respecto a los suelos no contaminados. En el bioensayo de toxicidad con lombriz (*E. andrei*) la tasa de mortalidad medida en los suelos contaminados y no contaminados no resultó ser un buen indicador de la toxicidad, pero se observa que en los suelos contaminados disminuye ligeramente el peso de las lombrices, siendo esta diferencia considerable si comparamos con la ganancia de peso experimentada en los suelos no contaminados, así mismo, la capacidad reproductora ha resultado ser un indicador certero de la toxicidad, debido a que los suelos contaminados presentan una reducción en la población de juveniles muy

marcada. También se evaluó el riesgo potencial de toxicidad de estos suelos para el ser humano, considerando tres vías de exposición: ingestión, inhalación y contacto dérmico, en base a modelos empíricos propuestos por la USEPA. En todos los casos el coeficiente de peligrosidad (CP) fue menor a la unidad, por lo que se considera que no existe riesgo de toxicidad humana a lo largo del CVG en función de las vías de exposición consideradas, de los individuos objetivo (niño y adulto) y del uso recreativo al que está limitado el corredor.

En el **capítulo 6** se realiza la discusión general de los resultados obtenidos en esta tesis. Se aborda la evolución de las propiedades de los suelos, de la concentración total, soluble y biodisponible de los EPCs, así como de la evaluación del riesgo de toxicidad para el ecosistema y para la salud humana en los suelos del CVG.

Finalmente, en el **capítulo 7** se dan las conclusiones del trabajo realizado, así como algunas recomendaciones generales para la recuperación integral de la zona afectada.

Summary

Variation of the availability and toxicity of heavy metals in polluted soils

Anthropogenic activity is the main source for potentially toxic elements (PTEs) to reach the main elements of the ecosystem (soil, water and air) and, therefore, to harm living beings.

Mining is the activity that provides society with the minerals necessary for its development, but this activity, during extraction, transport and due to accidents that may occur, represents a source of pollutants, because heavy metals and other accompanying elements, such as Arsenic, can reach the soil and accumulate in concentrations that are potentially toxic to many organisms.

The recovery of contaminated soil is not easy. Therefore, mining projects must consider the costs derived from environmental impact, since soil pollution affects this non-renewable resource and may compromise human food security in the future.

The **general objective** of this Ph.D. Thesis is to evaluate the variation of the availability and toxicity of heavy metals in contaminated soils over time, for which the Guadiamar Green Corridor (GGC) was chosen as the area of study.

The soil restoration due to contamination from the Aznalcóllar mine spill is the most important that has been done in Spain and one of the most important carried out in Europe, first of all due to the high degree of contamination to which the soils were affected and second for the large area affected.

Chapter 1 provides a general introduction of the topic to be developed, noting that soil health is linked to human health, human well-being and the Sustainable Development Goals. A summary is also made of what happened after the spill of the Aznalcóllar mine (Spain), which occurred in 1998, explaining how the soils of the affected area were polluted, what was the initial evolution and the remediation measures performed, which culminated with the creation of GGC in 2003.

Chapter 2 describes the area of study and the materials and procedures followed to carry out the different analyzes and tests in the laboratory are indicated in detail, as well as the statistical analyzes conducted from the database obtained.

In **Chapter 3** the soil properties and the degree of soil pollution at three depths (0-10, 10-30 and 30-50 cm) were studied two decades after the accident. The physicochemical properties of the soil were analyzed and the total concentration of Pb, As, Zn and Cu was measured by X-ray fluorescence (XRF); bioassay using *Lactuca sativa* L. was applied to assess potential toxicity. Our results indicate that two decades after the accident, some soils affected by residual contamination persist in the area. According to the NGR of the Junta de Andalucía, Pb and As concentrations are exceeded in around 13% and 70%, respectively, in the uppermost part of the soils (first 10 cm). The change in soil properties after bioremediation treatment positively promoted the reduction in the potential mobility of pollutants by the increase in pH, CaCO₃ content and organic carbon. On the other hand, the bioassay with *Lactuca sativa* L. indicated that around 25% of the soils showed toxicity by the reduction of the root elongation in relation to the control samples. The results indicate that monitoring of the GGC is still needed, together with the application of soil recovery measures to reduce the potential toxicity in some sectors of the affected area.

The results of this work were published in the scientific article: Pastor-Jáuregui, R.; Paniagua-López, M.; Martínez-Garzón, J.; Martín-Peinado, F.; Sierra-Aragón, M. Evolution of residual contamination in soils after bioremediation treatments. *Applied Sciences* **2020**, *10*, 1006. Doi: 10.3390 / app10031006.

In **Chapter 4** the evaluation, twenty years later, of the remediation treatments applied during the recovery of the GGC is carried out, and the situation of the affected soils in 1998, 2004 and 2018 was compared. Soil recovery was carried out through the application of various rates of organic (compost and manure) and inorganic (soil rich in iron oxides and calcium carbonate)

amendments. Different amendment combinations were grouped in four treatments (T1 to T4) and applied in different sectors depending on the soil properties and the degree of initial contamination. T1: organic and iron oxides-rich amendments, and more than 20 t ha⁻¹ of carbonate-rich amendment were applied, T2: organic amendment and more than 20 t ha⁻¹ of carbonate-rich amendment were applied, but no iron oxides-rich amendment was used, T3: organic and iron oxides-rich amendments were used, and 20 t ha⁻¹ of carbonate-rich amendment were applied, and T4: organic amendment and 20 t ha⁻¹ of carbonate-rich amendment were applied, but no iron oxides-rich amendment was used. To assess the degree of soil recovery, physicochemical properties, total, water-soluble, and bioavailable concentrations of the main pollutants (Pb, As, Zn, and Cu) were determined over time. Our results indicate that the applied treatments increased the pH, CaCO₃ and organic carbon content of soils, reduced electrical conductivity and decreased mobility of pollutants, which indicates that the remediation treatments were efficient in the recovery of soils contaminated by potentially harmful elements (PHEs). However, twenty years after the accident, total concentrations of Pb and As still exceed the regulatory levels of the current regulations in certain areas. These areas are located in the sectors closest to the mine, where treatments T1 and T2 were applied. In these cases, the added doses of organic amendments, iron oxide-rich soils, and carbonate amendments were not sufficiently effective, so the application of new treatments is recommended to complete the total recovery of the GGC.

The results of this work were published in the scientific article: Pastor-Jáuregui, R; Paniagua-López, M.; Aguilar-Garrido, A.; Martín-Peinado, F.; Sierra-Aragón, M. Long-term assessment of remediation treatments applied to an area affected by a mining spill. *Land Degradation and Development* **2021**, *32*, 2481–2492. Doi: 10.1002 / ldr.3911.

In **Chapter 5** the potential toxicity of the GGC soils is assessed, since twenty years after the accident some soils affected by residual pollution continue to appear in the area. The ecosystem toxicity risk was assessed by bioassays with lettuce (*Latuca sativa* L.), earthworms (*Eisenia andrei*) and determining the

microbial activity by soil basal respiration and the bacterial metabolic coefficient, in soils at the surface level (0-10 cm) . The 84 soils sampled along the GGC were divided into 4 subsectors, according to their physicochemical properties, resulting in the soils SS1 and SS2, which were the ones that present a greater risk of environmental toxicity, showing an average reduction in the root elongation of the lettuce seeds of 57% and 34%, respectively, compared to the control, as well as a higher metabolic coefficient (23.9 and 18.1 ng C_{CO2} μg C_{microb}⁻¹ h⁻¹, respectively), significantly higher than those measured in the SS3 and SS4 soils. The high polluted soils in the area, without vegetation, were acidic, with high salinity and a high total concentration of PTEs. Root elongation and basal heterotrophic respiration bioassays confirmed a toxic response in these soils, reducing the lettuce seed response and respiration rate 9 and 5 times, respectively, with respect to uncontaminated soils. Regarding the toxicity bioassay with earthworms (*E. andrei*), the mortality rate measured in contaminated and uncontaminated soils was not a good indicator of toxicity, but it was observed that in contaminated soils the weight of earthworms decreased slightly, whereas in uncontaminated soils an increase in weight was experienced. In addition, the reproductive capacity turned out to be an accurate indicator of toxicity since the contaminated soils showed a sharp reduction in the juvenile population. The potential risk of toxicity for humans of these soils was also evaluated, considering three routes of exposure: ingestion, inhalation and dermal contact, based on empirical models proposed by USEPA. In all cases, the hazard coefficient (HQ) was less than one, so it is considered that there is no risk of human toxicity along the GGC depending on the exposure routes considered and the target individuals (child and adult) and recreational use to which the Corridor is limited.

In **Chapter 6** the general discussion of the results obtained in this thesis is carried out. The evolution of the soil properties, of the total, soluble and bioavailable concentrations of PTEs is addressed, as well as the evaluation of the risk of toxicity for the ecosystem and for human health in the soils of the GGC.

Finally, **Chapter 7** contains the conclusions of the work carried out as well as some general recommendations for the full recovery of the affected area.

CAPÍTULO 1

Introducción general



Foto cedida por el Departamento de Edafología y Química Agrícola de la UGR

1.1 Generalidades

La Pachamama o madre tierra, símbolo de fecundidad –cual madre abnegada, cariñosa y protectora– alimenta, cuida y sirve de sepultura a los seres vivos del planeta. La Pachamama de la tradición andina es una divinidad que requiere ser alimentada y exige reciprocidad por parte de los seres humanos (Cordero, 2017), por eso, desde tiempos antiguos, especialmente en Sudamérica, se acostumbra dar ofrendas a la Pachamama para agradecerle por las buenas cosechas y para pedirle que las que vengan sean abundantes. La ofrenda es una manera simbólica en la cual el hombre devuelve a la Pachamama lo que ha tomado de ella, con el fin de restablecer la reciprocidad entre el ser humano y la naturaleza.

En un comienzo la tierra dio al hombre a manos llenas los alimentos, bastándole tan solo recogerlos, pero el hombre dejó de ser nómada y decidió establecerse en un lugar, aprendiendo a sembrar, cultivar, cosechar y almacenar, naciendo la agricultura. Muchos siglos duró este simple y eficaz sistema que tuvo en armonía al hombre y a la tierra.

El homo sapiens, rey y señor del universo, desarrolló otros sistemas para subsistir, creando la industria, el comercio, la minería, etc.; olvidándose por completo de la Pachamama, agotando su fertilidad, explotando en completo desorden los bosques, agregando minerales a los suelos, incluso aprovechó agua proveniente de la minería para riego.

Lal (2016) define la salud del suelo como la capacidad que tiene, como entidad biológicamente activa, dentro de paisajes naturales y gestionados, para sostener múltiples servicios de los ecosistemas, incluida la productividad primaria neta, la seguridad alimentaria y nutricional, la biodiversidad, la purificación del agua y la renovabilidad, el secuestro de carbono, la calidad del aire, la química atmosférica y el ciclo elemental, para el bienestar humano y la conservación de la naturaleza.

El 25 de septiembre de 2015, 193 países se comprometieron con los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible de Naciones Unidas y su cumplimiento para el año 2030. Los objetivos persiguen la igualdad entre las personas, proteger el planeta y asegurar la prosperidad como parte de una nueva agenda de desarrollo sostenible. En el punto 2.4 indica “asegurar la sostenibilidad de los sistemas de producción de alimentos y aplicar prácticas agrícolas resilientes que aumenten la productividad y la producción, contribuyan al mantenimiento de los ecosistemas, fortalezcan la capacidad de adaptación al cambio climático, los fenómenos meteorológicos extremos, las sequías, las inundaciones y otros desastres, y mejoren progresivamente la calidad de la tierra y el suelo”. En el punto 15.3 manifiesta “luchar contra la desertificación, rehabilitar las tierras y los suelos degradados, incluidas las tierras afectadas por la desertificación, la sequía y las inundaciones, y procurar lograr un mundo con efecto neutro en la degradación del suelo” (Agenda 2030). La salud del suelo está muy ligada con la salud humana, con el bienestar humano y con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (Lal, 2020).

La actividad minera es importante para el desarrollo tecnológico e industrial y es muy rentable, pero lo primordial es la alimentación humana. La minería, mal llevada en muchos casos, perjudica al agro, contaminando sus tierras o impidiendo su uso por falta de agua para riego. La minería usa el agua y la regresa a su cauce contaminándolo, inutilizable para el riego (Figura 1.1).



Figura 1.1. Ríos de Puno (Perú) contaminados con aguas ácidas por mina Arasi (No a la mina, 2018)

Otros perjuicios que ocasiona la minería son la acumulación del relave (desperdicios inutilizables de la extracción de minerales) y la construcción de embalses con aguas altamente contaminadas; en ambos casos el daño sería incalculable de producirse un colapso en los almacenamientos de relave o ruptura de los embalses, y se necesitaría conocer el grado de la contaminación en la zona afectada y la variación de la disponibilidad de metales pesados en el suelo a lo largo del tiempo, para evaluar el riesgo potencial de toxicidad al ecosistema y a los seres vivos, proponiendo medidas de restauración ecológica en los casos que sean necesarios.

Así mismo, el transporte de los minerales, efectuado por cientos de viajes, desde las minas hasta los centros de embarque para su exportación o a las plantas de procesamiento, se realiza en camiones que en su trayectoria y por el viento van esparciendo polvo del mineral, contaminando tierras agrícolas (Figura 1.2).



Figura 1.2. Mina La Zanja. Compañía de Minas Buenaventura. Cajamarca, Perú
(Larrain Vial, 2012)

La actividad minera en el Perú se desarrolla desde épocas pre-incas, principalmente en los Andes. Desde la época del Tahuantinsuyo hasta el presente, ha sido uno de los principales productores mundiales de metales, con una minería polimetálica. Actualmente, con cerca de 400 unidades mineras en producción, es una de las principales actividades económicas del país y la

principal generadora de divisas e ingresos fiscales (LarrainVial, 2012; Alomía *et al.*, 2017; MINEM, 2018). El Perú mantiene el segundo lugar en la producción de cobre, plata y zinc a nivel mundial y ocupa el primer lugar en la producción de oro, zinc, plomo y estaño en Latinoamérica. Además, posee las mayores reservas de plata del mundo y se ubica en tercer lugar en reservas de cobre, zinc y molibdeno a nivel mundial (MINEM, 2018).

Las características geográficas del Perú están entre las más variadas del mundo. La zona costera tiene un ancho entre 50 y 100 km a lo largo del país, frente al Océano Pacífico. Al otro lado está la cordillera de los Andes que se levanta, en algunos puntos, a más de 6000 m.s.n.m. La sierra incluye las cordilleras Oriental y Central (con volcanes activos), valles y cuencas muy pronunciadas, grandes planicies en el altiplano y glaciares en las partes más elevadas. Los Andes descienden por el este hacia los bosques de la selva alta, a elevaciones que van de 1000 a 400 m.s.n.m., llegando a la selva baja o selvas tropicales (MINEM, 2020).

En el Perú se encuentran 8 de los 11 tipos de clima del mundo. La costa, desértica y árida, se caracteriza por ausencia o muy poca lluvia y de junio a octubre (invierno) hay nubes bajas o finas capas de niebla (garúa) que impide la acción de la luz solar y retarda la evaporación. Lima tiene un promedio de precipitación anual de sólo 50 mm, con cobertura de nubes durante el 70% del año. La precipitación promedio anual en la sierra va de 300 mm en el sur a 900 mm en el norte, con nieve sobre los 3500 m de elevación. La selva presenta lluvias anuales de 3000 a 4000 mm. El efecto El Niño produce intensas lluvias periódicamente en la región costera y en la selva y sequía en la sierra (MINEM, 2020).

La discusión sobre la convivencia de la minería y la agricultura en un mismo territorio tiene larga data en el Perú (Figura 1.3). En los últimos años, se incrementó la participación de la minería en el PBI (12%) frente a la participación de la agricultura (5%), en términos relativos. La superficie de tierra concesionada a la minería es hoy 13 veces mayor que la superficie empleada para el cultivo de alimentos. Según el estudio, la minería incrementa

la competencia con la agricultura por el uso de los factores productivos como tierra, agua y fuerza laboral (Del Pozo y Paucarmayta, 2015).



Figura 1.3. Campos agrícolas del distrito de La Encañada (Perú), cerca del proyecto minero Michiquillay (No a la mina, 2017)

Por lo expuesto, se deduce que es urgente y necesaria la coordinación real y verdadera entre el agro y la minería. Se requiere un mapa minero que integre una minería moderna y responsable con una agricultura productiva. El agua de preferencia debe ser usada para la agricultura porque la minería, dado su poder económico, puede utilizar el agua del mar, previo tratamiento. El agua utilizada por la minería debe ser tratada y reintegrada a su cauce, los embalses de relave deben ser reforzados y supervisados constantemente para evitar problemas.

La insensatez del hombre debe terminar y reparar el terrible daño que se le hace al suelo. Para un armonioso y próspero desarrollo de los países, se requiere una minería moderna y responsable, así como una agricultura actualizada y próspera. Con una armoniosa coordinación entre agro y minería, podremos dejar de decir “agua sí, oro no”.

Protejamos el planeta no es lo mismo que decir defendamos la vida humana. La visión del primero alcanza a su propia existencia mientras que el segundo es la utopía y el objetivo mayor de salvar a la humanidad.

1.2 Vertido tóxico de Aznalcóllar

La contaminación de suelos debido al vertido de la mina de Aznalcóllar (España) ocurrido en 1998, es considerado uno de los accidentes mineros más importantes en Europa en las últimas décadas.

1.2.1 Zona del accidente

La mina de Aznalcóllar está situada en la Faja Pirítica Ibérica, que es una de las zonas de mineralización de sulfuros más importante de Europa; es una banda que tiene más de 250 km de largo y 50 km de ancho, donde existe una concentración de metales en forma de sulfuros de Fe, As, Cu, Zn o Pb que, como reserva, es una de las más importantes de Europa (Leistel *et al.*, 1998). Es una zona minera muy rica, de donde se han extraído minerales desde hace más de 5000 años.

La mina, aparte de la zona de acopio del material, constaba de dos cortas mineras (zonas de extracción del mineral), que podían tener 0.5 km de profundidad y más de 1 km de ancho. En el momento del accidente se extraían los minerales de la corta Los Frailes. La planta de procesado usaba agua del río Agrio, río que atravesaba todas las instalaciones, desembocando en el río Guadiamar. El residuo sólido estéril menos contaminante se almacenaba en grandes pilas, mientras que el residuo de la decantación y extracción de metales, es decir, el más peligroso, se almacenaba en una balsa de grandes dimensiones (130 ha), con 2 km de largo por 1 km de ancho, donde se llegó a almacenar 50 Mm³ de residuo contaminante, cargado de metales pesados y agua ácida (pH<1.5). En la mina se extraía principalmente Zn, Cu, As y Pb, y dependiendo de la veta de extracción se podían extraer elementos como Cd, Ag, Sb, Tl, Bi, Cr, Hg, Ni (Martín Peinado, 2001).

La mina se encuentra en el curso medio del río Guadiamar, que es el último afluente del río Guadalquivir, conectando con él por su margen derecha, justo antes de entrar en las marismas del Parque Nacional Doñana, que es la reserva

de aves más grande de Europa y declarada por la UNESCO, en 1994, reserva de la humanidad (Grimalt *et al.*, 1999).

Los terrenos por los que circula el río eran mayoritariamente agrícolas, más de la mitad de la zona estaba cultivada (cereales, girasol, frutales) y en la parte final había arroz, mientras que aproximadamente una quinta parte del terreno tenía un uso ganadero. Era una zona con fuerte actividad humana y con uso del suelo bastante intenso (Simón *et al.*, 2001).

1.2.2 El accidente

En la madrugada del 25 de abril de 1998, el muro de contención de la balsa se rompió y vertió 0.9 hm³ de lodo y 3.6 hm³ de agua ácida, fuertemente contaminado en las cuencas de los ríos Agrio y Guadiamar (Figura 1.4). Los lodos se extendieron 45 km río abajo y el agua contaminada llegó hasta 58 km, hasta el Parque Nacional Doñana. La superficie dañada por el derrame tóxico fue de aproximadamente 55 km², afectando la llanura de inundación, el cauce principal, terrenos agrícolas, zonas de pastos y zonas de cortijos (Simón *et al.*, 1999).



Figura 1.4. Vista del área afectado por el vertido minero

Foto cedida por el Departamento de Edafología y Química Agrícola de la UGR

La altura del vertido en algunos puntos fue superior a 2 m y en la parte más próxima a la balsa se llegó a acumular, sobre los suelos, más de 1 m de espesor de lodo altamente contaminante. En las zonas finales, el espesor fue mucho menor pero muy irregular por el micro relieve, incluso había ligeros relieves sin lodo, rodeadas de zonas cubiertas por él, convirtiéndose en una zona difícil de descontaminar porque eran manchas heterométricas y muy dispersas (Martín Peinado, 2001).

Fueron más de 4600 ha afectadas. De los terrenos con especial protección se afectó 4.2% del Parque Natural Doñana, que es la zona que rodea al Parque Nacional Doñana, sirviendo como una orla de amortiguación de los embates, que limitó a un 0.2% la superficie del Parque Nacional afectada. Como consecuencia inmediata, se perdieron 1931 ha de terrenos de cultivo (cereal, frutales, algodón, arroz).

Para evitar la alarma social de productos agrícolas contaminados en España, la Junta de Andalucía compró toda la cosecha, no solo del área afectada, sino de todos los terrenos colindantes y los destruyó. Además de las pérdidas de las superficies agrícolas, se perdieron 2360 ha de vegetación natural, murió la fauna que vivía en el río y 4 pozos se contaminaron por la entrada de lodo (Martín Peinado, 2001).

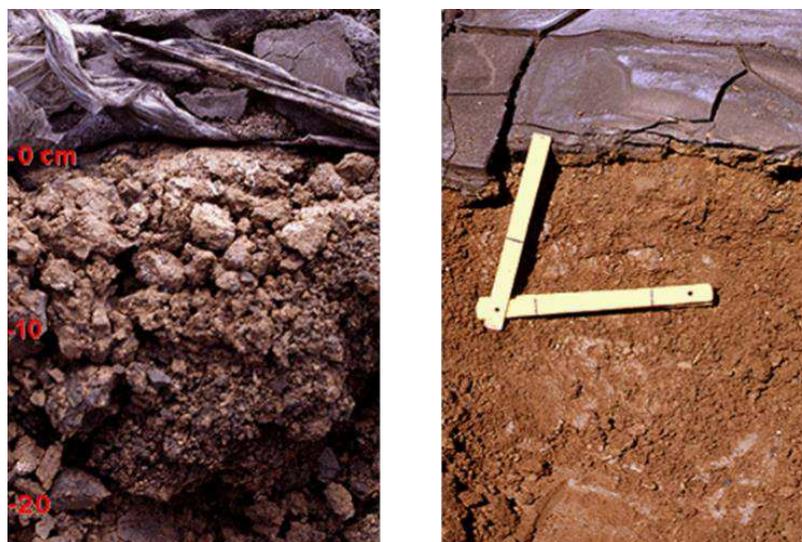
1.2.3 Contaminación de los suelos

La evolución en el tiempo de la contaminación provocada por el accidente fue compleja, debido a la riqueza en sulfuros de los lodos que dan lugar a graves problemas a largo plazo (Simón *et al.*, 2002). Hoy, más de dos décadas después del accidente, se siguen viendo esos problemas a pesar que se ha trabajado muchísimo en la recuperación de la zona (Pastor-Jáuregui *et al.*, 2020).

➤ Contaminación inicial o contaminación directa

En el momento del accidente, el lodo y el agua ácida llegaron sobre los suelos que estaban más o menos secos. Esos contaminantes empezaron a penetrar en

el suelo, tanto en fase sólida como líquida, condicionada la profundidad de la contaminación por la textura y estructura del suelo (Simón *et al.*, 1999). En los suelos menos estructurados, la ausencia de grietas superficiales limitó la penetración de los lodos, que quedó como una película encima de ellos, aunque sí se infiltró el agua ácida. Sin embargo, en los suelos más desarrollados y estructurados, el grado de contaminación fue mayor ya que se vieron afectados por el agua ácida, así como por los lodos, tanto en superficie como en profundidad, observándose las paredes de agregados cubiertas por el lodo tóxico (Figura 1.5).



Buen desarrollo
Alta penetración

Bajo desarrollo
Baja penetración

Figura 1.5. Contaminación en profundidad (Dorronsoro *et al.*, 2002)

➤ **Contaminación secundaria o contaminación oxidativa**

El lodo introduce los contaminantes en el suelo en forma de sulfuros, lo que representa un problema a largo plazo por su oxidación, liberando elementos potencialmente tóxicos a la solución del suelo afectando la “salud del suelo”. La mayoría de los metales y los sulfuros, en condiciones reductoras (encharcamiento) tienen baja movilidad, permanecen estables, son inertes, por eso que los lodos se encontraban en una balsa llena con agua, porque de esta manera esos sulfuros no reaccionan (Martín Peinado, 2001).

La oxidación de la pirita (FeS_2) ocasiona una fuerte acidificación, liberación de contaminantes y formación de sulfatos solubles. Los sulfuros en presencia de oxígeno y agua empiezan a oxidarse liberando hierro ferroso, que se oxida a férrico, precipitando como hidróxido y liberando protones que acidifican el medio. Por otro lado, el azufre del sulfuro se oxida a sulfato liberando más protones. Además, el Fe^{3+} que se genera vuelve a participar como un agente oxidante y acelera todavía más el proceso de oxidación de los sulfuros (Dorronsoro *et al.*, 2002; Simón *et al.*, 2002). Si en el medio existen bacterias del tipo *Thiobacillus thiooxidans* y *Thiobacillus ferrooxidans*, el proceso se acelera. Existen trabajos que indican que la presencia de estas bacterias puede multiplicar por más de mil veces la velocidad de oxidación de la pirita (Lacey y Lawson, 1970; Bigham y Nordstrom, 2000).

Las consecuencias de la oxidación de los sulfuros son básicamente reacciones complejas de hidratación, de hidrólisis y de ácido base, que acidifica enormemente el suelo en cuestión de días o de pocas semanas. Cuando se oxida el sulfuro, el pH del suelo baja considerablemente, lo cual es perjudicial para el suelo y su biota. Además, se liberan los contaminantes que estaban como minerales inertes, haciéndose solubles y al unirse con los sulfatos forman sales solubles que, además, a pH ácido son todavía más móviles y por tanto potencialmente más tóxicas, generando un grave riesgo de contaminación de acuíferos y de las aguas superficiales (Simón *et al.*, 2002).

Nueve días después del accidente, los lodos todavía estaban húmedos, no se habían oxidado, tenían un aspecto gris, pero dos semanas más tarde, el 20 de mayo, aparecen precipitados de sales en la superficie del suelo. Esto es debido a la oxidación de los sulfuros y la consiguiente formación de sulfatos solubles cargados de metales pesados, que ascienden por capilaridad debido a la evaporación superficial. Con las lluvias estas sales penetran en el suelo, produciendo una intensa contaminación secundaria a lo largo del perfil del suelo hasta donde penetra el agua (Simón *et al.*, 2001).

1.2.4 Medidas de remediación

➤ Retirada de lodos

La primera acción de remediación fue la limpieza. Consistió en la eliminación de los lodos y, dado que el lodo había penetrado por las grietas del suelo, parte del suelo superficial también hubo de ser retirado (Simón *et al.*, 2001).

Se trabajó en la zona de forma intensa, 500 camiones de diferentes partes de España, incluso de Portugal, acumularon el lodo y el suelo contaminado, que se iba retirando con excavadoras, en la zona de extracción minera abandonada. Trabajaron 900 personas, con turnos durante las 24 horas del día. En tan solo 200 días, se extrajeron 6 hm³ de material, del que se estima que el 38% corresponde a lodos y el 62% a suelo irremediablemente contaminado (Martín Peinado, 2001). Una vez finalizada la retirada de los lodos y del suelo contaminado, se selló superficialmente esta zona para evitar una dispersión eólica de los contaminantes. No obstante, con el tiempo el nivel freático ascendió y cubrió los residuos depositados, convirtiéndose en un pequeño lago. El confinamiento de los residuos en la corta, que es un encajamiento geológico sobre la roca madre, impide posibles filtraciones que pudieran contaminar los acuíferos, por lo que actualmente no supone un riesgo medioambiental.

Debido a la complejidad del proceso de limpieza, la eliminación de los lodos no fue uniforme. Después de las lluvias de invierno de 1998-1999, los suelos del sector norte, que no tenían carbonatos y con textura franca, formaron una costra delgada en la superficie. Los contaminantes empezaron a acumularse en las pequeñas depresiones, formando eflorescencias blancas, amarillentas y rojizas. En cambio, en los suelos de los sectores medio y sur, con textura similar, pero con un contenido medio de carbonato de alrededor del 10%, no se observaron costras o acumulación de contaminantes (Simón *et al.*, 2005a).

El daño colateral más importante fue la pérdida de suelo, ya que es un recurso no renovable. Hubo zonas donde se llegó a eliminar más de metro y medio de suelo, quedando en superficie el horizonte C, limitado en cuanto a las condiciones de fertilidad (Martín Peinado, 2001).

➤ **Limpieza, encalado y labranza**

Debido a la fuerte contaminación de los suelos después de la limpieza, las áreas más contaminadas (ubicadas principalmente en la parte norte) se limpiaron nuevamente en la primavera-verano de 1999, seguido de un encalado con residuos de la industria azucarera (4 kg m^{-2}) y labranza superficial de los suelos (5-10 cm de profundidad) en toda el área afectada por el derrame (Simón *et al.*, 2008).

La espuma de azucarera es un subproducto de la fabricación de azúcar rica en carbonato cálcico y óxidos de calcio y de magnesio. Como tal, la normativa de fertilizantes española la considera una enmienda caliza, pudiendo ser usada como corrector de pH en suelos ácidos (García-Zamarreño *et al.*, 2013).

Se recomendó el uso de espuma azucarera por ser un residuo industrial y por tanto menos costoso que otros materiales, por su acción encalante gradual, no tan agresiva como la del CaCO_3 puro y porque estos residuos contienen entre 15% y 20% de materia orgánica, beneficioso para la recuperación de la fertilidad física y química de los suelos que quedan en la zona tras las tareas de limpieza. Según la información publicada en la Red de Información Ambiental de la Junta de Andalucía (CAGPDS, 2002), el residuo procedente de la industria de la remolacha azucarera se aplicó en dosis diferentes según la zona afectada: en los primeros 15 km aguas abajo de la mina se aplicaron inicialmente de media 40 t ha^{-1} y al año siguiente se repitió el encalado en dosis variables (20, 30 o 50 t ha^{-1}), dando un total de dosis para este sector entre 60 y 90 t ha^{-1} . En el resto de la zona afectada, la enmienda carbonatada se aplicó con una dosis de 20 t ha^{-1} y no se repitió al año siguiente.

➤ **Limpieza, materia orgánica, hierro y labranza**

En una tercera etapa (primavera-verano 2000), las áreas más contaminadas se limpiaron una vez más y se agregaron a los suelos materia orgánica junto con suelos rojos arcillosos ricos en hierro del Aljarafe sevillano, seguido de la labranza de los 20-25 cm superiores de los suelos (Aguilar *et al.*, 2004a).

Las enmiendas orgánicas se aplicaron de forma más o menos homogénea en todos los sectores: en la zona más afectada (primeros 15 km aguas abajo de la mina) se aplicaron 20 t ha⁻¹ de compost de diversa procedencia, en la zona media (entre 15 y 30 km aguas abajo) se aplicaron 20 t ha⁻¹ de estiércol y en la zona más baja (últimos 15 km) se aplicaron 15 t ha⁻¹ de estiércol (CAGPDS, 2002).

Para la retención de As en la zona afectada, la Junta de Andalucía decidió emplear suelos rojos ricos en hierro, aplicando mayores dosis en los sectores más contaminados. Las dosis aplicadas variaron entre 320 y 960 t ha⁻¹ (CAGPDS, 2002). Las tasas de aplicación fueron excesivas en algunos casos e insuficiente en otros, debido a la heterogeneidad de la contaminación (Aguilar *et al.*, 2007).

➤ **Fitorremediación**

La fitorremediación se puede definir como el uso combinado de plantas, enmiendas del suelo y prácticas agronómicas para eliminar los contaminantes del medio ambiente o reducir su toxicidad (Salt *et al.*, 1998).

Es un método efectivo basado en plantas para la mitigación de contaminantes orgánicos y metales principalmente tóxicos, se reconoce como una técnica ecológica apropiada en la que las plantas, asociadas a los microbios del suelo, se utilizan para disminuir las concentraciones de metales tóxicos en sitios contaminados. Las raíces de las plantas estabilizan el suelo contaminado e inhiben la movilización de metales tóxicos. La fitorremediación se realiza en el lugar, lo que ahorra transporte y costes de procesamiento. El éxito de la fitorremediación depende del sitio, la selección de especies vegetales y disponibilidad de metales tóxicos para su absorción (Patra *et al.*, 2020).

De Haro *et al.* (2000), realizaron estudios en las tierras afectadas para identificar especies que crecen espontáneamente en los suelos contaminados y que fueran tolerantes a metales. Comprobaron que había una acumulación eficiente con *Amaranthus blitoides* (As, Pb y Cu), con *Erodium moschatum* (Zn) y con *Lavatera cretica* (Cd). Del Río *et al.* (2002), seleccionaron once

especies de plantas capaces de crecer de forma silvestre en los suelos contaminados de Aznalcóllar y eficaces en la acumulación de uno o varios contaminantes.

Clemente *et al.* (2005) indicaron que la absorción total de metales pesados en *Brassica juncea*, especie vegetal conocida por acumular Zn y especialmente Pb, fue relativamente baja, enfatizando los problemas a los que se enfrentan al intentar emplear la fitoextracción para la limpieza de sitios afectados por una contaminación multielemental. Del trabajo de estos autores se desprende que, dependiendo del nivel de contaminación del suelo, se requieren más de mil años para reducir las concentraciones de Cu, Pb, Zn y As, en los 20 cm superiores del suelo afectado por el vertido, a valores máximos permitidos por la Unión Europea, considerando dos cosechas por año.

La fitoextracción no tuvo buenos resultados en la zona por el clima poco favorable y por la contaminación heterogénea y persistente, por lo que se recurrió a la fitoestabilización.

En la fitoestabilización los metales tóxicos se inmovilizan en la región rizosférica de las plantas por adsorción o precipitación. Esta técnica no solo disminuye la lixiviación de metales tóxicos en el agua subterránea o en tierras agrícolas, sino que evita la entrada de metales en la cadena alimentaria del ecosistema (Barceló y Poschenrieder, 2003; Patra *et al.*, 2020). Consiste en usar plantas que aseguren que el metal no pasa a la parte aérea, sino que se queda en la raíz o hace que la rizosfera reaccione con el suelo y precipita los metales limitando su movilidad y disponibilidad.

De la Fuente *et al.* (2014) evaluaron cuatro arbustos nativos para la estabilización de Cd, Cu, Pb, Zn y As en suelos contaminados, como proceso de restauración. La transferencia de estos elementos tóxicos del suelo a las partes cosechables fue baja para todas las especies y algunas especies pudieron disminuir su disponibilidad en el suelo. Sus resultados sugirieron que *R. sphaerocarpa* fue la especie vegetal más adecuada para la restauración de estos suelos, ya que mostró la tasa de supervivencia más alta, tolerancia

elevada a una fuerte acidez del suelo y factores de transferencia de elementos tóxicos bajos.

1.2.5 El Corredor Verde del río Guadiamar (CVG)

Tras las medidas a corto plazo, la Junta de Andalucía llevó a cabo un programa en el área afectada para evaluar la estabilización de elementos traza, reducir la fitotoxicidad y establecer una cubierta vegetal. Este programa se denominó el *Corredor Verde del río Guadiamar*. Para restablecer la cobertura vegetal y hacer el corredor verde, se establecieron en la zona especies típicas de bosque mediterráneo y de bosque ribereño. Sin embargo, la mayoría de los suelos han sido espontáneamente colonizados por plantas silvestres (principalmente plantas anuales), adaptadas a condiciones climáticas locales y poco afectadas por la contaminación (Madejón *et al.*, 2006a).

El corredor debía conectar las áreas protegidas de tierras bajas (Parque Nacional Doñana) con las montañas boscosas (Parque Natural Sierra Norte). El diseño de plantación se realizó para que fuera lo más natural posible. En la zona con vegetación mediterránea típica se plantaron de forma irregular, en forma de mosaicos, encina, algarrobo, acebuche, lentisco, etc. En la zona de vegetación de ribera se seleccionaron las especies fresno, adelfas, sauce, etc. (CMA, 2003).

La restauración se diseñó teniendo en cuenta la diversidad que existía (clima, geomorfológica, edafológica, vegetación, etc.), para no intervenir toda la zona de igual forma. Se realizó un estudio bastante detallado, separando la zona en distintos ecosistemas: llanura aluvial, marisma aluvial, marisma interna (Borja *et al.*, 2008). Dentro de los ecosistemas definieron distintas áreas piloto y se diseñó la serie de vegetación (Carrascal *et al.*, 2008). Se actuó sobre los taludes muy verticales, haciendo prácticas de bioingeniería, trabajando con malla de fibra de coco y se usaron troncos de eucalipto para hacer empalizadas o disminuyendo la pendiente del talud de manera mecánica (Arenas *et al.*, 2008).

Landsat 7 es el séptimo de un grupo de satélites lanzados por Estados Unidos en el programa Landsat el 15 de abril de 1999. Su objetivo principal es actualizar la base de datos de imágenes de todo el planeta Tierra sin nubes (Alonso, 2021).

A través de imágenes satelitales del Landsat 7 se ha podido obtener información del Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (NDVI) del CVG, en diferentes años (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Información para obtener gráficos de NDVI del CVG

Fecha	Época
27-08-1999	Finalizada retirada de lodos y limpieza
28-05-2001	Concluidas las enmiendas
17-03-2004	A 5 años de iniciar las enmiendas
02-05-2009	A 10 años de la retirada de los lodos
29-05-2013	A 15 años del accidente

El NDVI es un índice de vegetación que se utiliza para estimar la cantidad, calidad y desarrollo de la vegetación (Figura 1.6) con base a la medición de la intensidad de la radiación de ciertas bandas del espectro electromagnético que la vegetación emite o refleja. Este índice se calcula mediante la diferencia entre la reflectancia de las bandas 4 (infrarrojo cercano) y 3 (visible – rojo) dividido por la suma de estas dos bandas de reflectancia (Alonso, 2021).

En la Figura 1.6., el color rojo ($NDVI < 0.1$) indica ausencia completa de vegetación (suelos descubiertos) y el color verde ($NDVI > 0.8$) señala que el terreno presenta una cubierta vegetal densa. Por lo tanto, se puede observar cómo se ha ido recuperando la vegetación en el CVG a lo largo del tiempo a partir de las actuaciones llevadas a cabo en la zona, alcanzando un alto nivel de recuperación a los diez años del vertido. No obstante, incluso a los 15 años del accidente, se aprecia como el tercio norte del corredor, el más próximo a la mina, muestra zonas significativamente amplias donde la cubierta vegetal es deficiente.

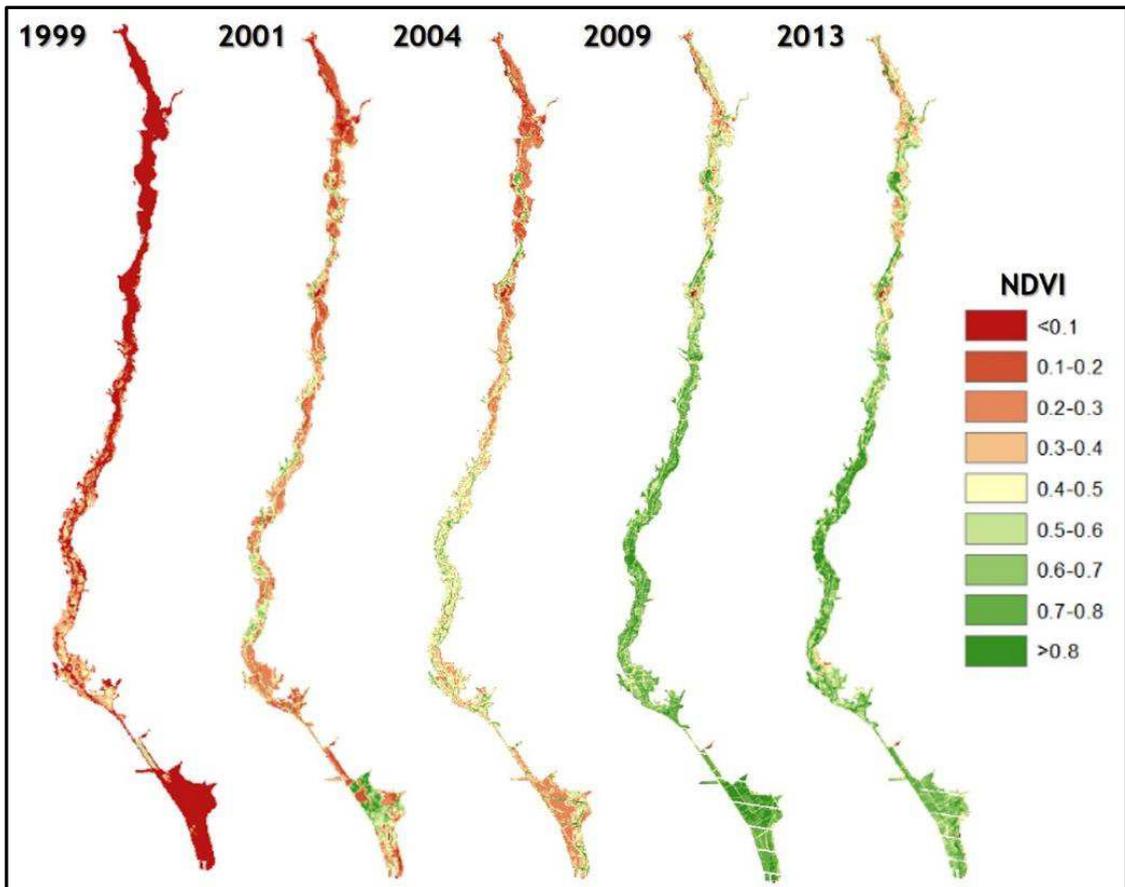


Figura 1.6. NDVI en todo el CVG, en diferentes años

En estudios de campo, en la zona, se ha observado que hay sectores en el CVG gravemente afectados, donde no crece vegetación, como se muestra en la Figura 1.7, son manchas diseminadas que presentan contaminación, con pH fuertemente ácido (Pastor-Jáuregui *et al.*, 2020). El Índice NDVI, para el año 2018, fue calculado a partir de la imagen multispectral obtenida del satélite Sentinel 2, con resolución de 10 m (ESA), el 17 de mayo de 2018.

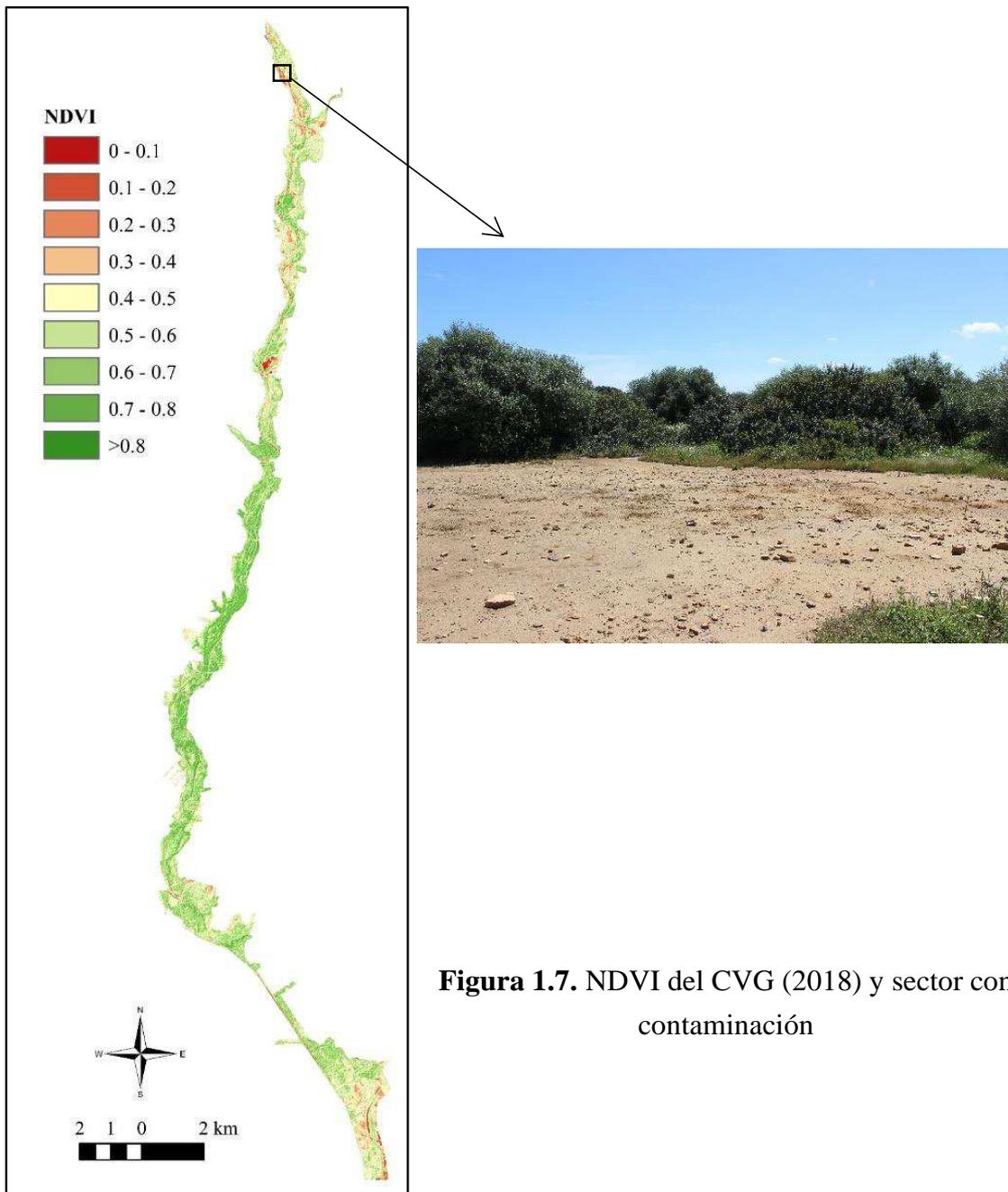


Figura 1.7. NDVI del CVG (2018) y sector con contaminación

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Debido a las consecuencias devastadoras que derivaron del accidente minero de Aznalcóllar y que dieron lugar a una intervención millonaria de la administración pública, es necesario la monitorización de los suelos del Corredor Verde del río Guadiamar para garantizar la seguridad de un espacio protegido destinado fundamentalmente a fines recreativos. Existen estudios que coinciden en la necesidad de mantener una monitorización de los suelos de la zona, por la existencia de áreas sin vegetación con suelos muy ácidos y elevadas concentraciones de metales que pueden funcionar como fuentes de contaminación, así como la evolución de las propiedades de los suelos con vegetación, considerados recuperados, y que pueden dar lugar a removilización de algunos contaminantes que se consideraban estabilizados tras las enmiendas aplicadas en la recuperación de la zona.

Por tanto, el objetivo general de esta tesis es evaluar la variación de la disponibilidad y de la toxicidad de metales pesados en suelos contaminados, a través del tiempo, en concreto 20 años después del accidente.

1.3.2 Objetivos específicos

- Conocer la evolución de las propiedades fisicoquímicas de los suelos del CVG, después del vertido y de las medidas de recuperación aplicadas.
- Determinar cómo ha cambiado en veinte años la concentración total de los contaminantes en los suelos del CVG y su distribución en profundidad.
- Evaluar la influencia de las medidas de recuperación aplicadas en los suelos del CVG dos décadas después del accidente, en la solubilidad y biodisponibilidad de los contaminantes.

- Estimar el riesgo de toxicidad para el ecosistema y para la salud humana de los suelos del CVG, con especial atención en aquellas zonas que permanecen fuertemente contaminadas y que se presentan distribuidas aleatoriamente en forma de manchas, donde no ha sido capaz de desarrollarse la vegetación.

CAPÍTULO 2

Materiales y métodos



2.1 Zona de estudio

2.1.1 Ubicación

La zona de estudio de esta tesis doctoral corresponde a toda el área conocida como el Corredor Verde del río Guadamar (CVG), que se vio afectada por el vertido tóxico de la mina de Aznalcóllar (Sevilla, España), que ocurrió en abril de 1998. Se encuentra ubicada al oeste de la provincia de Sevilla, entre las latitudes $37^{\circ} 30'$ y $37^{\circ} 00'$ norte y las longitudes $6^{\circ} 10'$ y $6^{\circ} 20'$ oeste, abarcando una franja de 45 km de longitud y 500 m de ancho de forma irregular a ambos lados del cauce de los ríos Agrio y Guadamar (Figura 2.1).

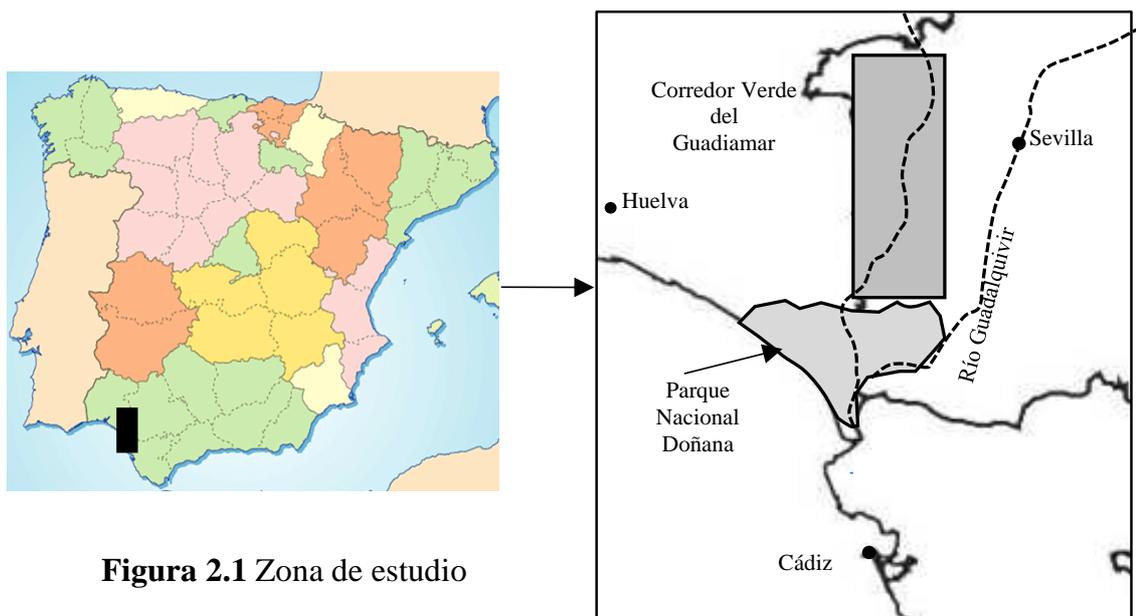


Figura 2.1 Zona de estudio

2.1.2 Clima

El clima de la zona está condicionado por su ubicación dentro de la depresión del Guadalquivir, por la influencia del clima mediterráneo, por la topografía suave y por la fisiografía longitudinal asociada a la cuenca del río Guadamar.

La temperatura media anual es de 17.7°C (con temperatura media en los meses más fríos superior a 10°C) y la precipitación media anual es de 612.7 mm . La insolación anual es una de las más altas de la península, mayor a 2800

horas año⁻¹, por lo que los valores de evapotranspiración potencial son superiores a los de precipitación en más de 6 meses al año (Martín Peinado, 2001). El régimen de temperatura es térmico y el de humedad es xérico (USDA, 1999). Según la clasificación de Rivas (1987), el clima es mediterráneo con sequía en época de verano.

2.1.3 Suelos

Los principales grupos de suelos que se pueden encontrar en estas zonas son Fluvisoles y Regosoles, según WRB (IUSS, 2015) o Entisoles, según SSS (2014). En todos los casos, los suelos afectados por el vertido presentan un escaso desarrollo edáfico, cuyos perfiles presentan una escasa diferenciación de horizontes, con una secuencia típica A-C. Al estar localizados en una posición fisiográfica de llanura aluvial, se caracterizan por tener discontinuidades texturales en profundidad y un contenido variable en carbono orgánico. Dado este carácter aluvial, tienen una alta fertilidad e influencia antrópica, por lo que antes del vertido, los usos principales de los suelos eran agrícolas (frutales, árboles y cereales) y para pastoreo (Cabrera *et al.*, 1999; Martín Peinado, 2001).

En la actualidad, los suelos muestreados a lo largo del CVG, siguen manteniendo su carácter aluvial y bajo grado de desarrollo. Las principales características analizadas en los 10 cm superiores del suelo indican que la textura varía de arcillo limosa a franca, el pH varía entre neutro a ligeramente alcalino (7.2-8.3), la CE va de 0.6 a 1.9 dSm⁻¹, el porcentaje de CaCO₃ fluctúa entre 3.2 a 13.6 y el de CO entre 1.7 y 2.0 % (Pastor-Jáuregui *et al.*, 2021).

2.1.4 Relieve

El relieve del área se caracteriza por una topografía suave asociada con las cuencas de los ríos Agrio y Guadiamar. La mayor cota (45 m.s.n.m) se encuentra en la zona norte y la menor (2 m.s.n.m) próxima al Parque Nacional de Doñana. Los valores extremos de la pendiente media se encuentran cerca

de la mina (0.2%) y en la parte final o zona de marismas (0.02%). El resto del CVG presenta una pendiente media de 0.1% (Martín Peinado, 2001).

La microtopografía fue relativamente importante en el momento del vertido, ya que favoreció la distribución irregular del lodo sobre la superficie de los suelos. Las labores de retirada de lodos y suelos contaminados con maquinaria pesada, modificó totalmente esta microtopografía, por lo que la superficie de los suelos se homogeneizó de forma significativa para favorecer la revegetación de la zona afectada.

2.1.5 Vegetación

Antes del vertido, el uso del área de estudio era principalmente agrícola, predominando los cultivos herbáceos y los arrozales y solo el 4 % del área afectada correspondía a vegetación natural, principalmente de ribera. Entre los restos de vegetación se conservaron ejemplares arbóreos y arbustivos de especies autóctonas tales como fresnedas (*Fraxinus angustifolia*), alamedas (*Populus alba*), choperas (*Populus nigra*), olmedas (*Ulmus minor*) y saucedas (*Salix purpurea* y *Salix atrocinerea*) (Martín Peinado, 2001).

Tras las acciones de remediación, las principales especies arbóreas y arbustivas introducidas en la fitoestabilización fueron: *Populus alba*, *Celtis australis*, *Fraxinus angustifolia*, *Quercus ilex*, *Olea europaea*, *Ceratonia siliqua* y *Pinus pinea* (Pastor-Jáuregui *et al.*, 2020), al tiempo que se favoreció el crecimiento de especies arbustivas y anuales mediante mecanismos de dispersión natural de semillas de la vegetación próxima al CVG.

2.2 Muestreo de suelos

La fase de toma de muestras, en este tipo de estudios de contaminación de suelos es una etapa fundamental, ya que el modo, tipo y cantidad del muestreo pueden condicionar los resultados posteriores. Para muchos autores es la etapa más importante del análisis de suelos, ya que por muy buenas que sean las técnicas analíticas empleadas, los resultados no son válidos si no son representativos de la zona y del material a analizar (Martín Peinado, 2001).

El método de muestreo de los suelos utilizado en este trabajo fue el mismo que se utilizó en estudios anteriores. Se muestrearon, a lo largo del área afectada, 84 parcelas georreferenciadas (10 x 10 m), distribuidas homogéneamente. Se tomaron muestras compuestas (de las cuatro esquinas y del centro de cada parcela) a profundidades de 0 a 10 cm, 10 a 30 cm y 30 a 50 cm, mezclando y homogeneizando las 5 muestras, para obtener una muestra representativa por profundidad, cada 100 m², tal como se indica en el protocolo de muestreo (Simón *et al.*, 2008), dando un total de 252 muestras (Figura 2.2 y Figura 2.3).



Figura 2.2 Muestreo de la zona de estudio

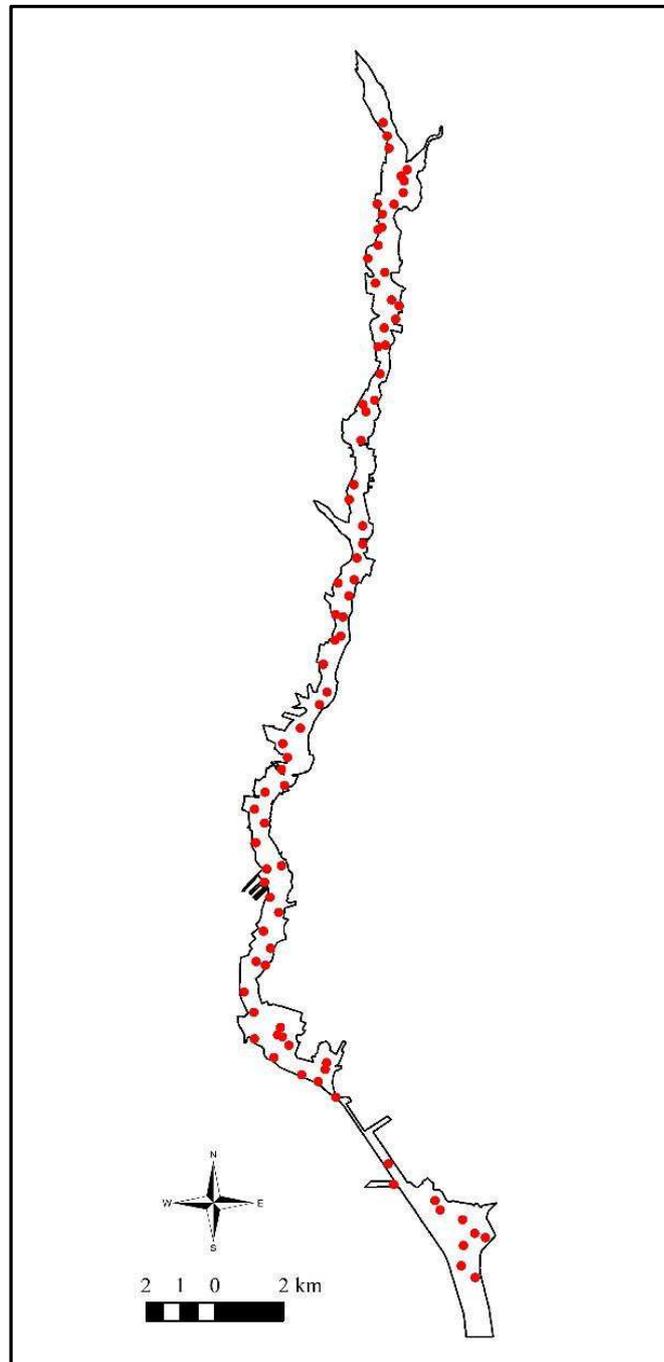


Figura 2.3 Zonas de muestreo en el CVG

2.3 Métodos analíticos

Todas las muestras se llevaron al laboratorio, donde se extendieron y se secaron al aire. Tras de la homogeneización y una molienda suave para romper los agregados de suelo, las muestras se tamizaron con malla de 2 mm para la obtención de la fracción tierra fina, necesaria para los análisis. De cada muestra de tierra fina se prepararon muestras finamente molidas (<0.05 mm) en molino de bolas, para la realización de algunos análisis específicos.

2.3.1 Análisis de las propiedades edáficas de los suelos

Las propiedades fisicoquímicas de los suelos y sus componentes se determinaron de acuerdo con métodos oficiales de análisis (MAPA, 1994) en los laboratorios del Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Granada.

➤ Textura

La distribución del tamaño de las partículas se realizó mediante el método de la pipeta de Robinson (USDA, 1972), después de la eliminación de la materia orgánica con peróxido de hidrógeno (H₂O₂), la dispersión de muestras con hexametáfosfato de sodio y agitación mecánica por volteo (Loveland y Whalley, 1991).

El método consiste en introducir una cantidad de suelo (20 g) disperso en agua en una probeta de 1000 ml, con tapón. Después de agitar, al cabo de unos determinados tiempos (según la Ley de Stokes), se extraen alícuotas de 20 ml a una profundidad fija (10 cm). En primer lugar, se extraen las partículas <0.05 mm (limos gruesos y finos + arcillas); en segundo lugar, las partículas <0.02 mm (limos finos + arcillas); por último, las arcillas (<0.002 mm). Luego se secan y pesan las alícuotas para obtener el porcentaje de cada fracción.

➤ **pH**

Previa calibración con soluciones tampón, se midió potenciométricamente en un equipo 914 pH/Conductometer Metrohm, en una suspensión suelo:agua, en razón 1:2.5.

El método potenciométrico se basa en que, al introducir un electrodo de referencia, que contiene una solución de iones H^+ con una actividad determinada, en una solución de pH desconocido, desarrolla un potencial eléctrico proporcional a la diferencia de pH entre ambas soluciones.

➤ **Conductividad eléctrica (CE)**

La conductividad eléctrica se midió con conductivímetro, previamente calibrado, en un equipo 914 pH/Conductometer Metrohm, en el extracto de la pasta saturada y en suspensión suelo:agua, en razón 1:5. La CE se expresa en decisiemens por metro ($dS\ m^{-1}$).

El conductivímetro es un puente de Wheatstone en el que una de las resistencias corresponde a la de la solución problema, mientras que la otra es variable y permite igualar los potenciales de forma que por el galvanómetro no pase corriente.

➤ **CaCO₃ equivalente**

Se utilizaron muestras finamente molidas y se determinó por el método volumétrico (Barahona, 1984). Se midió la cantidad de CO₂ desprendido al reaccionar los carbonatos del suelo con un ácido fuerte (HCl 1:1) en recipiente hermético y lectura de la presión de CO₂ liberada en manómetros de agua y de mercurio. Los resultados se expresan en % CaCO₃.

Al volcar el frasco que contiene el HCl se observa la reacción que ocurre en el suelo. Si se aprecia efervescencia se mide el despedazamiento en la columna de mercurio, en caso contrario se mide en la columna de agua, comparando los desplazamientos con un patrón de carbonato cálcico conocido.

➤ **Carbono orgánico (CO)**

Se utilizaron muestras finamente molidas y se determinó por el método volumétrico de oxidación ácida (Tyurin, 1951). El resultado (% C) se multiplica por 1.17 para obtener el % CO.

El método consiste en la oxidación de la materia orgánica del suelo mediante un oxidante añadido en exceso (dicromato potásico) y posteriormente se valora la cantidad de dicromato sobrante con sal de Mohr ($\text{Fe}(\text{SO}_4)(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$).

➤ **Carbono (C_T) y nitrógeno (N_T) total**

Se utilizaron muestras finamente molidas y se procesaron mediante combustión seca a 950 °C, en un analizador automático TruSpec CN (LECO®). Los resultados se expresan en % C_T y % N_T .

➤ **Óxidos libres y amorfos de hierro, aluminio y manganeso**

Los compuestos libres de hierro, aluminio y manganeso (Fe_d , Al_d , Mn_d), se extrajeron con una solución de ditionito sódico y citrato sódico (Holmgren, 1967), que es un buen estimador de la cantidad de Fe, Al y Mn presente en forma de óxidos lábiles, cristalinos, formas inorgánicas no cristalizadas y el orgánicamente acomplejado.

Los compuestos amorfos de hierro, aluminio y manganeso (Fe_o , Al_o , Mn_o), se extrajeron con una solución de ácido oxálico y oxalato amónico a pH 3 (Schwertmann y Taylor, 1977). Este reactivo actúa sobre formas amorfas de la fracción arcilla de los suelos, además de solubilizar los compuestos organometálicos y extraer formas no cristalinas y pobremente ordenadas.

Los extractos obtenidos en ambos análisis se midieron mediante espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES), en un espectrómetro Perkin Elmer Optima 8300, perteneciente al Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada.

2.3.2 Análisis de elementos potencialmente contaminantes en los suelos (EPCs)

Para evaluar la concentración, el grado de movilidad y biodisponibilidad de los elementos potencialmente contaminantes en suelos se realizaron las siguientes pruebas:

➤ Concentraciones totales

La concentración total de EPCs se analizó en muestras finamente molidas por fluorescencia de rayos X (XRF) con un analizador portátil NITON XL3t-980 GOLDD+ (Niton, Billerica, USA). La precisión y exactitud de este método se realizó a partir de la medición, con 6 réplicas, de un material de referencia certificado (CRM 052-050 RT-Corporation Limited, Salisbury, Reino Unido), obteniendo los siguientes resultados (*certificados* vs *medidos*, valores medios en mg kg⁻¹ y error estándar entre paréntesis): Pb: 82.6 (4.0) vs 92.6 (4.8); As: 14,6 (2,9) vs 15.5 (3.9); Zn: 89.0 (4.0) vs 94.4 (6.2); Cu: 44.2 (6.9) vs 48.5 (8.0). Para todos casos, los valores medidos estuvieron dentro del intervalo de confianza del valor certificado.

Las concentraciones de elementos totales se evaluaron según los niveles genéricos de referencia (NGR) establecidos por la Junta de Andalucía para declarar un suelo contaminado (BOJA, 2015).

➤ Solubilidad y disponibilidad de los contaminantes

Las concentraciones solubles en agua de los contaminantes se determinaron en suspensión 1:5 (suelo:agua), los extractos obtenidos se acidificaron con HNO₃ concentrado antes de su análisis, según Sposito *et al.* (1982). Las formas potencialmente biodisponibles de los contaminantes también se determinaron en suspensión 1:5 (suelo:agua) y se extrajeron con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0.05 M a pH 7.0 de acuerdo con Quevauviller *et al.* (1998).

Los elementos extraídos, tanto solubles como potencialmente biodisponibles, se midieron mediante espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), en un espectrómetro Perkin Elmer SCIEX ELAN-5000A (Waltham, MA, USA), perteneciente al Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada. La precisión del método fue corroborada, con 6 réplicas, por análisis de un material de referencia estándar (SRM 2711), obteniendo los siguientes resultados (*certificados vs medidos*, valores medios en mg kg⁻¹ y error estándar entre paréntesis): Pb: 1162.0 (31.0) vs 1138.1 (11.0); As: 105.0 (8.0) vs 102.4 (1.1); Zn: 350.4 (4.8) vs 350.3 (3.4); Cu: 114.0 (2.0) vs 115.0 (1.6). En todos los casos, los valores medidos estuvieron dentro del intervalo de confianza del valor certificado.

2.3.3 Test de toxicidad con organismos vivos

Para evaluar el grado de toxicidad de los suelos potencialmente contaminados se aplicaron bioensayos a los suelos, siguiendo los protocolos normalizados, en los laboratorios del Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Granada.

➤ Bioensayo con *Lactuca sativa* L.

Se realizó para evaluar los efectos fitotóxicos, a corto plazo, sobre la germinación y la elongación radicular de semillas de lechuga en los primeros cinco días de crecimiento según recomendaciones de USEPA (1996) y protocolo de la OECD (2003). De cada muestra de suelo (< 2 mm), se obtuvo el extracto de saturación después de 24 horas de contacto y extraído con bomba de vacío. En placas Petri, con papel filtro en la parte inferior, se colocaron 20 semillas de *Lactuca sativa* L. y se pusieron en contacto con 5 ml del extracto de la pasta saturada. Las semillas se incubaron a 25 ± 1 °C, durante 5 días, midiéndose luego la longitud de las raíces germinadas. Se utiliza como control 3 placas con 20 semillas y humectadas con agua destilada. Finalmente se calcula el porcentaje de la elongación de la radícula en comparación con las muestras control, de manera que los valores varían de 0 (toxicidad máxima) a 100 (sin toxicidad).

➤ **Bioensayo con *Eisenia andrei***

Se realizaron ensayos de supervivencia en lombrices de tierra (*Eisenia andrei*), de acuerdo con el protocolo OECD (2015). Los organismos fueron analizados en cuanto a supervivencia y diferencia de peso tras un periodo de incubación de 4 semanas en los suelos de estudio; además, se analizó la reproducción (número de juveniles) tras 8 semanas de tiempo de contacto en estos suelos.

En cada contenedor se colocaron 500 g de suelo, humectándose a capacidad de campo 24 h antes de la adición de cinco lombrices adultas, previamente lavadas, secadas y pesadas. En el centro de cada contenedor se colocó, como alimento, estiércol de caballo libre de fármacos. Los envases se incubaron a temperatura ambiente durante 4 semanas, controlando la humedad. Pasado este tiempo, se retiraron todas las lombrices para evaluar la supervivencia y la variación de peso. Cada muestra de suelo se repitió tres veces.

Posteriormente, las muestras de suelo se incubaron durante 4 semanas más, para evaluar la reproducción. Luego, los contenedores se introdujeron en baño de agua (60 ± 2 °C), para forzar la salida a la superficie de los juveniles y poder contar el número de descendientes presentes en cada muestra.

➤ **Bioensayo de respiración basal del suelo**

Este bioensayo determina la actividad de la biomasa microbiana del suelo a partir de la cuantificación de la tasa de CO₂ emitida.

La respiración heterotrófica basal se midió siguiendo los protocolos adaptados de la respiración del suelo ISO 17155 (2012) y de transformación de carbono OECD 217 (2000), bajo condiciones controladas en el laboratorio.

Las muestras se humedecieron con agua destilada y se mantuvieron durante siete días en incubadora. Se saturaron y a continuación se llevaron a capacidad de campo (33 KPa) durante 24 horas. Luego, se pesaron entre 5-8 g de muestras en recipientes sin tapar y se introdujeron en otro recipiente cerrado en el que previamente se habían introducido 2 ml de solución de hidróxido potásico (KOH 0.2%). A las 96 horas de iniciado el ensayo se obtiene la

medida de la respiración basal ($\mu\text{g CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{suelo}}^{-1}$), utilizando un respirómetro SY-LAB μ -Trac 4200 de medida continua. Los resultados indican el promedio de la tasa de respiración del suelo por unidad de tiempo y masa de suelo.

El carbono de la biomasa microbiana ($\mu\text{g C}_{\text{microb.}} \text{ g C}_{\text{suelo}}^{-1}$) se cuantificó utilizando el método de irradiación/incubación. En primer lugar, se eliminan parte de microorganismos del suelo mediante irradiación electromagnética por calentamiento en microondas y posteriormente se incuba el suelo durante 10 días a 28°C midiéndose la cantidad de CO_2 liberado tras la incubación (Ferreira *et al.*, 1999).

El cociente metabólico ($q\text{CO}_2$) se obtiene mediante la relación entre la respiración basal del suelo, como indicador de la actividad microbiana del mismo, y el carbono de la biomasa microbiana, expresada como $\text{ng C}_{\text{CO}_2} \mu\text{g C}_{\text{microb}}^{-1} \text{ h}^{-1}$, de acuerdo con Anderson y Domsch (1993).

2.3.4 Riesgos para la salud humana

El riesgo potencial de exposición a EPCs para niños y adultos en el CVG se estima en base a modelos empíricos propuestos por la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (USEPA), considerando las vías de exposición por ingestión, inhalación y contacto dérmico.

Para evaluar el riesgo por **ingestión** se realiza el análisis de bioaccesibilidad, de acuerdo al procedimiento de la USEPA (2017b). Luego de secar y tamizar a $150 \mu\text{m}$, se agita durante 1 hora 1 g de muestra de suelo con 100 ml de fluido de extracción (glicina 0.4 M) ajustado con ácido clorhídrico concentrado a $\text{pH } 1.50 \pm 0.05$ a 37°C . Se preparan tres blancos de control, con solo el fluido de extracción. Se utiliza la temperatura de 37°C porque es aproximadamente la temperatura del fluido gástrico en humanos y para este propósito, las muestras se colocan en un baño de agua a esta temperatura ($\pm 2^\circ\text{C}$). Los valores de pH gástrico humano tienden a oscilar entre 1 y 4 durante el ayuno y se selecciona un pH de 1.5 debido a que las mayores cantidades de EPCs se extraen a ese pH, en comparación con pH más altos (USEPA, 2007a; Brattin *et al.*, 2013;

USEPA, 2017b). Se utiliza un tiempo de extracción de 1 hora porque es aproximadamente el tiempo que el material ingerido está presente en el estómago (tiempo de vaciado) de un niño, particularmente cuando se asume un estado de ayuno (USEPA, 2007b). El sobrenadante se separa de la muestra mediante filtración y se analiza la concentración de EPCs mediante un espectrómetro ICP-MS (PE SCIEX ELAN-5000A), en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada. Los resultados se expresan como la concentración (mg g^{-1}) del elemento potencialmente bioaccesible en el suelo después de la digestión gástrica.

Para estimar la dosis potencial diaria promedio de ingestión de suelo y polvo de un contaminante (DDPing) se utiliza la siguiente ecuación (USEPA 2017a):

$$\text{DDPing} = C_g \times \text{Ing} \times \text{FE} \times \text{DE} / (\text{PC} \times \text{TE})$$

Donde:

DDPing = dosis potencial diaria promedio ($\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$)

C_g = concentración extraíble del contaminante después de la digestión gástrica (mg kg^{-1})

Ing = tasa de ingestión (kg día^{-1})

FE = frecuencia de exposición (días año^{-1})

DE = duración de la exposición (año)

PC = peso corporal medio (kg)

TE = tiempo promedio de exposición (día)

La evaluación del riesgo para el ser humano de la **inhalación** de EPCs se realiza según el procedimiento descrito en Islam *et al.*, 2016. Las muestras se tamizan a $50 \mu\text{m}$, para obtener el diámetro de las partículas que podrían ser inhaladas, debido a que estas partículas son más fácilmente transportadas en suspensión por el viento (Sehmel, 1980). En niños, el polvo es una importante fuente de exposición a metales por ingestión debido al contacto con la boca. Para estimar la dosis potencial diaria promedio de inhalación de un contaminante (DDPinh) se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{DDPinh} = C_{\text{polvo}} \times \text{Inh} \times \text{FE} \times \text{DE} / (\text{PC} \times \text{TE} \times \text{FEP})$$

Donde:

DDP_{inh} = dosis potencial diaria promedio (mg kg⁻¹ día⁻¹)

C_{polvo} = concentración de contaminante en el polvo que se inhala (mg kg⁻¹)

Inh = tasa de inhalación (m³ día⁻¹)

FE = frecuencia de exposición (día año⁻¹)

DE = duración de la exposición (año)

PC = peso corporal medio (kg)

TE = tiempo promedio de exposición (día)

FEP = factor de emisión de partículas (m³ kg⁻¹)

La evaluación del riesgo de toxicidad para el ser humano por **contacto dérmico** se realiza con muestras finamente molidas, de acuerdo al procedimiento estándar (USEPA, 2004). Para estimar la dosis potencial diaria promedio por contacto dérmico de un contaminante (DDP_{dermal}) se utiliza la siguiente ecuación (USEPA 2017a):

$$DDP_{dermal} = C_{suelo} \times Adh \times SP \times FE \times DE / (PC \times TE)$$

Donde:

DDP_{dermal} = dosis potencial diaria promedio (mg kg⁻¹ día⁻¹)

C_{suelo} = concentración de contaminante en el suelo (mg g⁻¹)

Adh = tasa de adherencia del suelo a la piel (mg cm⁻² día⁻¹)

SP = superficie de la piel disponible para contacto (cm²)

FE = frecuencia de exposición (día año⁻¹)

DE = duración de la exposición (año)

PC = peso corporal medio (kg)

TE = tiempo promedio de exposición (día)

La concentración total de EPCs, para la evaluación del riesgo por inhalación y por contacto dérmico, se determina por fluorescencia de rayos X (XRF), con un analizador portátil NITON XL3t-980 GOLDD+ (Niton, Billerica, EE.UU.).

Para evaluar los riesgos para la salud humana, para los tres casos, el tiempo promedio (TE) es la cantidad de tiempo durante el cual se promedia la exposición y es igual a la duración de la exposición (DE).

Los valores de los parámetros para la estimación de la exposición humana a elementos peligrosos utilizados en este estudio se presentan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Valores de los parámetros para la estimación de la exposición humana a elementos peligrosos en los suelos del CVG (USEPA, 2002; Islam *et al.*, 2016)

Sigla	Parámetro	Unidades	Niños	Adultos
Ing	Tasa de ingestión	g día ⁻¹	0.2	0.1
Inh	Tasa de inhalación	m ³ día ⁻¹	20	20
Adh	Tasa de adherencia a la piel	mg cm ⁻² día ⁻¹	0.2	0.007
SP	Superficie piel para contacto	cm ²	2800	3300
FE	Frecuencia de exposición	día año ⁻¹	75	75
DE	Duración de la exposición	año	6	30
PC	Peso corporal medio	kg	15	65
TE	Tiempo promedio de exposición	día	DE x 365	DE x 365
FEP	Factor de emisión de partículas	m ³ kg ⁻¹	1.36 x 10 ⁹	1.36 x 10 ⁹

El riesgo potencial de exposición a EPCs para niños y adultos se determina mediante el coeficiente de peligrosidad (CP), de acuerdo a USEPA (1989):

$$CP = DDP_x / DcR_x$$

Donde:

CP = coeficiente de peligrosidad del elemento potencialmente tóxico

DDP_x = dosis potencial diaria promedio de las tres vías de exposición (mg kg⁻¹ día⁻¹), para el elemento considerado

DcR_x = dosis crónica de referencia de las tres vías (mg kg⁻¹ día⁻¹), para el elemento considerado

De los cálculos, si CP > 1, podría suponer riesgo para la salud.

2.4 Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron para comprobar su distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de la varianza se analizó usando la prueba de Levene. En el caso de cumplir con ambos supuestos, los datos fueron analizados utilizando el test de comparación de medias paramétricas (ANOVA) y se utilizó la prueba post hoc de Tukey para determinar las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las variables independientes consideradas. En caso de no cumplir la prueba de normalidad y/o la homogeneidad de las varianzas, se realizaron pruebas no paramétricas con Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

A partir de los datos analíticos se realizó una división por sectores y se agruparon las muestras de suelos según sus propiedades (pH, CE, CaCO_3 y CO). La agrupación se realizó con un análisis de conglomerados jerárquicos (clúster). Para determinar la relación entre las distintas variables de estudio se calcularon los coeficientes de correlación por Spearman.

Para mostrar los valores medios de las concentraciones solubles en agua y biodisponibles de los EPCs en los diferentes períodos de muestreo, se construyeron con Excel gráficos radiales, determinando la escala de forma independiente para cada elemento. El área obtenida para cada elemento se midió con Adobe Acrobat 9.0 (Adobe Systems Incorporated, EE.UU.) y se calculó el índice de remediación del suelo (RS) a través de la relación entre la superficie de cada polígono y la superficie del polígono inicial.

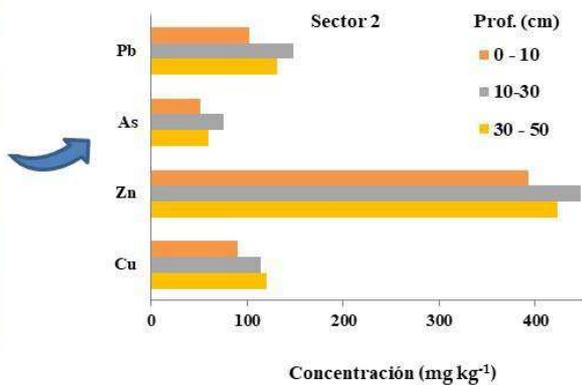
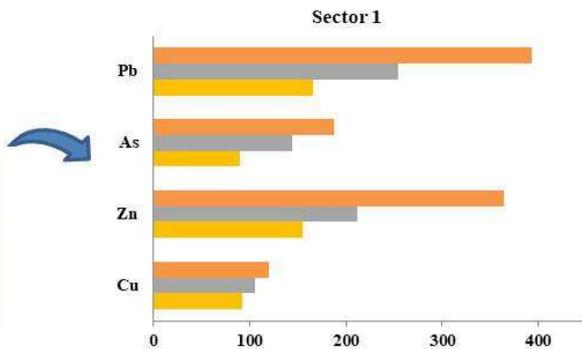
Para el bioensayo de toxicidad, se realizó un análisis de correlación de Pearson, entre el alargamiento de la raíz y las principales propiedades y contaminantes en el suelo. Las distribuciones de los datos se establecieron calculando los valores medios y las desviaciones estándar mediante el uso de curvas de distribución de frecuencia acumulada.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software SPSS v. 20.0 o v. 23.0 (SPSS Inc., EE.UU.).

CAPÍTULO 3

Evolución de la contaminación residual en suelos, después de tratamientos de biorremediación

20 años después de la fitoestabilización



3.1 Introducción

La presencia en el suelo de elementos potencialmente contaminantes (EPCs) es una preocupación creciente y ubicua en todo el mundo. De acuerdo con He *et al.* (2015), existen más de 10 millones de sitios contaminados en todo el mundo relacionados con fuentes y actividades antropogénicas; por ejemplo, 137 000 km² de tierras agrícolas en Europa necesitan una evaluación local y una acción de remediación eventual en relación con las concentraciones de metales pesados (Tóth *et al.*, 2016).

La restauración de suelos contaminados afectados por metales pesados y elementos relacionados es un gran desafío que, en muchos casos, concluye con resultados incompletos (Khalid *et al.*, 2017). La eliminación total de estos suelos contaminados es muy difícil debido a las reacciones entre los contaminantes y las propiedades del suelo y los componentes que producen la precipitación o la inmovilización de estos EPCs en la matriz del suelo (Rodríguez-Eugenio *et al.*, 2018).

Las acciones correctivas para eliminar estos EPCs del suelo suelen ser costosas, requieren mucho tiempo o requieren la aplicación de tecnologías *ex situ* que no pueden desarrollarse en grandes áreas. Además, en muchos casos la remediación se centra en la aplicación de modificaciones para reducir la biodisponibilidad y para promover la inmovilización de contaminantes en la matriz del suelo, seguido de una estabilización del suelo superficial por vegetación, conocida como fitoestabilización (Alkorta, *et al.*, 2010), lo que implica que estas áreas aumentan las concentraciones de fondo de EPCs en relación con los valores previos a la contaminación. En estos casos, es necesario el monitoreo a lo largo del tiempo para evaluar la evolución de las propiedades del suelo y los posibles cambios en la movilidad y disponibilidad de contaminantes.

Pocos estudios involucran este tipo de evaluación a lo largo del tiempo en una situación real, pero en algunos casos, se detectaron posibles problemas ambientales; por ejemplo, García-Carmona *et al.* (2019a) reportaron un

aumento en la disponibilidad de Pb, As, Zn, Cu y Cd con el tiempo, 18 años después que las acciones de remediación en la zona afectada por el accidente de la mina de Aznalcóllar fueran completadas; Nakamaru y Martín (2017) también reportaron un aumento en la disponibilidad de Sb después del aumento de la materia orgánica del suelo, relacionada con la fitoestabilización en el Corredor Verde del río Guadiamar (CVG), o Zhou *et al.* (2015) señalaron que el efecto de 22 años de fertilización y cultivo aumentó la disponibilidad de Pb y Cd en los suelos.

Por lo tanto, las áreas restauradas donde las acciones de remediación involucraron la aplicación de enmiendas y la inmovilización de contaminantes en los suelos pueden conducir a una contaminación residual oculta que debe evaluarse para evitar un posible riesgo de toxicidad medioambiental o para los seres humanos.

En este trabajo se presenta el estudio de un área contaminada hace veinte años (abril 1998), por uno de los vertidos mineros más grandes del mundo (Nikolic *et al.*, 2011), el accidente minero de Aznalcóllar. Esta mina se encuentra ubicada sobre la mayor reserva de sulfuros polimetálicos de Europa (Leistel *et al.*, 1998), donde la ruptura de la balsa de estériles con altas concentraciones de EPCs (principalmente Pb, As, Zn, Cu) vertió 3.6×10^6 m³ de agua ácida y 0.9×10^6 m³ de lodos tóxicos, que afectaron un área mayor de 45 km² de suelos, principalmente de uso agrícola (Simón *et al.*, 2001).

Tras el accidente, se realizó uno de los mayores programas de restauración de suelos llevado a cabo en Europa, con implicación de la Administración Pública, Universidades y otras instituciones de investigación como el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), con un coste de 280 M€ para la recuperación del área (OECD, 2004).

Las acciones de remediación se centraron en la eliminación de los lodos y la capa superior del suelo altamente contaminada, la aplicación de enmiendas orgánicas e inorgánicas y la fitoestabilización con vegetación autóctona (Madejón *et al.*, 2018a). Las acciones de remediación finalizaron con la implementación en toda el área del CVG en 2003, designado por la Junta de

Andalucía como un "paisaje protegido", donde las actividades extractivas están prohibidas (agricultura, pastoreo, caza y pesca) y el uso principal se centró en actividades de divulgación, recreativas o ambientales.

Hoy en día, toda el área se considera restaurada, pero se detecta una evolución muy heterogénea de la recuperación de la vegetación. La mayor parte del área presenta muy buena respuesta en relación con la cubierta vegetal y la inmovilización de EPCs, pero persisten suelos contaminados que se detectan en el CVG mediante la identificación de parcelas irregulares de diferente tamaño y distribuidas aleatoriamente donde no puede crecer vegetación (Martín *et al.*, 2015).

El objetivo de este trabajo es evaluar la evolución de la contaminación y la recuperación de la vegetación en el CVG veinte años después del accidente y después de finalizadas las acciones de remediación. El trabajo se enfoca en la evaluación de los cambios en las propiedades fisicoquímicas de los suelos, tanto en muestras de superficie como en profundidad y en la evaluación de la movilidad de los EPCs aún presentes en esta área restaurada.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Muestreo de suelos

El monitoreo de la contaminación a lo largo del tiempo se realizó mediante el muestreo de 84 parcelas georreferenciadas (10 x 10 m), homogéneas y distribuidas al azar, a lo largo de toda el área afectada. Se tomaron muestras compuestas de cada profundidad (0-10, 10-30 y 30-50 cm) para obtener una muestra representativa de cada 100 m²; de acuerdo con el protocolo de muestreo diseñado, descrito por Martín Peinado (2001) y Aguilar *et al.* (2004a).

En estudios previos, Aguilar *et al.* (2004a) se indicó que, antes del accidente, el área se podía subdividir en dos sectores según las propiedades de los suelos. El sector 1 (S1) incluye suelos con pH moderadamente ácido, no o ligeramente carbonatados y de textura franca a franco arenosa, mientras que el sector 2 (S2) incluye suelos con pH básico, de moderado a altamente carbonatado y de textura franca a arcillo limosa. El sector 1 cubre los primeros 15 km aguas abajo de la mina, incluidas 20 parcelas de muestreo y el sector 2 cubre los siguientes 30 km, incluidas 64 parcelas de muestreo (Figura 3.1).

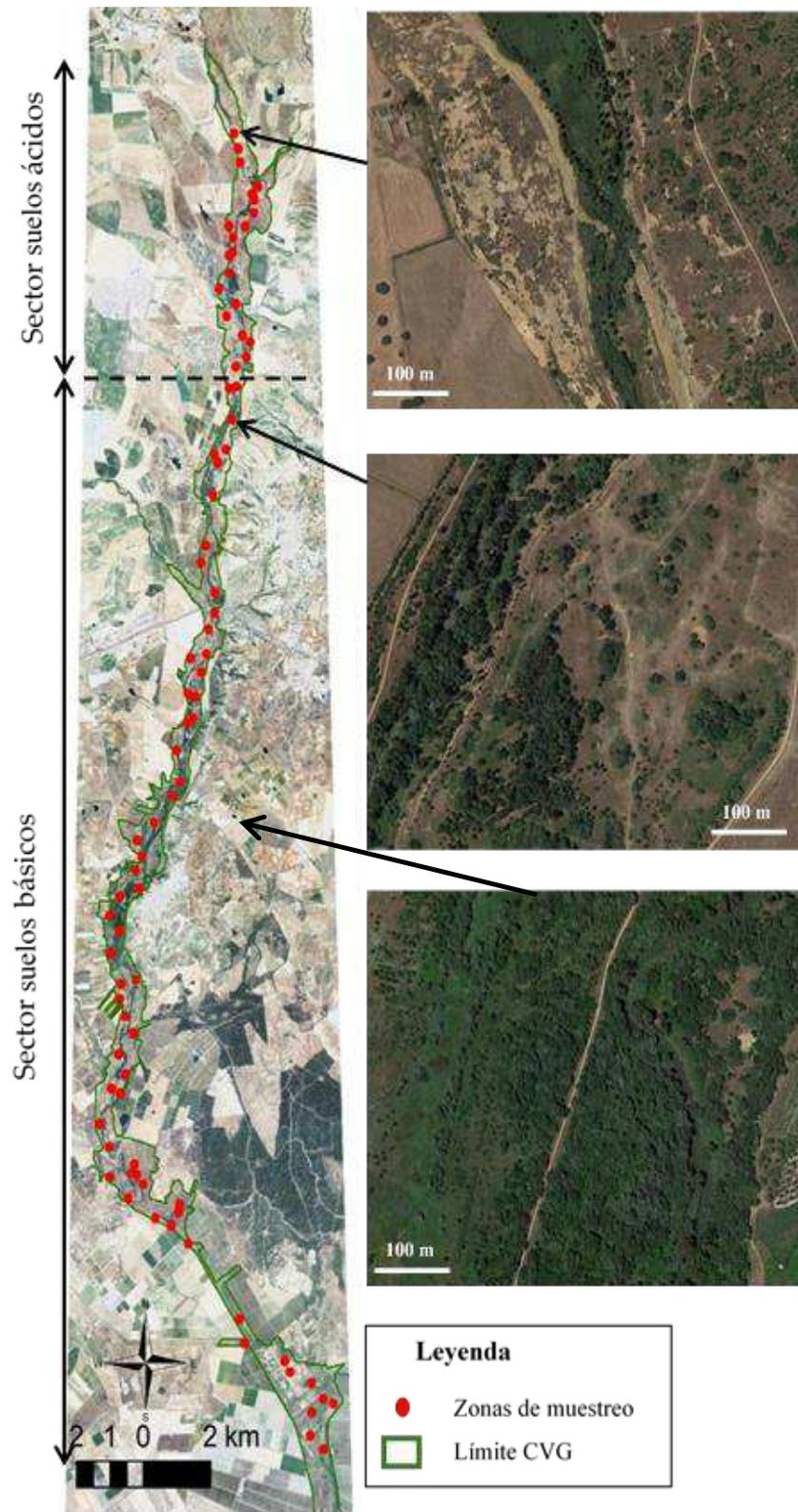


Figura 3.1. Puntos de muestreo de suelo a lo largo del CVG

3.2.2 Métodos analíticos

Todas las muestras fueron llevadas al laboratorio, secadas y tamizadas (<2 mm) antes de los análisis. Las propiedades de los suelos y sus componentes se determinaron de acuerdo con métodos oficiales de análisis de suelos (MAPA, 1994).

La concentración de EPCs (Pb, As, Cu y Zn) se analizó en muestras finamente molidas por fluorescencia de rayos X (XRF).

Los datos de las propiedades de los suelos y de la concentración de EPCs para el año 1998, se tomaron de Martín Peinado (2001).

Para la evaluación de la toxicidad de la contaminación potencial en el área, se utilizó el bioensayo con *Lactuca sativa* L., de acuerdo con las recomendaciones de la OECD (2003) y USEPA (1996).

Para más detalles en la metodología de ensayos y análisis se puede consultar el Capítulo 2.

3.2.3 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de los datos se llevaron a cabo después de evaluar el conjunto de datos para distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. El estudio de comparación de medias se realizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Tukey, donde se consideraron diferencias significativas para $p < 0.05$. Para el bioensayo de toxicidad, se realizó un análisis de correlación de Pearson, entre el alargamiento de la raíz y las principales propiedades y contaminantes en el suelo. Las distribuciones de los datos se establecieron calculando los valores medios y las desviaciones estándar mediante el uso de curvas de distribución de frecuencia acumulada. Todos los tratamientos estadísticos se realizaron con el software SPSS v. 20.0 (IBM, Armonk, NY, EE. UU.).

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Evolución de las propiedades de los suelos a lo largo del tiempo

Los suelos afectados por el vertido se relacionaron con el régimen fluvial, involucrando a los principales grupos de suelos que generalmente se encuentran en este ambiente: Fluvisoles y Regosoles (IUSS, 2015) o Entisoles, (SSS, 2014). Estos suelos generalmente se caracterizan por su bajo grado de desarrollo y alta fertilidad, dando lugar a zonas con alta influencia antrópica en las que predominan los cultivos y el pastoreo (Cabrera *et al.*, 1999; Martín Peinado, 2001).

De acuerdo con las propiedades principales de los suelos, el CVG se divide en dos sectores: sector 1 (S1), que incluyen suelos con pH moderadamente ácido (5-6), contenido medio de CaCO_3 <2% y carbono orgánico <0,9% en el horizonte superficial y el sector 2 (S2), con suelos neutros o ligeramente básicos (7-8), contenido medio de CaCO_3 alrededor del 10% y CO alrededor del 2% en el horizonte superficial (Aguilar *et al.*, 2004a).

El impacto inicial del vertido produjo una acidificación y un aumento de la CE en los 10 cm superficiales. Esto se relacionó con la oxidación de los sulfuros, generando una liberación de sulfatos complejos y la solubilización de Pb, As, Zn y Cu, que son descritos como los principales contaminantes de los suelos afectados por el accidente (Simón *et al.*, 2001).

Las acciones iniciales de remediación comenzaron con la eliminación de los lodos y la parte más alta de los suelos fuertemente contaminados, seguido de la aplicación de diferentes enmiendas orgánicas e inorgánicas para promover la mejora de las propiedades del suelo (Aguilar *et al.*, 2004b).

En este período se aplicaron técnicas de fitoextracción en parcelas experimentales en el área afectada; la principal especie utilizada fue *Brassica juncea*, pero los resultados indicaron una baja absorción total de metales

pesados en las plantas y señalaron los problemas relacionados con el uso de fitoextracción en la limpieza de sitios contaminados por elementos múltiples (Clemente *et al.*, 2005). Otros estudios desarrollados en el CVG también indicaron el bajo éxito de la técnica de fitoextracción aplicada a esta área, por lo que las acciones de restauración se centraron en la fitoestabilización o fitoinmovilización (Madejón *et al.*, 2003; Clemente *et al.*, 2005).

Veinte años después del accidente y la implementación de las medidas de recuperación y biorremediación, los suelos cambiaron significativamente en los parámetros más importantes, con diferencias en relación con las propiedades iniciales de los suelos y el sector involucrado (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Cambio en profundidad y en el tiempo de las propiedades de los suelos, media (desviación estándar), en el área afectada según los diferentes sectores

Prof (cm)	Año	Sector ácido (S1)				Sector básico (S2)			
		pH	CE (dS m ⁻¹)	CaCO ₃ (%)	CO (%)	pH	CE (dS m ⁻¹)	CaCO ₃ (%)	CO (%)
0-10	1998	5.02 a (1.86)	5.65 b (3.79)	1.51 a (4.09)	0.85 a (0.50)	7.49 A (0.55)	5.72 A (5.93)	9.58 A (5.25)	1.20 A (0.54)
	2018	7.04 b (1.66)	1.03 a (0.83)	3.41 a (5.72)	1.63 b (0.58)	8.19 B (0.35)	0.26 B (0.25)	13.72 B (6.54)	1.92 B (0.52)
10-30	1998	6.09 ab (1.98)	2.89 ab (1.57)	1.17 a (2.04)	0.80 a (0.49)	7.88 AB (0.51)	4.07 A (4.72)	9.70 AB (6.11)	1.03 A (0.47)
	2018	6.79 b (1.75)	0.99 a (0.78)	2.31 a (3.57)	0.88 a (0.28)	8.30 B (0.52)	0.25 B (0.39)	12.42 B (7.41)	1.06 A (0.32)
30-50	1998	6.69 ab (2.00)	2.17 ab (1.71)	2.10 a (5.48)	0.58 a (0.40)	8.02 B (0.45)	4.35 A (6.75)	9.81 AB (7.12)	0.94 A (0.42)
	2018	6.37 ab (1.88)	0.69 a (0.69)	2.35 a (3.97)	0.59 a (0.32)	8.32 B (0.60)	0.36 B (0.63)	11.88 AB (7.56)	0.91 A (0.29)

Las letras indican diferencias significativas entre años y profundidad, minúsculas para el sector ácido y mayúsculas para el sector básico (prueba Tukey HDS $p < 0.05$)

De esta manera, el sector ácido (S1) aumentó el pH en los 10 cm superiores de los suelos, sin diferencias significativas en la profundidad. El aumento del pH está relacionado con los tratamientos de encalado aplicados durante los primeros dos años (Aguilar *et al.*, 2004a); sin embargo, este aumento en el pH

se produjo a expensas de la disolución del CaCO_3 , que amortigua con el tiempo la oxidación de los sulfuros en los lodos que permanecieron en la matriz del suelo y que escaparon a las tareas de limpieza. Este hecho hace que no existan diferencias significativas en el contenido de CaCO_3 con el tiempo en S1, que es precisamente donde la enmienda de encalado se realizó más intensamente. El contenido de CO aumentó significativamente en los 10 cm superiores de los suelos. Este aumento de CO está directamente relacionado con el éxito de la fitoestabilización en toda el área, aunque veinte años después, el aumento de CO solo es significativo en la superficie y no se observaron diferencias en profundidad. Uno de los parámetros más sensibles a este tipo de contaminación es la CE, relacionada con la oxidación de sulfuros a sulfatos (Simón *et al.*, 2001); en este caso, la reducción de la CE a lo largo del tiempo ha sido significativa veinte años después del accidente, lo que indica una evolución positiva de los suelos, aunque todavía existen puntos con elevada salinidad en S1, que pone de manifiesto la existencia de zonas que persisten contaminadas (Martín *et al.*, 2015).

En el sector básico (S2), los cambios en las propiedades de los suelos veinte años después del accidente fueron similares a los descritos para el sector S1. Los valores iniciales de pH aumentaron mediante la adición de carbonato de calcio, pero solo afectaron significativamente a los 10 cm superiores de los suelos en este sector. El contenido de CO también aumentó en la parte superior de los suelos por los aportes de materia orgánica provenientes de la implementación de la vegetación y en general por un mayor desarrollo de la cubierta vegetal en comparación con S1 (Figura 3.2).

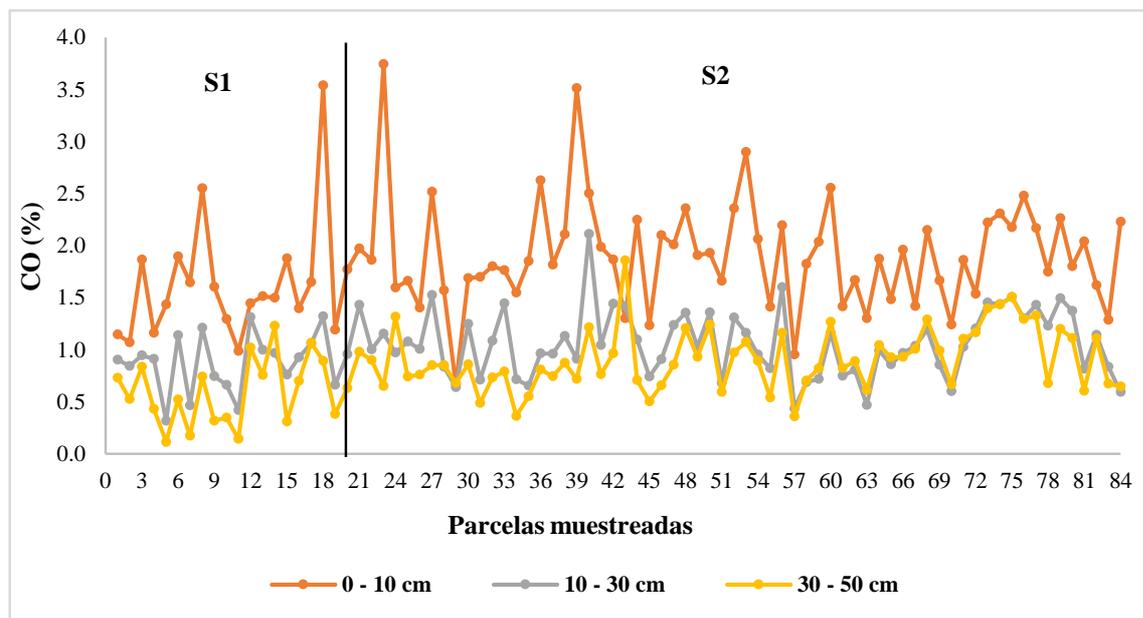


Figura 3.2. Contenido de carbono orgánico (CO) en todos los puntos de muestreo y profundidades para los dos sectores de suelo estudiados (S1 y S2)

El cambio más significativo en este sector afectó a la CE; en este caso, los valores medios iniciales fueron superiores a 4 dS m^{-1} en todas las profundidades estudiadas, y veinte años después de los tratamientos de recuperación y biorremediación, los valores medios disminuyeron significativamente por debajo de 0.4 dS m^{-1} para las tres profundidades consideradas.

La disminución de la CE a lo largo del tiempo en este tipo de contaminación se considera un indicador del grado de recuperación (García-Carmona *et al.*, 2017), la reducción significativa de S2 en relación con S1 podría estar relacionada con la mejor evolución de los suelos en el S2 e indicar la presencia de contaminación residual en los suelos del S1.

3.3.2 Concentración de contaminantes en los suelos

La concentración de EPCs en los suelos, veinte años después del accidente y completadas todas las medidas de remediación, indicó diferencias significativas en profundidad y entre sectores, dependiendo del elemento considerado (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Media (desviación estándar) de la concentración total (mg kg^{-1}) de EPCs en los suelos, veinte años después del accidente, a diferentes profundidades y en los dos sectores estudiados (S1 y S2)

Prof (cm)	Pb		As		Zn		Cu	
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
0-10	393.92 aA (369.89)	101.75 aB (75.76)	188.20 aA (135.67)	51.42 aB (39.79)	364.71 aA (246.05)	392.94 aA (210.18)	119.72 aA (73.91)	89.41 aB (46.44)
10-30	254.22 abA (182.88)	148.15 aB (157.38)	143.91 abA (94.34)	75.20 aB (82.44)	212.58 bA (128.71)	447.10 aB (260.50)	105.66 aA (73.80)	114.28 abA (63.62)
30-50	166.04 bA (112.04)	130.77 aA (100.84)	90.40 bA (71.96)	59.86 aB (43.21)	154.93 bA (105.99)	422.94 aB (301.69)	92.48 aA (70.72)	120.14 bA (67.92)

Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre las profundidades y las letras mayúsculas entre sectores (prueba Tukey HDS $p < 0.05$)

Los elementos menos móviles (Pb y As) tienen la concentración más alta en S1, especialmente en los 10 cm superiores de los suelos; mientras que los elementos con mayor movilidad en los suelos (Zn y Cu) mostraron menos diferencias entre sectores y tendencia a aumentar su concentración en profundidad, principalmente de 10 a 50 cm en S2.

En el sector ácido (S1), todos los elementos tienden a disminuir en profundidad, excepto el Cu que no presenta diferencias significativas entre los tres niveles considerados. Para Pb y As, esta reducción es gradual y solo se observaron diferencias significativas al comparar muestras de 0-10 cm con 30-50 cm de profundidad; mientras que, para el Zn, esta reducción fue significativa a 10 cm de profundidad. Este comportamiento se describió previamente y se relacionó con las propiedades de los suelos y el clima, lo que indica que bajo condiciones ácidas y la alta evapotranspiración en el área (Simón *et al.*, 2002), la tendencia de los EPCs se concentra en la parte más alta de los suelos (Martín *et al.*, 2007).

En el sector básico (S2), los elementos se comportan de manera diferente. En estos suelos, los elementos se infiltraron en la matriz del suelo debido a la contaminación y la oxidación ácida de los lodos, pero la presencia de una alta concentración de carbonatos en estos suelos produce la precipitación de la

mayoría de los elementos en profundidad y evita su ascenso a la superficie a pesar de la intensa evapotranspiración en la zona.

La comparación de la concentración de EPCs medida en suelos no contaminados (SNC) en el área (Simón *et al.*, 1999), indicó un aumento significativo en los 10 cm superiores de los suelos en la mayoría de los casos (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Concentración de EPCs de SNC del área (Simón *et al.*, 1999) y veces en que se superan estos valores en los sectores ácido (S1) y básico (S2), en los 10 cm superficiales

Elemento	SNC (mg kg ⁻¹)	S1 (veces por encima de SNC)	S2
Pb	41.8	9.4	2.4
As	18.1	10.4	2.8
Zn	230.8	1.6	1.7
Cu	40.1	3.0	2.2

Estas concentraciones indican que los suelos considerados como recuperados veinte años después del accidente en el CVG, presentan concentraciones de EPCs por encima de los niveles de fondo, a pesar de las medidas de remediación. Los suelos del sector S1 tienen altas concentraciones de Pb y As que deben ser controlados (García-Carmona *et al.*, 2019a), con valores superiores alrededor de 10 veces las concentraciones de fondo en los suelos no contaminados en la zona; Zn y Cu en ambos sectores y As y Pb en S2 tienen concentraciones superiores a las de los SNC, pero las diferencias son menos acusadas que las anteriores.

La concentración total de EPCs en el área puede presentarse como curvas de distribución de frecuencia acumulada (Figura 3.3) para evaluar el grado de recuperación de los suelos e indicar la presencia de suelos potencialmente contaminados en el CVG, calculando el porcentaje de suelos que exceden los valores para declarar un suelo como contaminado, establecidos por la Junta de Andalucía.

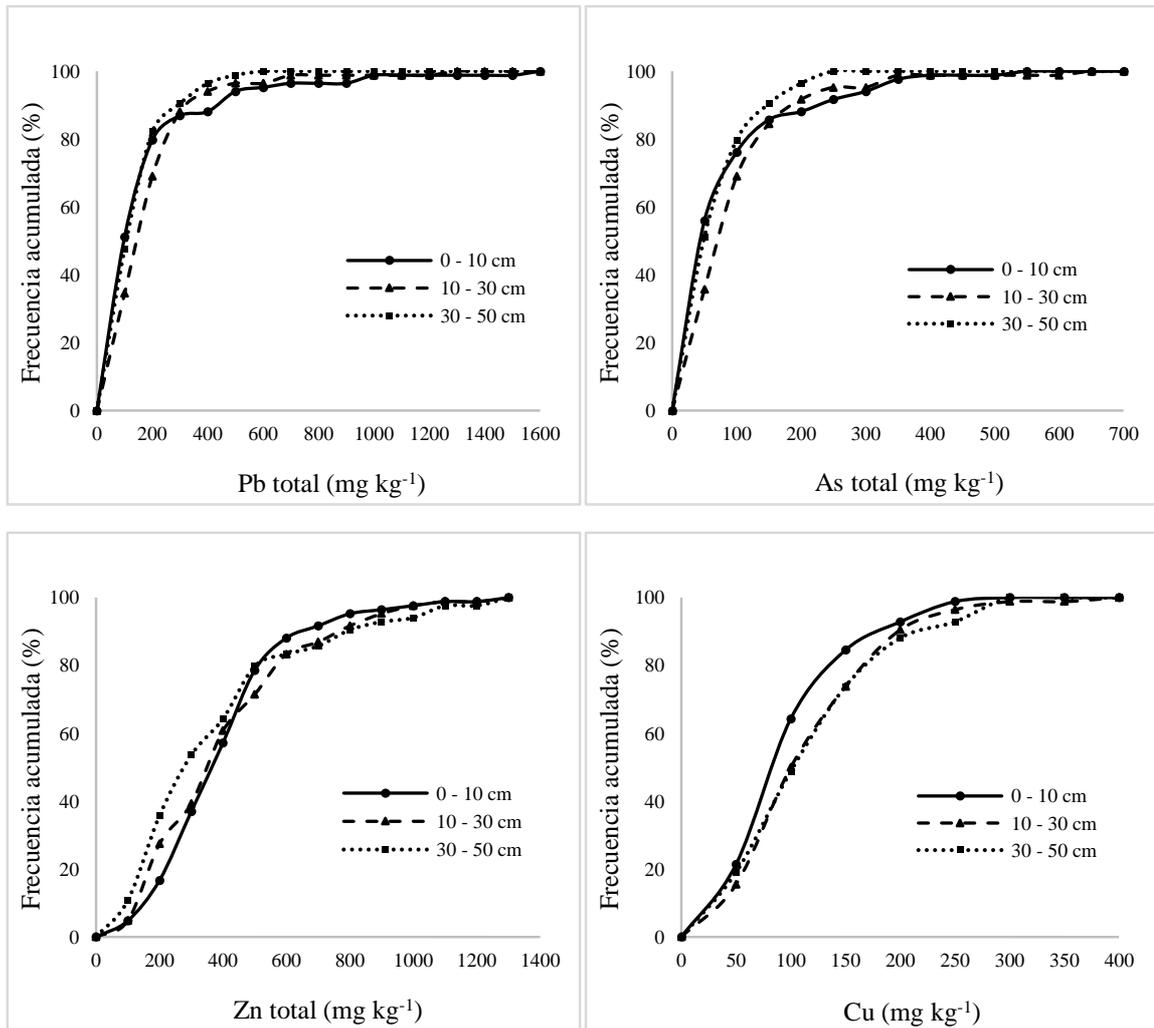


Figura 3.3. Curvas de distribución de frecuencia acumulada de los principales EPCs, veinte años después del accidente y en las tres profundidades estudiadas

Este riesgo potencial fue calculado previamente por Simón *et al.* (2009) y según los umbrales recomendados por la Junta de Andalucía en 1999, fijados en 1000 mg kg^{-1} para Pb, 100 mg kg^{-1} para As, 1000 mg kg^{-1} para Zn y 500 mg kg^{-1} para Cu (Galán *et al.*, 2002), el 30% de los suelos para As y el 20% para Zn excedieron los valores propuestos.

En los años siguientes, estos umbrales se revisaron de acuerdo con la metodología de evaluación de riesgos propuesta por la UE (Ferguson *et al.*, 1998), considerando las fuentes, los receptores, el riesgo de exposición y las vías, y el Gobierno Regional aprobó los valores regulatorios actuales en 2015

(BOJA, 2015), que fueron muy diferentes de los anteriores: 275 mg kg⁻¹ para Pb, 36 mg kg⁻¹ para As, 10000 mg kg⁻¹ para Zn y 595 mg kg⁻¹ para Cu.

De acuerdo con estos valores reguladores y las concentraciones medias medidas en los suelos, no se detectaron riesgos potenciales relacionados con Zn y Cu. En el caso de Pb, alrededor del 13 % de los suelos estudiados excedieron el valor regulatorio a 0-10 y 10-30 cm de profundidad y alrededor del 11% considerando la profundidad de 30-50 cm. El As es el elemento que presentó el mayor riesgo de contaminación potencial en todas las profundidades, con alrededor del 70% de los suelos estudiados, excediendo el valor regulatorio a 0-10 y 30-50 cm de profundidad y alrededor del 80% a 10-30 cm de profundidad.

Estos resultados indican un riesgo potencial de contaminación en el área, pero la evaluación realizada utilizando las concentraciones totales es solo indicativa y debe monitorearse en relación con la evolución de la vegetación en el área y de acuerdo con los bioensayos de toxicidad (Romero-Freire *et al.*, 2014).

De todos modos, el uso del área está restringida desde que ocurrió el accidente, por lo que la agricultura, la caza o el pastoreo están prohibidos y solo se permiten actividades recreativas en el CVG. El monitoreo del área ha seguido evaluando el riesgo de dispersión de la contaminación residual en la zona y se ha comprobado que se ha reducido notablemente en el tiempo (Martín *et al.*, 2015). Además, otros estudios indicaron que la lixiviación de la mayoría de los elementos móviles se minimizó con el tiempo, ya que la concentración de EPCs a 100 cm de profundidad era cercana o incluso inferior a la de los suelos no afectados, por lo que se desestimó el riesgo de contaminación del agua subterránea (Burgos *et al.*, 2013). Por otro lado, el riesgo de toxicidad para los caballos que pastan en el CVG (el único ganado que puede ingresar al área) fue evaluado por Madejón *et al.* (2009), analizando los EPCs en las crines y en el estiércol de los caballos, no obteniendo diferencias significativas en las concentraciones entre los caballos que pastaban en el CVG y caballos con pastos control.

Las principales especies de plantas introducidas en el área promovieron dos funciones principales: por un lado, cubrieron los suelos desnudos, proporcionando cobertura vegetal que reduce la erosión del suelo y el riesgo de dispersión de contaminantes en la fase sólida por las aguas de escorrentía (Murillo *et al.*, 2005; Domínguez *et al.*, 2015); por otro lado, el establecimiento de vegetación cambió las propiedades de los suelos y redujo la movilidad y la disponibilidad de EPCs en los suelos afectados (Moreno-Jiménez *et al.*, 2011; Madejón *et al.*, 2018b).

Las principales especies de árboles introducidas en la fitoestabilización de la zona fueron: *Populus alba*, *Celtis australis*, *Fraxinus angustifolia*, *Quercus ilex*, *Olea europaea*, *Ceratonia siliqua* y *Pinus pinea*, siendo *C. australis*, *F. angustifolia* y *P. alba*, las especies más efectivas para reducir la disponibilidad de EPCs en el suelo (Madejón *et al.*, 2018b), basada en la acumulación de contaminantes en el sistema radicular y la baja transferencia de EPCs de las raíces a las hojas.

El uso de arbustos también se implementó en la biorremediación del área, siendo las especies más utilizadas *Myrtus communis*, *Retama sphaerocarpa*, *Rosmarinus officinalis* y *Tamarix gallica*; en este caso, la transferencia del suelo a la parte aérea de las plantas fue baja y la disminución de la disponibilidad de EPCs en los suelos se promovió en la mayoría de los casos, destacando a *R. sphaerocarpa* como la especie más adecuada para fitoestabilizar los suelos del CVG (Murillo *et al.*, 2005; Moreno-Jiménez *et al.*, 2011).

Además, se recomienda el uso de arbustos como plantas nodrizas para mejorar y favorecer el crecimiento de los árboles y la fitoestabilización de la zona en condiciones mediterráneas (Domínguez *et al.*, 2015). Por lo tanto, la implementación de la fitoestabilización en el área presentó una evolución positiva por el aumento en el porcentaje de cobertura vegetal y diversidad (García-Carmona *et al.*, 2019a).

No se han encontrado estudios previos de fitoestabilización a tan largo plazo (20 años) para esta área de estudio, en relación con la evaluación de toxicidad.

La alta concentración de Pb y As en algunos sectores del área recuperada, junto con el extenso crecimiento de la vegetación, requiere el monitoreo de la transferencia de EPCs del suelo a la planta y la evaluación de la toxicidad potencial mediante el uso de bioensayos.

En este sentido, realizamos un bioensayo de toxicidad a corto plazo basado en la elongación radicular de semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) a partir de extractos con agua destilada de los suelos del CVG.

En la Figura 3.4 se puede observar una reducción importante de la elongación de la raíz en relación con el control (agua destilada) en gran parte de los suelos del S1 y en menor medida en los suelos de S2.

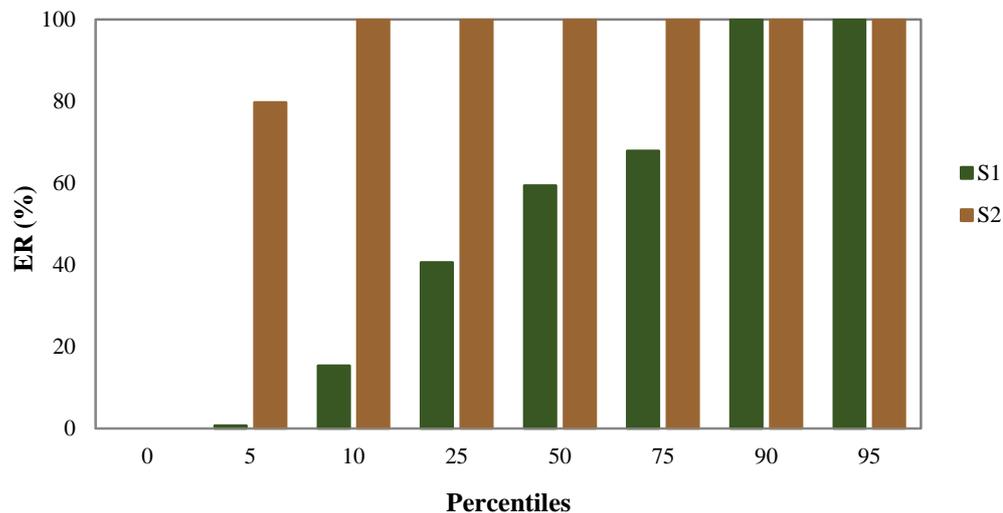


Figura 3.4. Valores de percentiles para el porcentaje de elongación de raíz (ER), en relación con el control (agua destilada) de *Lactuca sativa* L., en los sectores de suelo estudiados (S1 y S2)

Los suelos del sector ácido (S1) presentaron una mayor fitotoxicidad, con una reducción de la elongación de la raíz de más del 60% en el 25% de los suelos de este sector, mientras que no se detectó toxicidad solo en el 10% de los suelos muestreados. Por el contrario, en el sector básico (S2), alrededor del 90% de los suelos no presentaron fitotoxicidad y se detectó una ligera reducción del alargamiento (alrededor del 20% en relación con el control) solo en el 5% de las muestras de este sector.

El análisis de correlación entre la elongación radicular y las principales propiedades y contaminantes en los suelos indicó diferencias en S1 en relación con S2. Las variables con mayor influencia en la fitotoxicidad en el sector ácido (S1) fueron el pH, CE y concentración total de As, con coeficientes de correlación significativos ($p < 0.05$) entre la elongación radicular y estas variables de 0.790, -0.663 y -0.488, respectivamente. Los resultados indican que la acidez, la presencia de sales solubles provenientes de la oxidación del sulfuro y la alta concentración en As, estaban fuertemente relacionadas con la reducción en la elongación de la raíz de las semillas de lechuga. Estos resultados concuerdan con bioensayos de toxicidad desarrollados en el suelo del área por Romero-Freire *et al.* (2016a), que indican la existencia de un riesgo potencial de contaminación en el CVG.

Por el contrario, en el sector básico (S2), el bajo porcentaje de muestras que mostraron fitotoxicidad, en relación con el área total, dificulta la posible relación entre las variables, por lo que sería necesario un estudio más detallado en los sitios potencialmente contaminados de este sector, detectados por el screening que hemos llevado a cabo en esta tesis.

Otros estudios en el área encontraron un riesgo potencial de ecotoxicidad por una reducción en la abundancia de hongos ectomicorrízicos asociados con la encina (López-García *et al.*, 2018) o por la acumulación de Cd y Zn en las hojas de *Populus alba* que crecen en estos suelos (Domínguez *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2010). De todos modos, la fitotoxicidad potencial en el área se considera baja, principalmente para las plantas leñosas forestadas, aunque también se describe un riesgo de transferencia a la cadena alimentaria (Domínguez *et al.*, 2010). En este punto, la adaptación de las plantas bajo las condiciones climáticas y las propiedades de los suelos fueron los principales aspectos clave que promovieron el éxito de la revegetación, pero es necesario evaluar a largo plazo (Tordoff *et al.*, 2000) la tolerancia de metales pesados de las plantas, mediante estudios *in situ*, para determinar la transferencia de EPCs a las partes aéreas de las plantas para evitar el riesgo de dispersión en la cadena alimentaria.

3.4 Conclusiones

La fitoestabilización llevada a cabo en el área afectada por el vertido de la mina de pirita en Aznalcóllar tras las medidas de limpieza y remediación aplicadas promovió la restauración de los suelos en el área y la implementación del CVG. De todos modos, dos décadas después del accidente, todavía hay algunos sectores afectados por la contaminación residual. Las propiedades de los suelos cambiaron positivamente con el tiempo, al reducir la acidez y la conductividad eléctrica y aumentar la materia orgánica relacionada con el aumento de la cubierta vegetal. No obstante, en algunas zonas del sector ácido (S1) todavía hay suelos con un pH fuertemente ácido y sin crecimiento de plantas, donde la contaminación persiste. Las concentraciones totales de EPCs fueron más altas que las concentraciones en los suelos no contaminados anexos (principalmente en el caso de Pb y As) y los niveles genéricos de referencia para declarar suelos potencialmente contaminados en Andalucía se excedieron en alrededor del 13% para Pb y 70% para As, en los 10 cm superiores de los suelos. El bioensayo de toxicidad realizado con *Lactuca sativa* L. indicó que existen diferencias claras entre los suelos de los sectores S1 y S2 del CVG, donde el 25% de los suelos en S1 mostraron alta fitotoxicidad, con una reducción del 60% en la elongación de la raíz, mientras que solo el 5% de los suelos en S2 mostraron fitotoxicidad y menos intensa, con una reducción del 20% de la elongación radicular de la semilla de lechuga en relación con el control. Nuestro estudio indica que la fitoestabilización en el área fue una acción de biorremediación positiva, pero que se necesitan controles y tratamientos adicionales para reducir la movilidad potencial y la toxicidad de los EPCs en los sectores afectados por la contaminación residual.

CAPÍTULO 4

Evaluación de los tratamientos de remediación aplicados



4.1 Introducción

La contaminación del suelo por elementos potencialmente contaminantes (EPCs) es un problema creciente en el mundo. Los metales pesados y elementos asociados liberados al medio ambiente son persistentes y su toxicidad representa una seria amenaza para los organismos expuestos a altas concentraciones (Bernard y Oluranti, 2017).

Actualmente, una de las principales técnicas de remediación para el tratamiento de suelos contaminados es la remediación natural asistida, que consiste en mejorar las propiedades de los suelos para favorecer el restablecimiento de sus principales funciones y promover el crecimiento de la vegetación (Adriano *et al.*, 2004). En este sentido, la aplicación de enmiendas orgánicas e inorgánicas al suelo contaminado favorecen su remediación natural, ya que se basa en la reducción de la movilidad y biodisponibilidad de los EPCs (Xiong *et al.*, 2015). Además, la aplicación de enmiendas favorece la actividad biológica del suelo, promoviendo la implantación de técnicas de biorremediación como la fitoestabilización, que mejora los mecanismos del sistema suelo-microorganismo-planta para acelerar la recuperación de áreas contaminadas (Bernard y Oluranti, 2017). La revegetación de áreas afectadas por EPCs es una alternativa ampliamente utilizada para reducir los riesgos ambientales relacionados, pero requiere un monitoreo regular para controlar la posible transmisión pasiva de contaminantes a la cadena alimentaria (Pardo *et al.*, 2018). Por tanto, la fitorremediación asistida y el uso de enmiendas son métodos eficientes, rentables y respetuosos con el medio ambiente para la recuperación de suelos contaminados (Wiszniewska *et al.*, 2016). Estudios a mediano plazo, en base a la aplicación de enmiendas orgánicas e inorgánicas en un suelo ácido contaminado con diferentes EPCs, demostraron la eficacia del material carbonatado en el aumento del pH y en la reducción de la concentración de Cd, Cu y Zn en la solución del suelo (Xiong *et al.*, 2015). Así mismo, Pardo *et al.* (2018) evaluaron el restablecimiento de la vegetación en un suelo ácido contaminado con metales, después de seis años de la incorporación de enmiendas de cal con y sin compost, concluyendo que la

enmienda de cal junto con el compost fue el mejor tratamiento para aumentar la cobertura vegetal.

En este estudio, se evalúa la remediación de la zona contaminada por el accidente de la mina de Aznalcóllar (Sevilla, España), veinte años después del vertido de lodo y aguas ácidas con altas concentraciones de metales pesados y otros EPCs. Las acciones de recuperación se enfocaron inicialmente en la retirada de lodos potencialmente tóxicos y la capa superficial del suelo altamente contaminada, seguida de la remediación natural asistida basada en la aplicación de enmiendas orgánicas e inorgánicas y en la fitoestabilización con vegetación nativa (Madejón *et al.*, 2018a). La recuperación de la zona afectada fue realizada a través del mayor programa de restauración del suelo llevada a cabo hasta la fecha en España, con la participación de la Administración Pública, Universidades (Granada, Huelva, Córdoba, Sevilla, Santiago de Compostela, entre otras) e instituciones de investigación como el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), con una inversión de 280 M€ (OECD, 2004). La retirada inicial de los suelos afectados por el vertido se realizó en función de las características particulares del terreno. En la parte norte del área de estudio, la más cercana a la mina, se retiró más de un metro del suelo original, mientras que en el resto de las áreas solo se afectó la capa superior del suelo, menos de 30 cm (Martín Peinado, 2001).

Tras la retirada de los lodos y la parte superior de los suelos contaminados, se aplicaron diferentes enmiendas orgánicas e inorgánicas para la recuperación natural asistida de suelos. La aplicación de las enmiendas dependió de las propiedades del suelo y de la concentración residual de los EPCs. Inicialmente, se aplicaron a lo largo de la zona afectada materiales ricos en CaCO_3 , tales como residuos de la industria azucarera y papelera. Las dosis aplicadas en los suelos ácidos (primeros 15 km de la mina) osciló entre 60 y 90 t ha⁻¹ y en suelos básicos (resto del área afectada) las dosis se fijaron en 20 t ha⁻¹. Posteriormente, se aplicaron a lo largo de toda el área enmiendas orgánicas a diferentes dosis, entre 15 y 20 t ha⁻¹. Finalmente, en las zonas más contaminadas, se aplicaron materiales arcillosos ricos en óxidos de hierro para favorecer la inmovilización del arsénico, por ser considerado uno de los

contaminantes más peligrosos (Aguilar *et al.*, 2004a; Madejón *et al.*, 2018a). Los tratamientos intensivos de remediación finalizaron tres años después del accidente y en 2003 se implementó el Paisaje Protegido del Corredor Verde del río Guadiamar (CVG), donde se prohibió la agricultura, el pastoreo, la pesca y la caza (CMA, 2003).

A lo largo del tiempo, se han realizado muestreos sistemáticos en toda el área afectada para evaluar el grado de recuperación en la zona, que en general se ha considerado exitoso (Simón *et al.* 1999; Simón *et al.*, 2001; Aguilar *et al.*, 2004a; Simón *et al.*, 2008). Sin embargo, en los últimos años se ha detectado la presencia de contaminación residual en ciertos sectores del CVG, los cuales fueron inicialmente identificados mediante observación en campo, debido a la presencia de zonas donde no crece vegetación (Figura 4.1) y se detectó un riesgo potencial de dispersión de EPCs (Martín *et al.*, 2015; Romero-Freire *et al.*, 2016a).



Figura 4.1. Sector con contaminación

El objetivo de este estudio es evaluar la evolución de las propiedades y de la contaminación de los suelos del CVG en función de los tratamientos y dosis aplicadas como enmienda veinte años después del accidente. La evaluación de la contaminación se realizará teniendo en cuenta las concentraciones totales, solubles en agua y biodisponibles de los principales EPCs (Pb, As, Zn y Cu), calculando a partir de ellas el índice de remediación de los suelos.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Muestreo de suelos

En este estudio se realiza un muestreo sistemático, veinte años después del accidente, en toda la zona afectada, incluyendo 84 parcelas georreferenciadas, homogéneas y distribuidas aleatoriamente. Se tomaron cinco muestras de la capa superficial (0 a 10 cm) en cada parcela de 100 m², que se mezclaron y homogeneizaron en campo con el fin de obtener una muestra compuesta representativa de la parcela. Para evaluar la evolución de la recuperación de los suelos de la zona afectada por el vertido se emplean los datos del muestreo inicial realizado en 1998, antes de la aplicación de cualquier acción de remediación, publicados por Simón *et al.* (1999). También se usan datos de concentración de EPCs de 2004, del muestreo realizado por Simón *et al.*, (2005a), una vez finalizadas las acciones de recuperación del área afectada.

Este estudio se centra en evaluar la evolución de las propiedades edáficas y de la contaminación de los suelos bajo los distintos tratamientos aplicados en la zona afectada. En general, el área afectada se puede dividir en cuatro sectores (Figura 4.2 y Tabla 4.1) según los tratamientos aplicados (Aguilar *et al.*, 2004a). En todos los casos se aplicaron enmiendas orgánicas (Org) para restaurar la fertilidad y promover la actividad biológica del suelo que queda tras la retirada del lodo y de la capa superior de suelo irremediablemente contaminado. Las enmiendas orgánicas se aplicaron de manera más o menos homogénea en todos los sectores: en la zona más afectada (primeros 15 km aguas abajo de la mina) se aplicaron 20 t ha⁻¹ de compost, en la zona media (entre 15 y 30 km aguas abajo) se aplicaron 20 t ha⁻¹ de estiércol y en la zona más baja (últimos 15 km del área afectada) se aplicaron 15 t ha⁻¹ de estiércol. La segunda enmienda utilizada fue un material rico en carbonato cálcico (Ca) proveniente de la industria de la remolacha azucarera, con el fin de neutralizar la acidez generada por la oxidación del lodo residual que se mezcló con la matriz del suelo durante las acciones de limpieza, y para promover la inmovilización de los EPCs. En las tareas de encalado se emplearon diferentes

dosis, de acuerdo al grado de afectación de la zona: en los primeros 15 km aguas abajo de la mina se aplicaron 40 t ha⁻¹, y al año siguiente se repitió el encalado en dosis variables (20, 30 o 50 t ha⁻¹), dando una dosis total para este sector entre 60 y 90 t ha⁻¹; en el resto del área afectada se agregaron 20 t ha⁻¹, sin repetición el año siguiente. Finalmente, la última enmienda aplicada consistió en la adición de suelos rojos ricos en óxidos de Fe (Arc), que se aplicaron para reducir la movilidad del arsénico, considerado uno de los elementos más peligroso que quedó después de las labores de limpieza (Aguilar *et al.*, 2004b). La dosis aplicada fue heterogénea y dependió de las concentraciones de As residual en los suelos, por lo que variaron entre 320 y 960 t ha⁻¹ (CAGPDS, 2002).

La combinación de enmiendas y dosis aplicadas define un total de cuatro tratamientos combinados a lo largo de la zona del vertido. T1: enmienda orgánica, rica en óxidos de hierro y más de 20 t ha⁻¹ de enmienda rica en carbonatos, T2: enmienda orgánica y se aplicaron más de 20 t ha⁻¹ de enmienda rica en carbonatos, pero no se aplicó enmienda rica en óxidos de hierro, T3: enmienda orgánica, rica en óxidos de hierro y 20 t ha⁻¹ de enmienda rica en carbonatos y T4: enmienda orgánica y se aplicaron 20 t ha⁻¹ de enmienda rica en carbonatos, pero ninguna enmienda rica en óxidos de hierro (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Tratamientos y dosis aplicada (t ha⁻¹) para la recuperación de los suelos del CVG

Tratamiento	n	Org (t ha ⁻¹)	Cal (t ha ⁻¹)	Arc (t ha ⁻¹)
T1	14	20	60-90	320-960
T2	10	20	60-90	0
T3	23	15	20	320-960
T4	37	15	20	0

n: número de parcelas muestreadas de cada tratamiento, Org: enmienda orgánica, Cal: enmienda rica en carbonato cálcico, Arc: enmienda rica en óxidos de hierro

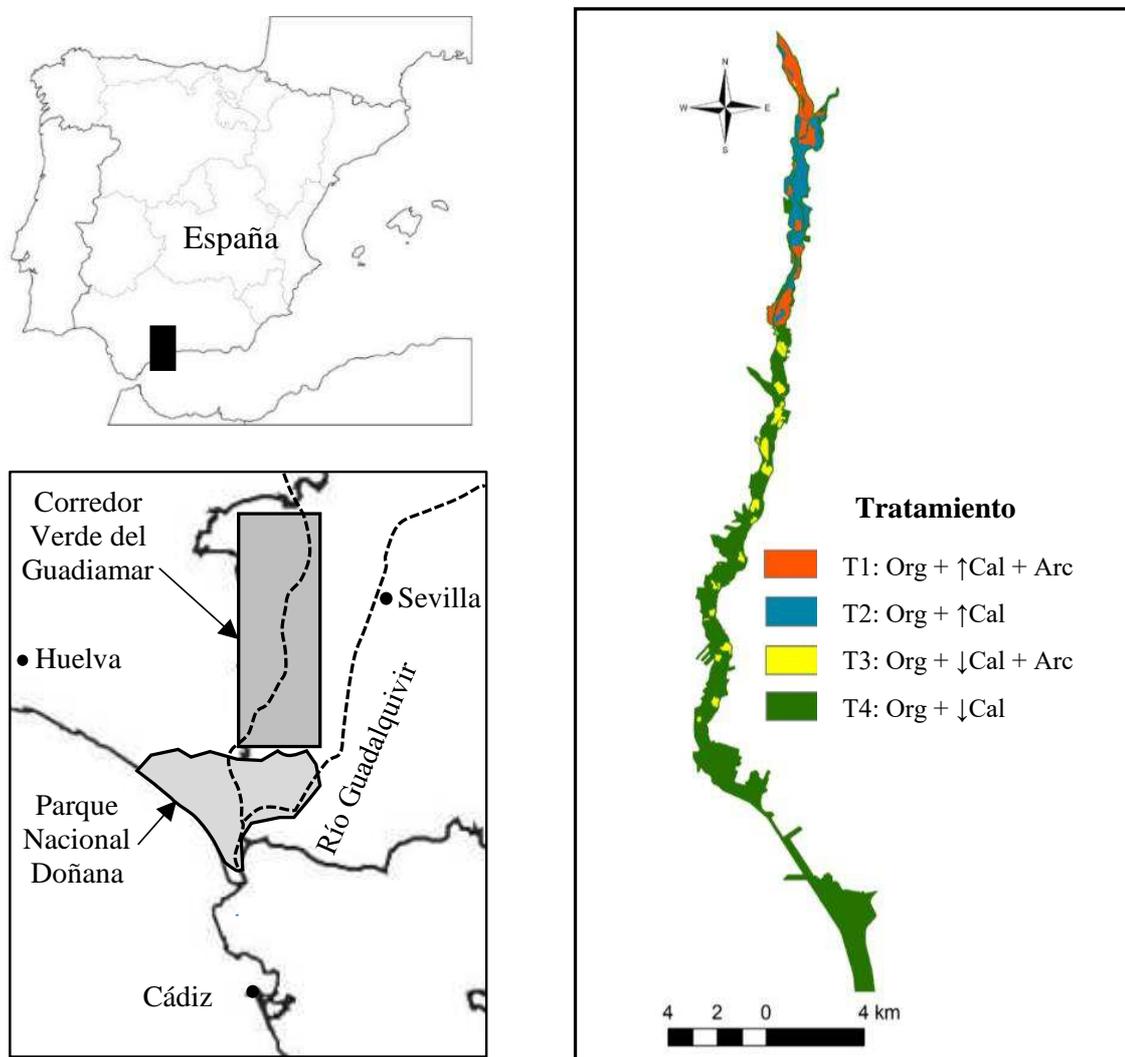


Figura 4.2. Mapa de la zona afectada por el vertido de lodos de la mina Aznalcóllar y distribución de los tratamientos aplicados en la zona

Org: enmienda orgánica, Arc: enmienda rica en óxidos de hierro, Cal: enmienda rica en carbonatos (↑ = dosis entre 60-90 t ha⁻¹, ↓ = dosis de 20 t ha⁻¹)

4.2.2 Métodos analíticos

Todas las muestras de suelo se secaron al aire y se tamizaron (<2 mm) antes de los análisis, que se realizaron mediante métodos estandarizados (MAPA, 1994).

La concentración total de contaminantes (Pb, As, Zn y Cu) se analizó por fluorescencia de rayos X (XRF).

La concentración de contaminantes solubles en agua y la forma biodisponible se determinaron en una suspensión 1:5 (suelo:agua). La forma biodisponible se extrajo con EDTA 0.05 M a pH 7.0. En ambos casos, los elementos extraídos se midieron mediante espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Para más detalles en la metodología de ensayos y análisis se puede consultar el Capítulo 2.

4.2.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron para comprobar su distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de la varianza se analizó usando la prueba de Levene. Después de cumplir con ambos supuestos, los datos fueron analizados utilizando el test de comparación de medias (ANOVA), teniendo en cuenta como variables independientes los períodos de estudio (años) y los tipos de enmiendas (Org, Cal y Arc). Posteriormente, la prueba post hoc de Tukey determinó las diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las diferentes variables independientes consideradas. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software SPSS v.23.0 (SPSS Inc., EE.UU.)

Para mostrar los valores medios de las concentraciones solubles en agua y biodisponibles de los EPCs en los diferentes períodos de muestreo, se construyeron con Excel gráficos radiales, determinando la escala de forma independiente para cada elemento. El área obtenida para cada elemento se

midió con Adobe Acrobat 9.0 (Adobe Systems Incorporated, EE.UU.) y se calculó la suma de las áreas obtenidas para cada tratamiento y cada año. Finalmente, se calculó el índice de remediación del suelo (RS) de acuerdo con Xiong *et al.* (2015), quienes definen este índice como la relación entre la superficie de cada polígono en cada período de muestreo y la superficie del polígono inicial (1998), considerando por lo tanto RS igual a 1 para el año 1998.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Propiedades de los suelos

Se comparó el análisis granulométrico entre los suelos muestreados al inicio del accidente (1998) y veinte años después (2018), para comprobar si la retirada de la capa superior de los suelos contaminados y la aplicación de enmiendas generaron diferencias significativas en la clase textural (Aguilar *et al.*, 2004b). No se encontraron diferencias significativas de textura entre los suelos muestreados justo después del accidente y veinte años más tarde (Tabla 4.2). Dominan las texturas francas a lo largo de la zona estudiada, con mayor contenido en fracción gruesa en la parte alta mientras que en la zona media y final las texturas son algo más ricas en arcilla y limo (T3 y T4).

Tabla 4.2. Clase textural de los suelos muestreados en la zona afectada (1998) y veinte años después del accidente (2018)

Suelos donde se aplicó el tratamiento	1998	2018
T1	Franco Arenosa	Franca
T2	Franca	Franca
T3	Franca	Franco Arcillosa
T4	Franco Arcillo Limosa	Arcillo Limosa

Veinte años después del accidente y con la aplicación de tratamientos de remediación se han producido cambios en las propiedades de los suelos en función del tratamiento aplicado (Tabla 4.3). El área afectada fue dividida en dos sectores de acuerdo con los criterios de Aguilar *et al.* (2004a), uno situado en el primer tercio (primeros 15 km aguas abajo de la mina), en la que los suelos moderadamente ácidos, con texturas franca y franco-arenosa y contenido bajo de CaCO_3 fueron tratados con los tratamientos T1 y T2, y otro situado en los últimos 30 km de la zona afectada, en la que los tratamientos T3 y T4 se aplicaron a suelos neutros ligeramente alcalinos, con textura más arcillosa y alto contenido de CaCO_3 .

Tabla 4.3. Valores medios (desviación estándar) de las principales propiedades de los suelos en el área afectada por el vertido en los diferentes años de muestreo, según tratamiento aplicado

	Año	T1	T2	T3	T4
pH	1998	5.82 b A	5.10 b B	7.16 a B	7.64 a B
		(1.98)	(1.82)	(0.76)	(0.32)
	2004	6.28 c A	6.51 bc AB	7.42 ab B	7.75 a B
		(1.88)	(1.44)	(0.94)	(0.48)
	2018	7.19 c A	7.36 bc A	8.28 a A	8.12 ab A
		(1.78)	(1.38)	(0.38)	(0.32)
CE (dS m ⁻¹)	1998	4.69 a A	4.71 a A	3.67 a A	4.96 a A
		(2.47)	(2.54)	(1.42)	(3.42)
	2004	2.15 a B	1.81 a B	1.18 a B	1.26 a B
		(1.41)	(0.81)	(0.56)	(1.29)
	2018	1.94 a B	1.32 ab B	0.58 b B	0.79 b B
		(2.08)	(0.82)	(0.32)	(0.68)
CaCO ₃ (%)	1998	3.10 b A	4.22 b A	7.52 ab A	10.15 a B
		(5.36)	(6.98)	(5.44)	(4.90)
	2004	6.21 ab A	4.52 b A	11.02 ab A	13.59 a A
		(14.77)	(8.39)	(8.67)	(6.93)
	2018	7.92 ab A	3.20 b A	13.03 a A	13.61 a A
		(9.96)	(5.57)	(7.55)	(5.34)
CO (%)	1998	1.11 a B	1.18 a B	0.88 a B	1.18 a B
		(0.72)	(0.77)	(0.38)	(0.39)
	2004	1.15 a B	1.28 a B	1.21 a B	1.45 a AB
		(0.47)	(0.56)	(0.41)	(0.66)
	2018	1.71 a A	1.78 a A	1.96 a A	1.85 a A
		(0.63)	(0.78)	(0.54)	(0.44)

Las letras minúsculas representan diferencias significativas entre tratamientos y las letras mayúsculas entre años (prueba Tukey HDS $p < 0.05$)

El pH de los suelos aumentó después de la aplicación de los tratamientos, 6 años después del accidente (2004), aunque no de manera estadísticamente significativa. En cambio, sí que se observan diferencias significativas a los

veinte años en los suelos donde se aplicaron T2, T3 y T4. En todos los tratamientos, en 2018, los valores medios de pH están por encima de 7, alcanzando valores superiores a 8 en el caso de T3 y T4; de todos modos, los suelos con tratamientos T1 y T2 presentaron valores significativamente menores que los suelos con tratamientos T3 y T4, tanto al inicio (1998) como veinte años después del accidente.

La conductividad eléctrica (CE) es un parámetro íntimamente relacionado con este tipo de contaminación del suelo (García-Carmona *et al.*, 2017), ya que la oxidación de los sulfuros contenidos en el lodo mezclado con los suelos genera sales solubles, principalmente sulfatos, que incrementan este parámetro en el suelo (Simón *et al.*, 2001). Todos los tratamientos aplicados fueron eficaces en la reducción de la elevada CE, siendo las diferencias significativas a los 6 años del accidente. La reducción en la salinidad de los suelos ha continuado con el tiempo, si bien no se obtienen diferencias significativas entre los valores de CE entre 2004 y 2018. No obstante, los suelos en los que se aplicaron los tratamientos T1 y T2 tienen valores de CE promedio más altos que en los otros dos tratamientos, lo que se relaciona con la contaminación residual aún existente en estas áreas veinte años después del vertido (Martín *et al.*, 2015).

La aplicación de enmiendas orgánicas fue generalizada en toda el área afectada por el vertido y después de su aplicación el contenido de CO aumentó en los suelos. Pero, estos aumentos solo en 2018 fueron estadísticamente significativos. Es la implantación de la vegetación en la zona la que da lugar a la mejora de este parámetro, poniendo de manifiesto la importancia de la fitoestabilización de los suelos, no solo desde el punto de vista del control de la contaminación sino también para mejorar la fertilidad de los suelos (Pastor-Jáuregui *et al.*, 2020).

El contenido de carbonato de calcio está estrechamente relacionado con el aumento de pH de los suelos y se asocia con la aplicación generalizada de enmienda carbonatada en toda la zona afectada por el vertido (Aguilar *et al.*, 2004a). Sin embargo, las variaciones en el contenido de CaCO_3 no son muy grandes, tanto entre tratamientos aplicados como entre años. En los

tratamientos T1 y T2 se aplicaron mayores dosis de material carbonatado en relación a los tratamientos T3 y T4, pero en el caso de los primeros, los suelos sobre los que se aplicaron presentaron un menor contenido inicial de carbonatos y un mayor grado de contaminación residual, lo que provocó una disolución parcial de CaCO_3 que amortiguó el pH del suelo (Simón *et al.*, 2005a y 2008). En el caso de los tratamientos T3 y T4, tampoco existen diferencias significativas en el contenido de carbonato del suelo a lo largo del tiempo, ya que el encalado se realizó en dosis menores y solo durante el primer año, debido a que estos suelos originalmente eran carbonatados y tenían menor contaminación residual.

La aplicación de enmiendas de suelos rojos ricos en óxidos de Fe (Arc) parece no tener un efecto estadísticamente significativo en la textura del suelo, aunque hay ligeros cambios hacia texturas más finas en los suelos donde se aplicó este tratamiento (T1 y T3), en relación con los suelos tratados sin la adición de Arc (T2 y T4).

4.3.2 Concentración total de EPCs en los suelos

La contaminación de los suelos fue inicialmente muy alta, debido a la entrada de lodos y agua ácida en la matriz del suelo (Simón *et al.*, 1999). En 1998 no había niveles de referencia oficiales para declarar un suelo como contaminado en España, por lo que la evaluación de la posible contaminación de la zona se realizó sobre la base de la propuesta de la Junta de Andalucía en ese momento (CMA, 1999). En esta propuesta, los niveles de intervención (NGR) para suelos agrícolas se establecieron para Pb en 350 mg kg^{-1} (suelos con $\text{pH} < 7$) y 500 mg kg^{-1} (suelos con $\text{pH} \geq 7$), para As en 50 mg kg^{-1} , para Zn en 600 mg kg^{-1} (suelos con $\text{pH} < 7$) y 1000 mg kg^{-1} (suelos con $\text{pH} \geq 7$) y para Cu en 300 mg kg^{-1} (suelos con $\text{pH} < 7$) y 500 mg kg^{-1} (suelos con $\text{pH} \geq 7$). En este sentido, inmediatamente después del accidente, los valores medios de los diferentes EPCs en los suelos revelaron una intensa contaminación (Tabla 4.4). Los niveles de intervención se excedieron para las concentraciones medias de As en todos los sectores afectados, mientras que para Pb y Zn se superaron en los

suelos donde se aplicaron los tratamientos T1 y T2. Los valores medios de Cu no superaron los niveles de intervención en ningún sector, aunque puntualmente sí los superaron en suelos en los que se aplicó el tratamiento T1.

Tabla 4.4. Valores medios (desviación estándar) de las concentraciones totales (mg kg^{-1}) de elementos potencialmente contaminantes en los suelos en los diferentes años de muestreo, según tratamiento aplicado

Total	Año	T1	T2	T3	T4
PbT	1998	464.1 a A	420.4 a A	467.6 a A	308.5 a A
		(377.0)	(474.2)	(726.9)	(397.3)
	2004	126.3 b B	187.8 ab A	207.6 a AB	151.5 ab B
		(69.2)	(118.6)	(101.5)	(64.2)
	2018	376.2 a AB	305.1 a A	88.1 b B	109.4 b B
		(418.1)	(255.4)	(48.9)	(88.5)
AsT	1998	185.2 a A	190.7 a A	198.9 a A	123.3 a A
		(170.2)	(238.3)	(293.1)	(167.3)
	2004	83.3 a A	103.4 a A	101.2 a AB	63.6 a B
		(58.0)	(93.6)	(53.3)	(30.7)
	2018	169.4 a A	166.5 a A	44.1 b B	54.2 b B
		(130.0)	(142.9)	(27.6)	(45.5)
ZnT	1998	772.6 a A	750.1 a A	833.7 a A	927.8 a A
		(674.9)	(673.1)	(723.1)	(595.5)
	2004	246.4 c B	320.3 bc B	488.2 ab B	557.9 a B
		(127.5)	(242.4)	(183.4)	(260.6)
	2018	337.4 a B	354.4 a B	307.0 a B	462.5 a B
		(237.2)	(232.6)	(125.7)	(234.3)
CuT	1998	186.5 a A	155.9 a A	204.8 a A	177.1 a A
		(135.7)	(117.0)	(158.6)	(107.3)
	2004	68.5 c B	85.1 bc A	112.6 ab B	126.5 a B
		(26.4)	(45.9)	(37.3)	(50.3)
	2018	106.2 a AB	118.4 a A	70.5 a B	103.3 a B
		(69.8)	(74.9)	(38.5)	(48.3)

Las letras minúsculas representan diferencias significativas entre tratamientos y las letras mayúsculas entre años (prueba Tukey HDS $p < 0.05$)

La posterior eliminación del lodo y la parte superior de los suelos contaminados redujo significativamente la concentración total de los EPCs, aunque estudios posteriores indicaron que esta limpieza dejó un patrón de contaminación heterogéneo distribuido por toda la zona afectada (Aguilar *et al.*, 2004a). Si comparamos las concentraciones totales iniciales con las analizadas veinte años después del accidente, observamos que Pb, As y Cu disminuyeron significativamente en los suelos tratados con T3 y T4, pero no en los suelos donde se aplicaron los tratamientos T1 y T2. El Zn disminuyó en todos los sectores, siendo significativa esta reducción seis años después del accidente en los cuatro tratamientos. Estos datos confirman la disminución de las concentraciones totales de EPCs en la mayor parte del área restaurada (tratamientos T3 y T4), aunque se detectaron concentraciones potencialmente nocivas de Pb y As en algunos suelos ubicados en los primeros 15 km del área afectada por el vertido (tratamientos T1 y T2). Estos resultados están en consonancia con los reportados por Martín *et al.* (2015), en áreas distribuidas aleatoriamente cerca de la mina.

Diecisiete años después del accidente, la Junta de Andalucía publicó los Niveles Genéricos de Referencia (NGR) para declarar un suelo como potencialmente contaminado (BOJA, 2015). Para los contaminantes estudiados, los valores establecidos para la protección de la salud humana fueron: 275 mg kg⁻¹ para Pb, 36 mg kg⁻¹ para As, 10000 mg kg⁻¹ para Zn y 595 mg kg⁻¹ para Cu. Según estos valores, las concentraciones totales de Zn y Cu en todo el CVG veinte años después del accidente no superan el NGR en ninguno de los sectores. Sin embargo, las concentraciones totales de Pb exceden el NGR en 13.1% de todos los suelos analizados, con fuertes diferencias entre los tratamientos: 35.7% para T1, 40% para T2, 5.4% para T4 y no se superó en T3. El elemento con mayor riesgo de contaminación potencial fue el As, ya que 70% de los suelos analizados excede el NGR con diferencias en porcentajes entre los tratamientos: 86% para T1, 90% para T2, 61% para T3 y 62% para T4.

La diferencia observada entre sectores puede deberse a la influencia conjunta de las propiedades de los suelos y los tratamientos aplicados. Los tratamientos

T1 y T2 adicionaron grandes cantidades de carbonato a los suelos más próximos a la mina, que fueron los que recibieron una mayor concentración inicial de contaminantes, además de que sus propiedades no eran las más adecuadas para poder amortiguar los contaminantes recibidos en términos de toxicidad y movilidad (pH moderadamente ácido, contenido bajo o nulo de carbonatos y texturas arenosas). Por lo tanto, la dinámica de los contaminantes en estos suelos fue influenciada por una alta movilidad en la matriz del suelo que, junto con la alta evapotranspiración de la zona, provocó la concentración de los contaminantes en los primeros centímetros de los suelos, que es donde el encalado fue más eficaz (Simón *et al.*, 2005a). Sin embargo, los suelos en los que se aplicaron los tratamientos T3 y T4, además de recibir una menor cantidad de lodo, tenían mejores propiedades (pH básico, carbonatos y texturas finas), lo que permitió que los contaminantes penetren en menor medida en los suelos y, en los casos en que ingresaron en profundidad, la precipitación en la matriz del suelo impidió su ascenso capilar y su concentración en la superficie del suelo, favoreciendo el efecto diluyente de la contaminación (Martín *et al.*, 2008).

Estos datos muestran que veinte años después del accidente, y una vez finalizadas las medidas de remediación, todavía existen suelos potencialmente contaminados en el CVG según la legislación vigente. Sin embargo, la limpieza y la aplicación de las enmiendas en estos suelos fueron eficaces en la mayor parte del CVG, promoviendo la inmovilización de EPCs, el restablecimiento de las funciones esenciales de los suelos y el crecimiento de la vegetación, aunque todavía se necesita la recuperación completa en algunos de los suelos situados cerca de la mina (Pastor-Jáuregui *et al.*, 2020).

4.3.3 Solubilidad y disponibilidad de EPCs en los suelos

En estudios que involucran contaminación, además de analizar la concentración total del contaminante, es esencial evaluar su solubilidad y la biodisponibilidad de los mismos. Estas formas están directamente relacionadas con el riesgo de dispersión de los contaminantes dentro del suelo

y por el resto del ecosistema, así como el riesgo de toxicidad al ser absorbidos por organismos, tanto animales como vegetales (Kim *et al.*, 2015). Se han analizado tanto la concentración de los EPCs solubles en agua, considerada como la fracción con mayor riesgo de dispersión a corto plazo, y la concentración de los EPCs extraíbles con EDTA, como la fracción potencialmente biodisponible en el mediano-largo plazo (Quevauviller *et al.*, 1998). El EDTA es capaz de extraer elementos solubles, intercambiables y débilmente adsorbidos del suelo (Schramel *et al.*, 2000; Álvarez *et al.*, 2006) y a pH 7.0 también puede disolver elementos que están ligados a sustancias húmicas en el suelo. Debido a la alta estabilidad de los complejos órgano-metálicos como arcillo-húmicos, en los que se retienen parte de los elementos contaminantes, el EDTA también podría disolver elementos presentes en el suelo, como carbonatos insolubles en agua (Yotova *et al.*, 2018).

La heterogeneidad de la contaminación en la zona de estudio hace que la concentración total de EPCs muestre una gran variabilidad. Sin embargo, para evaluar la evolución de la movilidad de los EPCs, después de la aplicación de los tratamientos, se han calculado los porcentajes relativos de las fracciones soluble (S) (Tabla 4.5) y biodisponible (E) (Tabla 4.6), en relación a la concentración total.

Tabla 4.5. Valores medios (desviación estándar) de los porcentajes de las concentraciones solubles (S) de contaminantes en los suelos en relación a las concentraciones totales, de acuerdo a los tratamientos aplicados y el año de muestreo

%	Año	T1	T2	T3	T4
PbS	1998	0.106 a A (0.098)	0.231 a A (0.447)	0.478 a A (0.873)	0.255 a A (0.574)
	2004	0.002 a B (0.003)	0.006 a B (0.010)	0.001 a B (0.002)	0.019 a B (0.044)
	2018	0.009 b B (0.010)	0.010 b B (0.008)	0.046 a B (0.052)	0.043 a B (0.020)
AsS	1998	0.061 a A (0.059)	0.159 a A (0.281)	0.283 a A (0.378)	0.121 a B (0.173)
	2004	0.018 a A (0.027)	0.022 a A (0.023)	0.009 a B (0.007)	0.027 a C (0.027)
	2018	0.064 b A (0.075)	0.073 b A (0.096)	0.198 a A (0.189)	0.233 a A (0.197)
ZnS	1998	17.380 a A (19.749)	14.094 a A (14.376)	1.334 b A (1.578)	0.570 b A (1.268)
	2004	6.271 a B (14.157)	3.995 ab AB (9.473)	0.497 ab AB (2.265)	0.092 b B (0.250)
	2018	4.125 a B (11.692)	1.312 a B (3.978)	0.090 a B (0.117)	0.076 a B (0.033)
CuS	1998	0.727 ab A (0.904)	2.179 a A (3.906)	0.921 ab A (2.014)	0.071 b B (0.129)
	2004	0.957 a A (2.624)	0.308 a A (0.936)	0.129 a A (0.430)	0.080 a B (0.188)
	2018	0.576 a A (1.607)	0.262 a A (0.469)	0.204 a A (0.095)	0.265 a A (0.120)

Las letras minúsculas representan diferencias significativas entre tratamientos y las letras mayúsculas entre años (prueba Tukey HDS $p < 0.05$)

Table 4.6. Valores medios (desviación estándar) de los porcentajes de las concentraciones biodisponibles (E) de contaminantes en los suelos en relación a las concentraciones totales, de acuerdo a los tratamientos aplicados y el año de muestreo

%	Año	T1	T2	T3	T4
PbE	1998	23.794 a A (13.577)	29.917 a A (21.197)	25.512 a A (15.857)	21.649 a A (10.538)
	2004	7.243 b B (5.677)	8.831 b B (7.556)	10.240 ab B (5.394)	14.526 a B (5.981)
	2018	0.832 b B (0.882)	0.751 b B (0.877)	1.996 a C (0.850)	2.184 a C (0.847)
AsE	1998	6.631 ab A (10.664)	8.592 a A (7.312)	3.147 b A (3.432)	3.832 ab A (2.896)
	2004	0.889 ab B (0.654)	1.205 a B (1.440)	0.590 ab B (0.502)	0.566 b B (0.470)
	2018	0.111 b B (0.097)	0.128 b B (0.116)	0.233 a B (0.131)	0.173 ab B (0.088)
ZnE	1998	30.777 ab A (18.988)	39.399 a A (19.447)	22.529 bc A (20.611)	14.180 c A (10.102)
	2004	21.213 ab A (14.353)	22.392 a B (16.801)	13.248 c B (3.312)	13.664 bc A (2.608)
	2018	2.019 a B (1.404)	1.490 a C (0.379)	1.779 a C (0.539)	1.554 a B (0.512)
CuE	1998	25.067 a A (26.288)	23.963 a A (13.036)	32.081 a A (20.901)	25.970 a A (12.539)
	2004	29.936 a A (9.979)	26.231 a A (8.896)	24.195 a A (5.929)	26.669 a A (4.736)
	2018	2.440 b B (0.627)	2.838 ab B (0.791)	3.006 ab B (0.519)	3.266 a B (0.819)

Las letras minúsculas representan diferencias significativas entre tratamientos y las letras mayúsculas entre años (prueba Tukey HDS $p < 0.05$)

Las formas solubles en agua y potencialmente biodisponibles presentan diferencias según el elemento considerado y el tratamiento aplicado. En el caso del Pb, seis años después de la aplicación de los tratamientos (2004), la

solubilidad y biodisponibilidad relativa disminuyen significativamente en todos los casos y se mantiene baja en el tiempo. Sin embargo, veinte años después del accidente, los suelos donde se aplicaron los tratamientos T3 y T4 presentan concentraciones relativas de Pb soluble y biodisponible más altas que en los tratamientos T1 y T2. El aumento de movilidad observado en el Pb podría estar relacionado con el mayor desarrollo de la vegetación donde se aplicaron los tratamientos T3 y T4 y la afinidad de la materia orgánica para formar complejos orgánicos con Pb que se extraen fácilmente con EDTA (Sierra *et al.*, 2019).

El As muestra un comportamiento diferente, ya que su solubilidad relativa en agua no disminuye con el tiempo para los tratamientos T1 y T2, mientras que se observa un aumento en los tratamientos T3 y T4 veinte años después del accidente. Además, como el Pb, los tratamientos T3 y T4 muestran una mayor solubilidad relativa de As en relación con los tratamientos T1 y T2. La biodisponibilidad del As disminuye significativamente en todos los casos después de la aplicación de los tratamientos y permanece baja con el tiempo. Sin embargo, los tratamientos T3 y T4 muestran una mayor biodisponibilidad en relación a los tratamientos T1 y T2 en términos relativos, considerando que la concentración de As total es significativamente menor en T3 y T4 en comparación con T1 y T2. El As no forma complejos estables con EDTA (Přibil, 1982), lo que podría explicar los bajos valores de biodisponibilidad extraídos. Es un elemento de baja movilidad y su disponibilidad depende de las propiedades del suelo como óxidos de Fe, pH, carbonato de calcio, contenido de arcilla, capacidad de intercambio catiónico y contenido de materia orgánica (Martín *et al.*, 2012; Romero-Freire *et al.*, 2014). En este sentido, la adición de suelos rojos ricos en óxidos de Fe (enmienda Arc) se aplicó principalmente para reducir la solubilidad y disponibilidad del As (Aguilar *et al.*, 2004b), pero esta enmienda no produjo un efecto significativo en el largo plazo. La alta cantidad de hierro que se adicionó a los suelos por el vertido fue el principal responsable de la reducción de la movilidad del As por la formación de escorodita (Álvarez-Ayuso *et al.*, 2008) y otros hidroxisulfatos de hierro como jarosita y schwertmannita (García *et al.*, 2009).

No obstante, el aumento en la solubilidad del As en suelos con pH neutro o ligeramente alcalinos puede dar lugar a la desorción del As unido a los oxihidróxidos de Fe y/o la materia orgánica (Wang y Mulligan, 2006; Klitzke y Lang, 2009). De hecho, Simón *et al.* (2010) indicaron que es necesario controlar el pH del suelo cuando se llevan a cabo enmiendas encalantes para el control de la movilidad de EPCs si el As está presente, debiendo mantenerse el pH ligeramente alcalino, pero preferentemente entorno a 6.5.

Después de la aplicación de los tratamientos, se reducen significativamente la solubilidad y biodisponibilidad relativa de Zn y esta reducción continúa hasta 2018. En 2004 se observa que la solubilidad relativa de Zn en suelos tratados con T1 y T2 fue mayor que en T3 y T4, aunque ocurre lo contrario para las concentraciones totales (Tabla 4.4). La influencia de los carbonatos y del pH en la solubilidad del Zn está ampliamente recogida en la bibliografía (Kraus y Wiegand, 2006; Madejón *et al.*, 2006a; Clemente *et al.*, 2008; Romero-Freire *et al.*, 2016b). La disminución de la solubilidad del Zn está directamente relacionada con el aumento del pH. En cuanto a la disminución de la biodisponibilidad de Zn, el efecto del encalado en los suelos de la zona se reconoce como una medida muy eficaz según Simón *et al.* (2005b) y, según nuestros datos, se mantiene en el tiempo. Las medidas de remediación fueron más efectivas para este elemento en el sector más alejado de la mina, aunque el encalado fue menos intenso, pero el carácter carbonatado original de los suelos en esta parte contribuyó de manera relevante en la reducción de la solubilidad del Zn.

El Cu no reduce significativamente su solubilidad relativa a lo largo del tiempo y se observa un aumento en el tratamiento T4, veinte años después del accidente. No existen diferencias significativas en la solubilidad relativa del Cu entre los diferentes tratamientos, lo que se relaciona con la limitada movilidad de este elemento en los suelos. El Cu tampoco reduce su biodisponibilidad relativa después de la aplicación de tratamientos (2004), aunque sí disminuye significativamente a largo plazo (2018). También se observa que la biodisponibilidad relativa de Cu es mayor en suelos con tratamientos T3 y T4 que con T1 y T2. La movilidad del Cu está fuertemente

relacionada con el pH, aumentando su solubilidad en suelos ácidos (García *et al.*, 2009), lo que justifica la mayor concentración relativa soluble en los suelos donde se aplicó T1 y T2, que corresponde al sector no carbonatado inicialmente. Rocco *et al.* (2018) reportaron que la absorción por parte de las plantas se relacionó positivamente con la biodisponibilidad de EPCs en el suelo, presentando el Zn mayor movilidad con respecto al Cu. Además, el Cu está fuertemente retenido por el suelo, tiene menos movilidad y es menos sensible a los cambios en el pH del suelo, en comparación con el Zn, con adsorción relativa a valores de pH inferiores a 5. Para este elemento, los parámetros más significativos que rigen sus procesos de adsorción en suelos son el contenido de materia orgánica y óxidos de hierro (García-Carmona *et al.*, 2019b). El aumento de materia orgánica con el tiempo, fundamentalmente debido a la recuperación de la vegetación en la zona, justifica la disminución significativa de la biodisponibilidad de Cu registrada en 2018.

La influencia del clima en nuestra área de estudio también es un factor clave a considerar. En este sentido, Liu *et al.* (2020) indican que altas temperaturas aceleran la transformación de fracciones solubles de EPCs, contribuyendo al aumento de la movilidad de los metales pesados.

Los porcentajes de concentraciones solubles en agua y biodisponibles de Pb, As, Zn y Cu se representa en los gráficos radiales (Figura 4.3) para estimar los efectos de cada tratamiento en la movilidad de estos elementos. De acuerdo con Xiong *et al.* (2015), evaluamos el riesgo potencial de toxicidad por la relación directa con el tamaño del polígono obtenido.

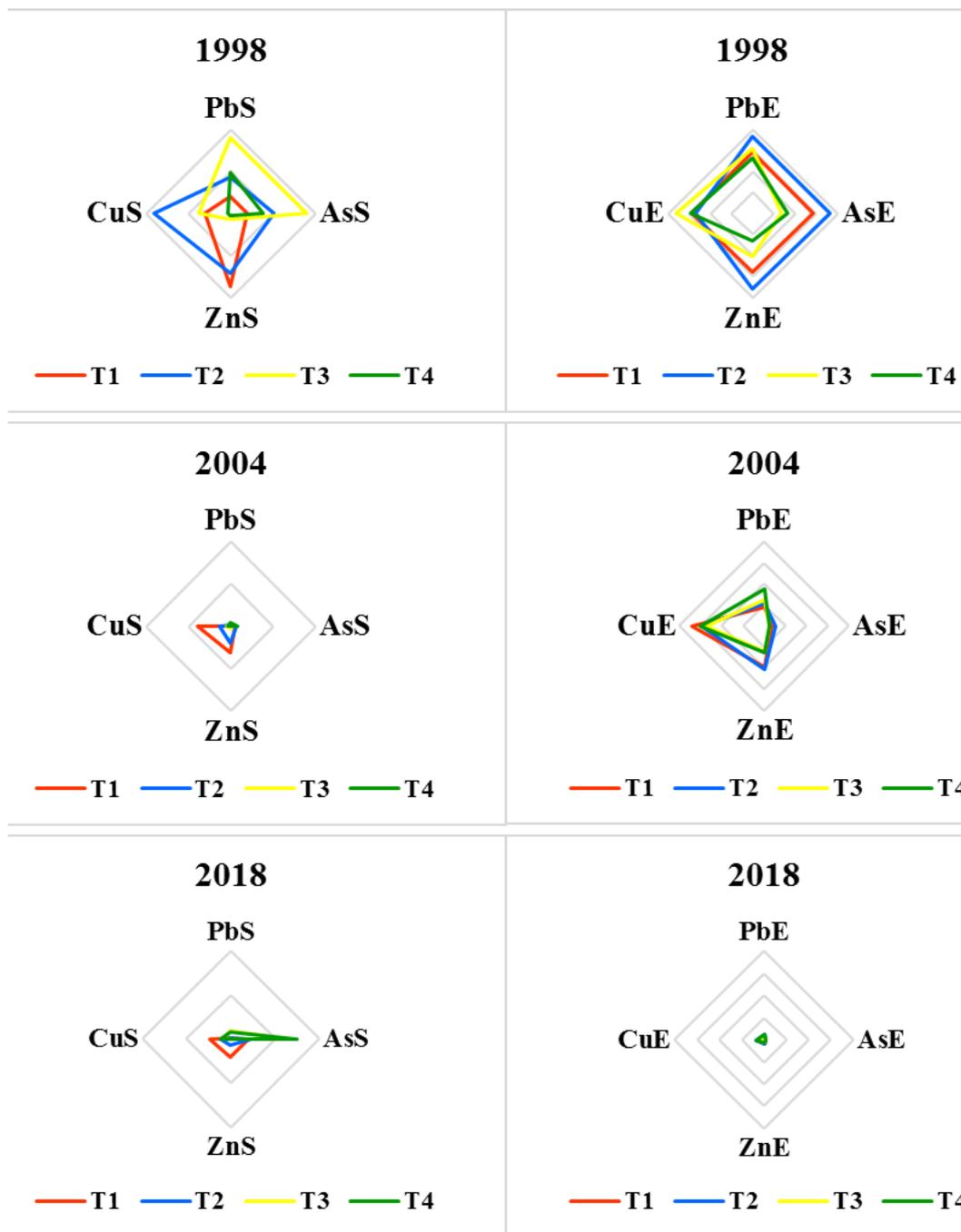


Figura 4.3. Gráficos radiales de porcentajes de concentraciones solubles (S) y biodisponibles (E) de Pb, As, Zn y Cu, según los tratamientos aplicados y año de muestreo. El área de cada polígono para cada tratamiento está directamente relacionada con el índice de remediación del suelo (RS), según Xiong *et al.* (2015)

A partir de los datos de la Figura 4.3, se calculó el índice de remediación del suelo (RS) mediante la medida del área de cada polígono en relación con el polígono inicial (valor 1) obtenido en 1998 (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Índice de remediación del suelo (RS) estimado a partir de los porcentajes de las formas soluble (S) y biodisponible (E) para cada tratamiento y año de muestreo

Año	T1		T2		T3		T4	
	RS S	RS E						
1998	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
2004	0.270	0.328	0.025	0.237	0.002	0.285	0.024	0.548
2018	0.185	0.003	0.018	0.002	0.053	0.007	0.346	0.010

Se observó una reducción de las formas biodisponibles en todos los tratamientos, mientras que las formas solubles se redujeron en T1 y T2, pero se detectó un aumento en T3 y T4 a los veinte años de la aplicación de estos tratamientos.

Los resultados del cálculo de RS muestran una evolución positiva en todos los tratamientos, ya que los valores están por debajo de 1 en todos los casos. La reducción de la solubilidad es muy fuerte tras la aplicación de los tratamientos de remediación (2004) y esta reducción se mantiene en el tiempo en el caso de los tratamientos T1 y T2, pero aumenta en los tratamientos T3 y T4. Este aumento de formas solubles se observó principalmente para Pb y As, que en estos suelos parecen estar relacionados con los efectos competitivos con la materia orgánica del suelo (Sierra *et al.*, 2019). En el caso del As, también puede atribuirse a un aumento de la cristalinidad de los oxihidróxidos de hierro con el tiempo, que da lugar a la desorción de parte del As retenido (Pedersen *et al.*, 2006).

Por otro lado, la reducción de la biodisponibilidad es mayor para todos los tratamientos aplicados y esta reducción aumenta considerablemente con el tiempo, lo que indica una reducción general de la disponibilidad de los EPCs en toda el área de estudio, independientemente de los tratamientos aplicados. Sin embargo, la presencia de contaminación residual y la evolución específica

en algunos sectores (Pastor-Jáuregui *et al.*, 2020) hace necesario monitorear toda la zona y aplicar medidas de remediación en aquellos sectores donde se detecta un riesgo potencial de toxicidad.

4.4 Conclusiones

Nuestros resultados indican que la combinación de enmiendas orgánicas e inorgánicas es un método eficiente para recuperar suelos contaminados por metales pesados y arsénico. Las diferentes dosis utilizadas aumentaron principalmente el pH, CaCO_3 y contenido de CO de los suelos, redujeron la CE y disminuyeron la solubilidad y biodisponibilidad de los EPCs. El efecto de los diferentes tratamientos se hizo muy evidente a los seis años del accidente y la evolución positiva en el tiempo ha producido una homogeneización de la recuperación de los suelos en todos los sectores. Sin embargo, los tratamientos T1 y T2 se aplicaron en dosis que no fueron suficientes para mejorar las propiedades de los suelos al mismo ritmo que en los otros tratamientos, principalmente por el mayor grado de contaminación inicial y las peores propiedades originales de los suelos. Además, en determinados sectores de los primeros 15 km se han detectado concentraciones totales de Pb y As que superan los niveles de intervención de la normativa vigente, lo que indica la presencia de suelos potencialmente contaminados. Se recomiendan tratamientos adicionales con dosis más altas de enmiendas orgánicas y carbonatadas para completar la recuperación total de estas áreas residuales.

CAPÍTULO 5

Evaluación de riesgos ecotoxicológicos



5.1 Introducción

La salud de los suelos ha sido definida como la capacidad de éstos para funcionar como un sistema vital para mantener la productividad biológica, promover la calidad ambiental y mantener la salud humana (Doran y Zeiss, 2000). Por el contrario, un suelo se considera contaminado cuando una o más sustancias exceden su Nivel Genérico de Referencia (NGR) y por lo tanto pueden alterar su entorno natural.

Los suelos pueden representar el principal depósito de EPCs, que afectan normalmente su función de retención y contribuyen a la contaminación de la superficie y aguas subterráneas, comprometiendo su calidad y el equilibrio de las comunidades del ecosistema (Palma *et al.*, 2019). La contaminación de las tierras agrícolas y de los recursos hídricos por EPCs, debido a las actividades industriales, mineras y de otro tipo, es una grave preocupación ambiental (Patra *et al.*, 2020). La minería es la actividad que brinda a la sociedad los minerales que necesita para su desarrollo. En concreto la minería metálica representa un peligro potencial de contaminación porque pueden ocasionar emisiones de elementos potencialmente tóxicos, como los metales pesados y otros elementos asociados como el As, que pueden acumularse en el suelo alterando sus funciones ecosistémicas y pudiendo representar un peligro para el medio ambiente e incluso para la salud humana (Liu *et al.*, 2017). Una vez que los metales son introducidos en el medio ambiente se someten a procesos biológicos y químicos, que conducen a su distribución en suelos, sedimentos y agua, determinando su biodisponibilidad y toxicidad (El Khalil *et al.*, 2008).

Por tanto, las empresas mineras y las administraciones públicas deben evaluar el riesgo de la contaminación asociada con las actividades extractivas y promover medidas de prevención, protección y descontaminación, para garantizar la salud de nuestro entorno (Morales *et al.*, 2019). Cuando se tiene la sospecha que un suelo puede estar contaminado, se debe realizar una investigación orientada a identificar el grado de contaminación, la distribución de la misma, el tipo de contaminantes implicados, así como el grado de movilidad y su toxicidad potencial (Jiménez, 2017).

Son numerosas las medidas regulatorias, tanto para limitar las emisiones como para establecer estándares de limpieza de EPCs al suelo, a nivel nacional e incluso regional, que generalmente están basadas en la concentración total del elemento en suelo. Sin embargo, es reconocido en la bibliografía que las concentraciones totales de metales son malos predictores de toxicidad (Lanno *et al.*, 2004; Smolders *et al.*, 2009), siendo mejor la utilización de las concentraciones biodisponibles, que indican la cantidad de EPCs que son capaces de ser absorbidos por los organismos y así poder causar daños al ecosistema y/o incorporarse a la cadena trófica (van Gestel, 2008; Favas *et al.*, 2011; Niemeyer *et al.* 2015; Son *et al.* 2019). Por tanto, cuando se superan estos umbrales establecidos en función de las concentraciones totales es necesario la realización de estudios complementarios para la evaluación del riesgo de toxicidad ambiental y para la salud humana (Renaud *et al.*, 2017; Martínez *et al.*, 2018; Fajana *et al.*, 2020) que deben incluir bioensayos de toxicidad como herramientas eficaces para evaluar la contaminación real de los suelos, además de aportar información relevante y objetiva para regular el tipo de uso de suelo así como para planificar medidas de remediación (González *et al.*, 2011; García-Carmona *et al.*, 2017).

Existe una gran variedad de bioensayos para poder estimar la toxicidad de los suelos contaminados, siendo recomendable la utilización de diferentes tipos de organismos para la obtención de resultados más representativos y fiables (Romero-Freire *et al.*, 2016a; García-Carmona *et al.*, 2019a). De manera general se pueden dividir los bioensayos en dos tipos: los de fase líquida, donde interaccionan extractos líquidos del suelo con el organismo seleccionado y ensayos en fase sólida, donde se usa directamente el suelo potencialmente tóxico (Farré y Barceló, 2003; Martín *et al.*, 2010).

El bioensayo en fase líquida de germinación y elongación radicular de *Lactuca sativa* L., ha sido recomendado por muchas organizaciones internacionales para la determinación de los efectos ecológicos de las sustancias tóxicas y para pruebas de toxicidad (Escoto *et al.*, 2007; Lyu *et al.*, 2018) por ser sencillo, rápido, fiable, económico y no requerir de equipos costosos.

Las lombrices de tierra son comunes en los suelos, participan en la descomposición de la materia orgánica y en los procesos de formación del suelo, también pueden acumular fácilmente productos químicos del suelo e introducirlos en la cadena alimentaria. Romero-Freire *et al.* (2015a) indican que estos organismos son más susceptibles a la contaminación por metales que otros invertebrados del suelo, lo que los convierte en organismos adecuados para su uso como bioindicadores para determinar la toxicidad de sustancias químicas en el suelo y que *Eisenia andrei* ha sido adoptado como organismo estándar para pruebas ecotoxicológicas por la Unión Europea (EEC, 1984).

Uno de los indicadores de calidad y salud de los suelos está representado en gran medida por la actividad microbiana, que juega un papel fundamental en el mantenimiento de la fertilidad y el ciclo de nutrientes dentro del ecosistema (González-Pedraza *et al.*, 2014). Las comunidades microbiológicas responden de forma rápida y sensible a los cambios de las condiciones del suelo y, de este modo, suministran una información anticipada sobre las alteraciones de la calidad del mismo (Paolini, 2018). La actividad microbiana del suelo se puede estimar, entre otras formas, a través de la biomasa microbiana y/o de la respiración heterotrófica del suelo (Anderson y Domsch, 1990). La biomasa microbiana cuantifica la cantidad global de microorganismos presentes en un suelo, mientras que la respiración heterotrófica es el eslabón fundamental que cierra el ciclo del carbono en los ecosistemas terrestres, retornándolo a la atmósfera en forma de CO₂ (Paolini, 2018).

Además de la evaluación de riesgo ambiental por la presencia de elementos potencialmente tóxicos en el suelo, es necesario la estimación del riesgo para la salud humana. La Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos (USEPA) propone una serie de modelos empíricos para establecer el riesgo de toxicidad de los suelos para seres humanos que son ampliamente reconocidos a nivel internacional. Consideran distintas vías de exposición frente a los suelos contaminados (ingestión, inhalación y contacto dérmico), así como distinto nivel de riesgo considerando un individuo niño o un adulto y el escenario en el que se encuentre (USEPA, 2002; USEPA, 2017a).

En los suelos del CVG se ha detectado, en algunos sectores, una concentración de Pb y As por encima de los niveles reguladores para declarar un suelo como contaminado para Andalucía (Pastor-Jáuregui *et al.*, 2020 y 2021), por lo que según la ley 22/2011 de residuos y suelos contaminados (BOE, 2011), es necesario realizar una evaluación de riesgo ambiental y para la salud humana. Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue estimar el nivel de toxicidad actual de los suelos del CVG utilizando bioensayos con *Latuca sativa* L., *Eisenia andrei* e indicadores microbianos (respiración del suelo, biomasa microbiana y coeficiente metabólico) para evaluar el riesgo para el ecosistema y las ecuaciones reconocidas internacionalmente por la USEPA en caso del riesgo para la salud humana.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Muestreo de suelos

Para los bioensayos con *Latuca sativa* L., respiración basal y para el estudio del riesgo de exposición en seres humanos, se muestrearon, a lo largo del CVG, 84 parcelas georreferenciadas (10 x 10 m), distribuidas homogéneamente al azar, tomándose muestras compuestas de la parte superficial (0 a 10 cm), para obtener una muestra representativa de cada 100 m², de acuerdo con el sistema de muestreo propuesto por Martín Peinado (2001) y Aguilar *et al.* (2004a) en estudios anteriores.

Para el bioensayo con *Eisenia andrei*, en la parte norte del CVG más próxima a la mina, mediante imágenes satelitales se identificaron áreas fuertemente afectadas por contaminación residual (Figura 5.1), seleccionándose de forma aleatoria cuatro zonas sin vegetación, donde se tomaron muestras compuestas a 10 cm de profundidad. Estas áreas mantienen una alta concentración en EPCs, pH ácidos y elevada salinidad, por lo que presentan un especial interés, ya que la contaminación persistente puede ser foco de dispersión de elementos potencialmente tóxicos (Martín *et al.*, 2015; García-Carmona *et al.*, 2019b).



Figura 5.1 Área residual de contaminación

5.2.2 Métodos analíticos

Todas las muestras se homogeneizaron, se identificaron y se embolsaron en campo. Una vez trasladadas al laboratorio se secaron a temperatura ambiente y se tamizaron (<2 mm). Se realizaron los análisis mediante métodos estandarizados (MAPA, 1994).

La concentración total de contaminantes (Pb, As, Zn y Cu) se analizó por fluorescencia de rayos X (XRF) y la concentración de contaminantes solubles en agua se determinó en una suspensión 1:5 (suelo:agua), midiéndose mediante espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Para más detalles en la metodología de ensayos y análisis se puede consultar el Capítulo 2.

5.2.3 Evaluación de la toxicidad en el CVG

Para evaluar la toxicidad, en las 84 muestras compuestas recolectadas a lo largo del CVG, a 10 cm de profundidad, se realizó el bioensayo con *Lactuca sativa* L. de acuerdo con las recomendaciones de USEPA (1996) y OECD (2003) y el de respiración heterotrófica basal, determinando el carbono microbiano y calculando el coeficiente metabólico.

Se cumplió con los índices de fiabilidad de germinación de las semillas de lechuga, establecidos por el protocolo OECD (2003), que indica que la germinación en las muestras de control debe ser mayor al 90% y los controles realizados con agua destilada presentaron un valor medio de germinación de 98.1 %.

La respiración basal ($\mu\text{g CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{suelo}}^{-1}$) se midió siguiendo los protocolos adaptados de la respiración del suelo ISO 17155 (2012) y de transformación de carbono OECD 217 (2000), bajo condiciones controladas en el laboratorio. El carbono de la biomasa microbiana ($\mu\text{g C}_{\text{microb.}} \text{ g C}_{\text{suelo}}^{-1}$) se cuantificó utilizando el método de irradiación/incubación (Ferreira *et al.*, 1999). El

cociente metabólico (qCO_2) se obtiene con la relación entre la respiración del suelo, como indicador de la actividad microbiana del suelo, y el carbono de la biomasa microbiana, expresado como $ng\ C_{CO_2}\ \mu g\ C_{microb}^{-1}\ h^{-1}$, de acuerdo con Anderson y Domsch (1993). Valores más altos del coeficiente metabólico indican elevadas condiciones de stress para las comunidades microbianas del suelo (Nielsen y Winding, 2002), como sucede en presencia de altas concentraciones de metales potencialmente tóxicas (Stefanowicz *et al.*, 2020).

5.2.4 Evaluación de la toxicidad en áreas afectadas por contaminación residual en el CVG

La evaluación de la toxicidad en áreas del CVG afectadas por contaminación residual se realizó con los bioensayos con *Lactuca sativa* L. y *Eisenia andrei*, además de la determinación de la respiración heterotrófica basal. Para este estudio se seleccionaron 4 parcelas contaminadas, identificadas por la ausencia de vegetación, en las que se tomaron muestras compuestas para su análisis. Para el bioensayo con *Lactuca sativa* L. y para la determinación de respiración se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente.

El bioensayo con lombriz de tierra (*Eisenia andrei*) se realizó de acuerdo con el protocolo OECD (2015), analizando las variables: tasa de mortalidad, variación de peso (diferencia media en el peso de las lombrices a las 4 semanas en relación a su peso inicial) y reproducción (número de juveniles que nacen a las 8 semanas en relación a un suelo control no contaminado). Como suelo control se muestreó en el entorno del área contaminada, pero fuera de los límites del CVG, garantizando así que son suelos no afectados por el vertido.

5.2.5 Evaluación de riesgos para la salud humana en el CVG

El riesgo potencial de exposición al Pb y al As para niños y adultos en el CVG, se estima en base a modelos empíricos propuestos por la USEPA, considerando las vías de exposición por ingestión, inhalación y contacto dérmico.

Para evaluar el riesgo por ingestión se realizó el análisis de bioaccesibilidad *in vitro*, de acuerdo al procedimiento de la USEPA (2017b). Para estimar la dosis potencial diaria promedio de ingestión de suelo y polvo de un contaminante (DDP_{ing}) se utilizó la ecuación propuesta por la USEPA (2017a) recogida en esta tesis en el Capítulo 2 de Material y Métodos.

La concentración total de Pb y As, para la evaluación del riesgo por ingestión, se analizó mediante un espectrómetro ICP-MS (PE SCIEX ELAN-5000A).

La evaluación del riesgo para el ser humano de la inhalación de Pb y As se realizó según el procedimiento descrito en Islam *et al.* (2016). La ecuación utilizada para estimar la dosis potencial diaria promedio de inhalación de un contaminante (DDP_{inh}) se muestra en el Capítulo 2.

La evaluación del riesgo para el ser humano del contacto dérmico de Pb y As se realizó con muestras finamente molidas, de acuerdo al procedimiento estándar (USEPA, 2004). Para estimar la dosis potencial diaria promedio por contacto dérmico de un contaminante (DDP_{dermal}) se utilizó la ecuación propuesta por USEPA (2017a) (ver Capítulo 2).

La concentración total de Pb y As, para la evaluación del riesgo por inhalación y por contacto dérmico, se analizó por fluorescencia de rayos X (XRF), con un analizador portátil NITON XL3t-980 GOLDD+ (Niton, Billerica, EE.UU.).

El riesgo potencial de exposición a Pb y As para niños y adultos se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$CP = DDP_x / DcR_x$$

Donde:

CP = coeficiente de peligrosidad del elemento potencialmente tóxico

DDP_x = dosis potencial diaria promedio de las tres vías de exposición (mg kg⁻¹ día⁻¹)

DcR_x = dosis crónica de referencia de las tres vías (mg kg⁻¹ día⁻¹), para el elemento considerado (Tabla 5.1)

Si $CP > 1$, podría suponer riesgo para la salud.

En la Tabla 5.1 se muestran las dosis de referencia ($\text{mg kg}^{-1}\text{día}^{-1}$) para el Pb y el As.

Tabla 5.1. Dosis de referencia ($\text{mg kg}^{-1}\text{día}^{-1}$) de acuerdo con USEPA, 2002 e Islam *et al.*, 2016

Sigla	Parámetro	Pb	As
DcRing	Dosis crónica de referencia por ingestión	0.0036	0.0003
DcRinh	Dosis crónica de referencia por inhalación	0.0003	0.0003
DcRdermal	Dosis crónica de referencia dérmica	3.6	0.0041

5.2.6 Análisis estadístico

Previamente al tratamiento estadístico de los datos se realizó la prueba de distribución normal (Kolmogorov-Smirnov) y se comprobó la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene. Los datos se analizaron con el test de comparación de medias (ANOVA) y se realizaron subconjuntos homogéneos mediante la prueba de Tukey, determinando diferencias significativas entre parámetros para $p < 0.05$. En caso de no cumplir la normalidad y/o la homogeneidad de las varianzas, se realizaron test no paramétricos (Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney). La distribución de datos se estableció calculando los valores medios y las desviaciones estándar. A partir de los datos analíticos de las propiedades edáficas (pH, CE, CaCO_3 y CO) se realizó una división por tipos de suelos mediante un análisis de conglomerados jerárquicos (clúster). Para determinar la relación entre las distintas variables de estudio se realizó una correlación bivariada, determinando los coeficientes de correlación de Spearman. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software SPSS v. 23.0 (SPSS Inc., EE.UU.).

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Propiedades de los suelos

Aguilar *et al.* (2004a) dividieron la zona afectada por el vertido tóxico en 2 sectores de acuerdo con las propiedades principales de los suelos antes del accidente. El sector 1, más próximos a la mina, tenía suelos ácidos, no o ligeramente carbonatados y con textura franca a franco arenosa. El sector 2 tenía suelos neutros a ligeramente alcalinos con contenidos en carbonatos superiores al 5% y texturas más finas que las del sector anterior, oscilando entre franco arcillosa, franca y arcillo limosa.

A partir de los resultados del análisis de conglomerados jerárquicos (clúster) en función de las propiedades de los suelos, en este trabajo se han considerado 4 tipos de suelos (SS1-SS4) que se distribuyen geográficamente de manera heterogénea (Figura 5.2). Los suelos SS1 y SS2 se localizan en el tercio más septentrional del CVG, coincidiendo con suelos de textura franca, no o ligeramente carbonatados, pH más bajo y mayor salinidad (Tabla 5.2). En cambio, los suelos SS3 y SS4 se intercalan a lo largo de los dos tercios más meridionales del CVG y representan suelos alcalinos, carbonatados y con texturas más finas. En comparación con los sectores definidos por Aguilar *et al.* (2004a), los suelos SS1 y SS2 coinciden geográficamente con los suelos del sector 1, mientras que SS3 y SS4 lo hacen con el sector 2. En general, se puede apreciar que, dos décadas después del accidente y tras las tareas de limpieza y adición de enmiendas a los suelos del CVG, los suelos se han recuperado en gran medida y actualmente presentan propiedades semejantes a los suelos originales.

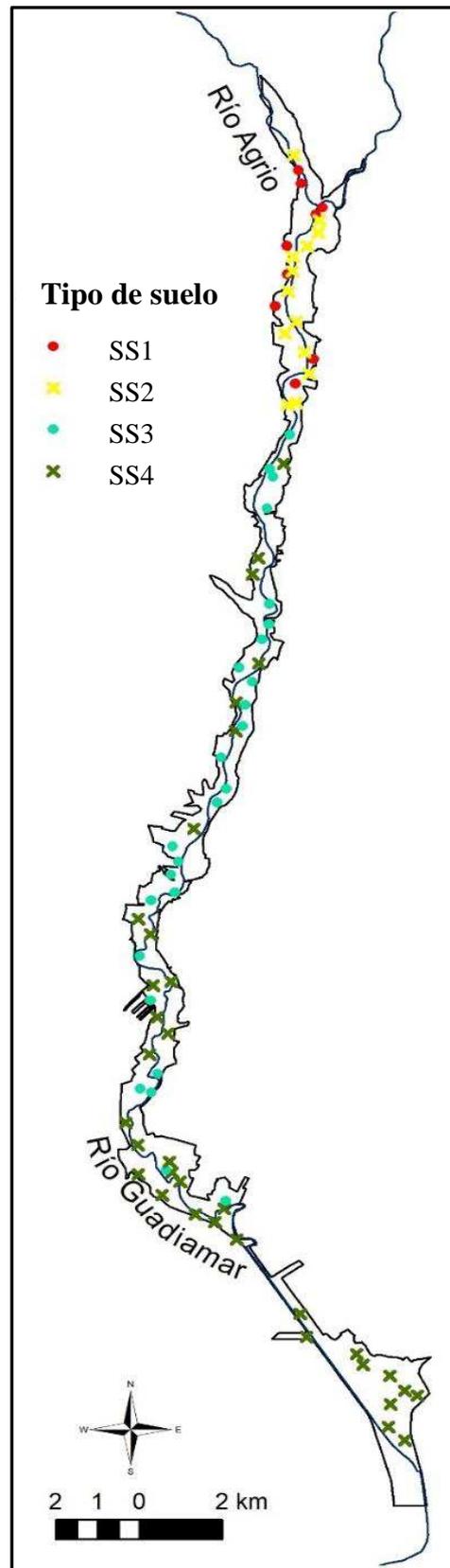


Figura 5.2. Localización y tipos de suelos a lo largo del CVG

Tabla 5.2. Propiedades de los suelos del CVG

Tipo de suelo	Textura	pH	CE (dS m ⁻¹)	CaCO ₃ (%)	CO (%)
SS1	Franca	5.88 b (1.80)	2.73 a (2.30)	0.83 b (1.26)	1.55 a (0.45)
SS2	Franca	7.99 a (0.65)	1.08 b (0.63)	5.52 b (7.07)	1.69 a (0.68)
SS3	Franco arcillosa	8.38 a (0.22)	0.59 b (0.38)	15.14 a (7.99)	1.85 a (0.66)
SS4	Arcillo limosa	8.08 a (0.36)	0.82 b (0.69)	12.81 a (5.32)	1.96 a (0.41)

Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tipos de suelos (prueba Tukey HDS $p < 0.05$)

Los suelos afectados por el vertido aumentaron mucho la acidez, llegando en muchos casos a valores por debajo de pH=4 (Aguilar *et al.*, 2004a) debido a la acidez de las aguas (pH≈5) (Cabrera, 2000) y de los lodos que, dada su heterogeneidad, oscilaba entre pH=4.1 y pH=5.1 (Simón *et al.*, 1999). La acidificación de los suelos se agravó por la oxidación del lodo en superficie, e incluso continuó tras las tareas de retirada del lodo, en restos que quedaron atrapados en las grietas del suelo (Dorronsoro *et al.*, 2002).

La oxidación continuada de los sulfuros contenidos en el lodo incrementa significativamente el contenido en sulfatos solubles del suelo, dando lugar a un aumento acusado de la salinidad de los suelos, que con el tiempo se ha ido reduciendo significativamente, sobre todo en el sector carbonatado del CVG (Pastor-Jauregui *et al.*, 2021) que coincide con los suelos tipo SS3 y SS4.

Pese a la evolución positiva del pH y de la salinidad de los suelos del CVG, todavía se han detectado suelos ácidos en los que la salinidad es elevada, que corresponden al tipo SS1, localizados en la zona más próxima a la mina. Estos resultados están de acuerdo con los trabajos publicados por Aguilar *et al.* (2007), Simón *et al.* (2008) y Martín *et al.* (2015), que indican la persistencia de contaminación residual en zonas puntuales del corredor.

El aumento de carbonatos es significativamente mayor en los SS3 y SS4, con respecto a SS1 y SS2, debidos a que éstos últimos eran de naturaleza no o ligeramente carbonatados (Aguilar *et al.*, 2004a), a pesar de que, con las medidas de encalado, las dosis de carbonatos aplicados en el primer tercio del CVG fueron mayores, 60-90 t ha⁻¹ frente a las 20 t ha⁻¹ aplicadas en los otros suelos (Pastor-Jáuregui *et al.*, 2021).

El contenido de CO no presenta diferencia estadística significativa entre los tipos de suelos considerados e incluso se alcanzan valores superiores a los existentes antes del accidente (Aguilar *et al.*, 2004a). Este hecho puede ser debido a la abundante vegetación existente en la actualidad a lo largo del CVG, que aporta una mayor cantidad de materia orgánica al suelo en comparación con el uso agrícola anterior.

5.3.2 Concentraciones totales y solubles de EPCs

Debido a la naturaleza de los residuos almacenados en la balsa de estériles de la mina de Aznalcóllar, el agua ácida y el lodo vertido y depositado en los suelos de la cuenca del río Guadiamar dieron lugar a una severa contaminación de los mismos por EPCs, destacando las concentraciones alcanzadas de As, Bi, Cd, Cu, Pb, Sb, Tl y Zn (Alastuey *et al.*, 1999; Cabrera *et al.*, 1999; Simón *et al.*, 1999). Gracias a las medidas de remediación y al paso del tiempo, se han reducido las concentraciones de muchos de ellos, centrándose los últimos trabajos en la zona principalmente en aquellos que persisten en concentraciones más elevadas como son Pb, As, Zn, Cu y Cd (Madejón *et al.*, 2006b; Martín *et al.*, 2015; Romero-Freire *et al.*, 2016a; Sierra *et al.*, 2019), aunque son los dos primeros los que actualmente presentan riesgos potenciales de toxicidad.

En la Tabla 5.3 se presentan los resultados de los valores medios de las concentraciones totales (T) y solubles en agua (S) de los EPCs en los suelos, según los cuatro tipos de suelo considerados en el CVG.

Tabla 5.3. Valores medios (desviación estándar) de las concentraciones (mg kg^{-1}) de elementos potencialmente contaminantes en los suelos, según tipo de suelo (T = totales, S = solubles)

Total	SS1	SS2	SS3	SS4
PbT	672.96 a (397.05)	165.62 b (80.13)	70.74 b (33.20)	121.62 b (88.21)
AsT	307.45 a (106.55)	90.63 b (51.16)	33.59 c (16.81)	62.84 bc (45.86)
ZnT	500.53 a (300.21)	253.58 b (112.89)	213.55 b (92.89)	507.94 a (181.79)
CuT	180.09 a (56.92)	70.33 c (42.71)	54.11 c (25.16)	112.03 b (42.78)
PbS	0.03 a (0.04)	0.02 a (0.01)	0.03 a (0.03)	0.05 a (0.07)
AsS	0.06 ab (0.09)	0.05 ab (0.04)	0.05 b (0.03)	0.10 a (0.06)
ZnS	24.30 a (41.54)	0.07 b (0.05)	0.14 b (0.11)	0.33 b (0.16)
CuS	1.90 a (3.87)	0.08 b (0.04)	0.10 b (0.07)	0.26 b (0.11)

Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tipos de suelo (Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney, $p < 0.05$)

En los suelos SS1 persisten concentraciones totales de EPCs más elevadas, que coinciden con los suelos más ácidos y con mayor salinidad. En este sentido, Martín *et al.* (2008) y Otero *et al.* (2012) relacionan el grado de acidez y de salinidad con suelos más contaminados, debido a la formación de sulfatos solubles por la oxidación del lodo. Los suelos SS2, aunque geográficamente comparten el tercio norte del CVG, presentan concentraciones totales de los EPCs significativamente menores y similares a las reportadas por Romero-Freire *et al.* (2016a), Sierra *et al.* (2019), García-Carmona *et al.* (2019b) y Pastor-Jáuregui *et al.*, (2020 y 2021) en suelos que se consideran recuperados dentro de la misma zona del CVG.

Los suelos SS3 y SS4 presentan concentraciones totales de Pb y As iguales o inferiores a las de SS2, diferenciándose estadísticamente de los suelos más contaminados representados por los suelos SS1. En cambio, el Zn y Cu presentan valores totales singularmente altos en los suelos SS4, alcanzando incluso valores similares al de los suelos SS1 en el caso del Zn. El Pb y As son considerados elementos poco móviles en los suelos contaminados mientras que el Cu, y sobre todo el Zn, presentan una mayor movilidad (Kraus y Wiegand, 2006; Simón *et al.*, 2009). Este es el motivo por el que Martín *et al.* (2015) justifican la disminución del Zn y del Cu en los primeros 10 cm de los suelos del corredor desde 2004 a 2013. Las diferencias en la concentración de estos elementos entre los suelos SS3 y SS4, que comparten su distribución geográfica, puede deberse al mayor contenido en arcilla de los suelos SS4 que puede disminuir su permeabilidad y reducir el lavado. Además, la concentración media de Zn en SS4, similar a la de los suelos SS1, se puede justificar por la afinidad con las arcillas en los procesos de fijación de este elemento en el suelo (Bradl, 2005).

La concentración soluble de los EPCs representa la fracción más fácilmente asimilable por los organismos y las plantas del suelo, por lo que es necesario tenerla en cuenta en los estudios de toxicidad, así como para establecer niveles regulatorios que permitan declarar suelos contaminados debido a su mejor correlación con los bioensayos de toxicidad (García-Carmona *et al.*, 2019a). La solubilidad de los elementos considerados, después de dos décadas del vertido, están dentro del orden de magnitud de los valores reportados por numerosos autores (Martín *et al.*, 2015; Romero-Freire *et al.*, 2016a; García-Carmona *et al.*, 2019b; Pastor-Jáuregui *et al.*, 2020 y 2021; Paniagua-López *et al.*, 2021), lo que pone de manifiesto la efectividad de las medidas de remediación llevadas a cabo por el Gobierno Regional de Andalucía. No obstante, los suelos SS1 presentan concentraciones solubles de Cu y, sobre todo de Zn, significativamente más altas que las del resto de los suelos. La solubilidad de estos elementos está condicionada por la acidez del suelo, precipitando por encima de pH=6 (Rieuwerts *et al.*, 1998), lo que justifica las elevadas concentraciones solubles halladas en los suelos SS1 por su naturaleza

ácida. De hecho, dentro de los suelos SS1, existen dos muestras con valores extremos de concentración de Zn soluble (114 y 73 mg kg⁻¹), coincidiendo con pH del suelo de 3.6 y 4.3, respectivamente, pero las concentraciones totales (262 y 582 mg kg⁻¹) están en el rango o incluso por debajo de la concentración total media de Zn para los suelos SS1 (500 mg kg⁻¹, DE=300). De acuerdo con Rieuwerts *et al.* (1998), el Cu es menos móvil que el Zn, presentando el primero una gran afinidad por la materia orgánica y por los óxidos como mecanismo de retención en el suelo (Bradl, 2005), pudiendo ser esta la causa de la menor concentración de Cu soluble medida en los suelos SS1 en comparación con la del Zn.

5.3.3 Evaluación de la toxicidad en los suelos del CVG

La realización de bioensayos en suelos de zonas contaminadas permite estimar el riesgo ecotoxicológico actual de los suelos en condiciones naturales (Fernández *et al.*, 2006). Dependiendo del elemento potencialmente tóxico presente en el suelo, puede producir toxicidad en un organismo concreto y en otros no (Matejczyk *et al.*, 2011; Baderna *et al.*, 2015), es por ello que en suelos contaminados por una mezcla de elementos es muy difícil atribuir los efectos tóxicos a un elemento en particular, dadas las posibles sinergias o antagonismos entre ellos (Spurgeon y Hopkin, 1995). Esto justifica la necesidad de usar bioensayos con distintos organismos para obtener una evaluación del riesgo ecotoxicológico fiable en suelos con una contaminación multielemental (Romero-Freire *et al.*, 2016a).

Para la evaluación del riesgo ecotoxicológico de los suelos del CVG se realizaron bioensayos en fase líquida con *Lactuca sativa* L. y en fase sólida mediante la determinación de la tasa de respiración heterotrófica, estableciendo también el grado de estrés de los microorganismos del suelo a partir del coeficiente metabólico, que expresa la razón entre la tasa de respiración y la biomasa microbiana del suelo (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Valores medios (desviación estándar) de los resultados de los bioensayos con *Lactuca sativa* L. y actividad microbiana, según los tipos de suelo (SS1-SS4)

Tipo de suelo	<i>Lactuca sativa</i> L.		Actividad microbiana		
	Germinación (%)	Elongación (%)	Respiración ($\mu\text{g CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}_{\text{suelo}}^{-1}$)	Biomasa microbiana ($\mu\text{g C}_{\text{microb}} \text{ g C}_{\text{suelo}}^{-1}$)	qCO ₂ ($\text{ng C}_{\text{CO}_2} \mu\text{g C}_{\text{microb}}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
SS1	85.00 b (32.11)	43.17 c (26.13)	8.06 a (5.76)	798.26 a (1192.56)	23.87 a (21.00)
SS2	99.09 a (2.02)	66.29 b (24.37)	7.86 a (3.97)	730.53 a (534.17)	18.12 ab (13.61)
SS3	97.40 a (3.57)	96.98 a (8.75)	7.53 a (2.71)	1561.36 a (1394.43)	9.42 b (11.09)
SS4	97.18 a (3.40)	99.41 a (3.68)	5.64 a (2.15)	1426.71 a (921.00)	5.38 b (3.61)

Las letras minúsculas indican diferencias significativas entre tipos de suelos (Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney, $p < 0.05$)

La tasa de germinación de las semillas de lechuga en los suelos SS1 es significativamente menor que la del resto de tipos de suelos considerados, mientras que la elongación radicular es significativamente menor en los tipos de suelos SS1 y SS2, respecto a los tipos SS3 y SS4, que se localizan en los dos tercios más distantes a la mina y que no presentan toxicidad en este bioensayo. La elongación radicular es por tanto una medida más sensible a la toxicidad que la tasa de germinación, resultados que están de acuerdo con los recogidos en la bibliografía (Bagur-González *et al.* 2011). Nuestros resultados para los suelos SS1 y SS2 son consistentes con los reportados por Romero-Freire *et al.* (2016a), con un porcentaje de elongación radicular en suelos recuperados, localizados en el tercio del corredor más próximo a la mina, de algo menos del 60%, mientras que, en suelos del tercio medio y distal respecto a la mina, la elongación es del 70%, frente a los valores próximos al 100% obtenidos en los suelos SS3 y SS4.

La respiración heterotrófica del suelo está relacionada con la fertilidad y la calidad del suelo (ISO, 2012; Niemeyer *et al.*, 2012). La contaminación puede afectar cuantitativa y cualitativamente a los microorganismos del suelo (Stefanowicz *et al.*, 2008; Shukurov *et al.*, 2014) y a los procesos en los que intervienen, como su papel en el ciclo de los nutrientes en el suelo y en los procesos de mineralización y síntesis de compuestos orgánicos (Moreno *et al.*, 2009; Nwachukwu y Pulford, 2011). La disminución de la actividad microbiana debida a la presencia de contaminantes en el suelo provoca una reducción de la cantidad de dióxido de carbono producido, por lo que puede usarse como indicadora del stress de las comunidades microbianas (Dai *et al.*, 2004; Azarbad *et al.*, 2013). Los datos de respiración heterotrófica basal medidos en el CVG no mostraron diferencias significativas entre los distintos tipos de suelos considerados. De hecho, existe una gran controversia sobre el uso de la tasa de respiración como indicador de la contaminación y en este sentido hay autores que no encuentran correlación entre la tasa de respiración y la toxicidad potencial (Wakelin *et al.*, 2010; Zornoza *et al.*, 2015) o incluso autores que reportan una correlación positiva entre la respiración y el grado de contaminación, como Dinesh *et al.*, (2012) y Romero-Freire *et al.* (2016b).

La biomasa microbiana es otro indicador biológico que puede aportar información sobre la calidad del suelo y su respuesta frente a la incorporación de elementos contaminantes o a la aplicación de medidas de enmienda, ya que los microorganismos responden más rápido a estos cambios que las propiedades fisicoquímicas del suelo (Nannipieri *et al.*, 2017; Oijagbe *et al.*, 2019). Como consecuencia de la exposición de la microbiota del suelo a EPCs puede reducirse la biomasa microbiana debido a la muerte celular causada por la alteración de funciones esenciales o por un incremento inasumible del coste energético vital (Akmal y Jianming, 2009; Oijagbe *et al.*, 2019). Nuestros resultados muestran que no existen diferencias significativas de la biomasa microbiana entre los cuatro tipos de suelos, pese a que los valores medios de los suelos SS3 y SS4 son casi el doble que los de los suelos SS1 y SS2. Estos resultados concuerdan con los obtenidos a partir del bioensayo con lechuga, mostrando síntomas de toxicidad en los suelos SS1 y SS2.

El cociente metabólico (qCO_2) es quizás el índice más usado cuando se quiere describir la eficiencia de los microorganismos en el uso de la energía con el correspondiente aumento de la biodiversidad en la sucesión de ecosistemas hacia la madurez, y se ha usado para comparar el impacto que tienen los cambios estacionales, sistemas de manejo, adición de metales, agroquímicos y xenobióticos sobre los microorganismos del suelo (Paolini, 2018). El qCO_2 permite diagnosticar la eficiencia de la biomasa microbiana en la utilización del carbono del suelo en términos de gasto en respiración (Anderson y Domsch, 1990). De acuerdo con este índice, en SS1 los microorganismos estarían sujetos a un mayor estrés en comparación con los otros tipos de suelos, coincidiendo con unas condiciones edáficas más limitantes en términos de salinidad y acidez, y de una mayor concentración de EPCs. Bajo condiciones desfavorables, los microorganismos requieren más energía para mantener la biomasa y por lo tanto aumenta el qCO_2 y el carbono se pierde como CO_2 (Insam y Domsch, 1988), pudiendo justificar la mayor tasa de respiración y menor contenido en biomasa microbiana en los suelos SS1, donde el qCO_2 es significativamente más alto. Esta circunstancia puede ser indicativa de un cambio en la estructura y diversidad de las poblaciones microbianas en suelos contaminados respecto a los suelos naturales, ya que los microorganismos son capaces de desarrollar resistencias y resiliencia frente a determinados EPCs (Allison y Martiny, 2008; Hänsch y Emmerling, 2010). En este sentido, Paniagua-López *et al.* (2021) describen diferencias entre suelos contaminados y suelos recuperados en el CVG en cuanto a número de copias de genes, biodiversidad microbiana (Índice de Shannon) y la estructura de las comunidades bacterianas a nivel de género.

En la Tabla 5.5 se presentan los valores de los coeficientes de correlación de Spearman entre la elongación y el cociente metabólico, con respecto a las variables analizadas, donde se observa que en los tipos de suelos SS1 y SS2, en los que se detectó toxicidad, presentaron correlaciones significativas con alguna de las variables analizadas en esta tesis.

Tabla 5.5. Valores de los coeficientes de correlación de Spearman entre la elongación radicular de lechuga (Elong.) y el coeficiente metabólico (qCO₂), y algunas variables de estudio

Variable	SS1		SS2	
	Elong.	qCO ₂	Elong.	qCO ₂
Respiración	0.964**		0.620	
pH	0.917**	-0.143	0.578	-0.030
CE	-0.717*	0.536	-0.257	-0.079
CaCO ₃	0.686*	0.036	0.413	-0.358
PbT	0.217	0.429	-0.697*	0.321
AsT	0.167	0.893**	-0.624*	0.188
ZnT	0.533	-0.071	-0.606*	-0.115
ZnS	-0.917**	-0.143	-0.468	0.164
CuS	-0.833**	-0.036	-0.009	0.539

** La correlación es significativa al nivel 0.01 (bilateral)

* La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral)

En el SS1, la elongación radicular de la semilla de lechuga se correlaciona directamente con el pH, los carbonatos y la tasa de respiración, mientras que lo hace de manera inversa con la salinidad y la concentración soluble de Zn y Cu, mientras que el qCO₂ solo se correlaciona significativamente con la concentración de As. Los suelos SS1 son los que presentan mayor toxicidad atendiendo a la elongación radicular y al qCO₂ y coinciden con los suelos más ácidos y con mayor salinidad, parámetros que en la zona de estudio se han relacionado con el grado de contaminación de los suelos (Simón *et al*, 2010).

El bioensayo de la elongación radicular, en comparación con el coeficiente metabólico, se ha mostrado más sensible a la contaminación, posiblemente debido a la limitación que representa la respiración basal como indicadora de la toxicidad del suelo. En cambio, la sensibilidad del bioensayo de la elongación radicular de la semilla de lechuga está reconocida ampliamente en la bibliografía como una herramienta eficaz para la evaluación de riesgos

ecotoxicológicos (Martín *et al.*, 2010; Lors *et al.*, 2011; Romero-Freire *et al.*, 2014 y 2015b; García-Carmona *et al.*, 2019b; Hong *et al.*, 2021).

5.3.4 Evaluación de la toxicidad en áreas afectadas por contaminación residual en el CVG

Dada la magnitud del accidente y el nivel de contaminación alcanzado por los suelos afectados por el vertido, el Gobierno Regional de Andalucía invirtió una enorme cantidad de recursos humanos, técnicos y económicos para la recuperación de la zona, que finalmente fue declarada Paisaje Protegido, lo que hoy conocemos como el Corredor Verde del río Guadiamar (CMA, 2003). No obstante, aproximadamente el 7% de la superficie afectada por el vertido continúa contaminada, distribuida aleatoriamente en manchas heterométricas fácilmente identificables por la ausencia de vegetación, donde los suelos son ácidos, con elevada salinidad y alta concentración total y biodisponible de EPCs (Martín *et al.*, 2015). Estas manchas contaminadas son consecuencia de deficiencias en las tareas de limpieza y retirada de lodo que se realizaron poco después del accidente, que da lugar a la continua oxidación en profundidad de los restos de lodo que persistieron (Simón *et al.*, 2008) y que representan un riesgo de difusión de la contaminación vinculado a la erosión y/o al lixiviado al no estar estabilizados los suelos por la vegetación (Madejón *et al.*, 2006b).

Las manchas sin vegetación seleccionadas presentan un pH ácido y salinidad elevada, con una concentración en EPCs claramente superior a la de los suelos no contaminados próximos (Tablas 5.6 y 5.7). Los resultados obtenidos en las manchas son similares a los reportados por Paniagua-López *et al.* (2021) y sensiblemente superiores a los de Sierra *et al.* (2019) y García-Carmona *et al.* (2019a), que analizan suelos de manchas sin vegetación, localizadas en la parte alta del CVG, próximas a la mina. Las concentraciones de EPCs reportados por estos autores en los suelos recuperados son superiores a los determinados en este trabajo en suelos no contaminados próximos al CVG ya que éstos no se vieron afectados por el vertido.

Tabla 5.6. Concentraciones totales y solubles (mg kg^{-1}) medias (desviación estándar) de los elementos potencialmente tóxicos en las manchas de suelos contaminados y suelos no contaminados

	PbT	AsT	ZnT	CuT
Suelo contaminado	879.31 (428.44)	434.70 (128.12)	345.92 (179.42)	162.91 (64.24)
Suelo no contaminado	81.61 (33.71)	19.48 (7.10)	74.23 (34.65)	44.23 (16.18)
	PbS	AsS	ZnS	CuS
Suelo contaminado	0.01 (0.01)	0.07 (0.08)	48.69 (32.57)	10.40 (9.56)
Suelo no contaminado	0.01 (0.00)	0.03 (0.01)	0.24 (0.12)	0.19 (0.08)

Tabla 5.7. Valores medios (desviación estándar) de pH, salinidad y bioensayos realizados en las manchas de suelos contaminados y suelos no contaminados

	pH	CE (dS m^{-1})	<i>Eisenia andrei</i>		<i>Lactuca sativa</i> L	Respiración basal ($\mu\text{g CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$)
			Variación peso (%)	Juveniles (%)	Elongación (%)	
Suelo contaminado	3.53 (0.22)	3.05 (0.93)	-13.13 (11.71)	2.46 (4.26)	11.1 (27.2)	0.87 (0.35)
Suelo no contaminado	6.84 (1.16)	0.41 (0.08)	47.13 (19.56)	100.00 (25.29)	100.0 (0.0)	5.51 (1.95)

De acuerdo con García-Carmona *et al.* (2019b), la ausencia de vegetación en las manchas está condicionada por la concentración de EPCs más móviles (Zn y Cu), que disminuyen su fracción soluble y cambiante en los suelos recuperados con pH neutros y mayor contenido en materia orgánica. Nuestros resultados para el Zn y el Cu solubles (Tabla 5.6) son muy superiores a los reportados por Sierra *et al.* (2019) (7.3 y 4.8 mg kg^{-1} de Zn y Cu solubles, respectivamente), García-Carmona *et al.* (2019a) (6.7 y 0.7 mg kg^{-1} de Zn y Cu solubles, respectivamente) y Paniagua-López *et al.* (2021) (16.7 y 8.3 mg kg^{-1} de Zn y Cu solubles, respectivamente).

Los bioensayos de respiración heterotrófica basal y elongación radicular confirmaron una respuesta tóxica en los suelos de las manchas sin vegetación, reduciéndose la respuesta de la semilla de lechuga y la tasa de respiración 9 y 5 veces, respectivamente, respecto a los suelos no contaminados (Tabla 5.7). En los suelos contaminados sin vegetación, Romero-Freire *et al.* (2016a) reportan tasas de respiración menores de $0.5 \mu\text{g CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ mientras que Paniagua-López *et al.* (2021) registran valores próximos a $1 \mu\text{g CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, semejantes a nuestros resultados. Los resultados de la reducción de la elongación radicular de la semilla de lechuga incubadas en extractos de los suelos de las manchas obtenidos también son consistentes con la bibliografía, que recoge una reducción del 90% respecto al control con agua destilada (Romero-Freire *et al.*, 2016a; García-Carmona *et al.*, 2017; Paniagua-López *et al.*, 2021).

Debido a los indicios de contaminación existentes en las manchas, puestos de manifiesto por la ausencia de vegetación y por los resultados obtenidos con los bioensayos con *L. sativa* y respiración heterotrófica, se realizó el bioensayo de toxicidad con lombriz (*E. andrei*) para incluir una especie de invertebrado que complete la evaluación del riesgo de toxicidad para el ecosistema. Las lombrices son sensibles a la contaminación por EPCs, más que otros invertebrados (Spurgeon y Hopkin, 1996), además crecen fácilmente en condiciones de laboratorio, tienen una alta tasa de reproducción, son sensibles a numerosos contaminantes y su tamaño permite un manejo sencillo (Nahmani *et al.*, 2007a) por lo que las hace una especie de elección para estos estudios ecotoxicológicos (EEC, 1984; ISO, 2008; OECD, 2015). La exposición de la lombriz a un elemento potencialmente tóxico puede ser por ingestión del suelo contaminado o bien por contacto dérmico, pudiendo cualquiera de las dos vías de exposición causar la muerte, la pérdida de peso o la afectación de su capacidad reproductiva (Hobbelen *et al.*, 2006; Kılıç, 2011; Leveque *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2008).

La tasa de mortalidad medida en los suelos contaminados y no contaminados no resultó ser un buen indicador de la toxicidad ya que las lombrices sobrevivieron en los dos suelos utilizados. Estos resultados están de acuerdo

con Nahmani *et al.* (2007b) que indica la baja sensibilidad de este parámetro en bioensayos de toxicidad con lombrices en suelos. En cambio, se observa que en los suelos contaminados disminuye el peso de las lombrices ligeramente (-13%), pero esta diferencia es considerable si comparamos con la ganancia de peso experimentada en los suelos no contaminados (+47%). No obstante, no podemos asegurar que este hecho sea debido exclusivamente a la concentración de EPCs del suelo contaminado, ya que condiciones extremas del suelo, como es el caso de los pH tan ácidos de los suelos contaminados pueden influir también en el desarrollo de la lombriz (García-Gómez *et al.*, 2014; Romero-Freire *et al.*, 2015a; Aziz *et al.*, 2019; Lorente-Casalini *et al.*, 2021).

La capacidad reproductora expresada en el porcentaje de juveniles respecto a los contabilizados en el suelo no contaminado ha resultado ser un buen indicador de la toxicidad, ya que los suelos contaminados presentan una reducción en la población de juveniles muy acusada. Este parámetro ha mostrado una gran sensibilidad en bioensayos con distintas especies de lombriz en suelos contaminados con As, Cu y Zn (García-Gómez *et al.*, 2014), As y Zn (Romero-Freire *et al.*, 2015a y 2017) y Cd y Zn (Spurgeon y Hopkin, 1996).

5.3.5 Evaluación de la exposición humana a la toxicidad

Los suelos contaminados con EPCs pueden representar un riesgo para la salud humana por ingestión directa de suelos (Luo *et al.*, 2011; Okorie *et al.*, 2011), inhalación de partículas (Laidlaw y Filippelli, 2008; Schmidt, 2010) o contacto dérmico (Siciliano *et al.*, 2009), especialmente en zonas residenciales o parques (Ljung *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2012a y b).

Los suelos del CVG están destinados en la actualidad a uso recreativo, siendo una zona de disfrute para pasear o hacer deporte en la naturaleza para niños y adultos. No obstante, existen zonas del corredor donde se sobrepasan los NGR establecidos por el Gobierno Regional de Andalucía para EPCs, como es el caso de Pb y del As (275 y 36 mg kg⁻¹, respectivamente), en un porcentaje de

superficie del CVG del 13% para el caso del Pb y del 70% para el As (Pastor-Jáuregui *et al.*, 2020). Por lo que una evaluación de los riesgos para la salud humana se revela imprescindible para garantizar la seguridad del uso recreativo del corredor.

Tanto el Pb como el As son considerados elementos no esenciales que pueden suponer un riesgo para la salud humana cuando su concentración y biodisponibilidad es elevada en suelos (Kabata-Pendias, 2000; Nagajyoti *et al.*, 2010), sobre todo en el caso de exposiciones prolongadas en el tiempo ya que pueden desencadenar enfermedades de tipo cardiovasculares, del sistema nervioso, de la sangre, hepáticas y de los huesos (Bhattacharya *et al.*, 2007; Nriagu *et al.* 2007; Liu *et al.*, 2017; OMS, 2018).

Estos elementos pueden ser transferidos al agua, al suelo y a las plantas y llegar al hombre a través de la cadena trófica o por ingestión directa, representando una amenaza para la salud humana (Bi *et al.*, 2006). Por lo tanto, es necesario estudiar la transferencia de metales pesados del suelo a los seres humanos, tanto para la evaluación de riesgos para la salud humana como para el control de la contaminación (Liu *et al.*, 2017).

Para determinar el riesgo de toxicidad humana por la exposición a los suelos del CVG, se han determinado los coeficientes de peligro de los elementos potencialmente tóxicos (Pb y As), los cuales se muestran en la Tabla 5.8. Se han considerado las vías de exposición de ingestión, contacto dérmico y de inhalación como las más probables en la zona. También se consideran como individuos a niños y a adultos, y en ambos casos se ha considerado una exposición de 75 días al año, dado el uso recreativo al que está dedicado el corredor.

Tabla 5.8. Coeficientes de peligro del Pb y del As

Sector	Coeficiente de peligro del Pb					
	Niños			Adultos		
	Ingestión	Inhalación	Dermal	Ingestión	Inhalación	Dermal
SS1	14x10 ⁻⁴	7 x10 ⁻⁴	14 x10 ⁻⁴	2 x10 ⁻⁴	2 x10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴
SS2	33 x10 ⁻⁴	2 x10 ⁻⁴	4 x10 ⁻⁴	4 x10 ⁻⁴	1 x10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴
SS3	44 x10 ⁻⁴	1 x10 ⁻⁴	2 x10 ⁻⁴	5 x10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴
SS4	74 x10 ⁻⁴	1 x10 ⁻⁴	3 x10 ⁻⁴	9 x10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴	< 10 ⁻⁴

Sector	Coeficiente de peligro del As					
	Niños			Adultos		
	Ingestión	Inhalación	Dermal	Ingestión	Inhalación	Dermal
SS1	216 x10 ⁻⁴	3 x10 ⁻⁴	57.5 x10 ⁻²	25 x10 ⁻⁴	1 x10 ⁻⁴	55 x10 ⁻⁴
SS2	153 x10 ⁻⁴	1 x10 ⁻⁴	16.9 x10 ⁻²	18 x10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	16 x10 ⁻⁴
SS3	187 x10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	628 x10 ⁻⁴	22 x10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	6 x10 ⁻⁴
SS4	262 x10 ⁻⁴	1 x10 ⁻⁴	11.7 x10 ⁻²	30 x10 ⁻⁴	<10 ⁻⁴	11 x10 ⁻⁴

En base a los resultados de cada una de las vías de exposición y considerando el individuo niño y adulto, se calcula el riesgo de la exposición humana a la toxicidad en el CVG como la sumatoria de los coeficientes de peligro por las tres vías para cada individuo (Tabla 5.9).

Tabla 5.9. Evaluación del riesgo de toxicidad a causa de la exposición a Pb y a As presentes en el CVG

Sector	Pb		As	
	Niños	Adultos	Niños	Adultos
SS1	35 x10 ⁻⁴	3 x10 ⁻⁴	59.7 x10 ⁻²	80 x10 ⁻⁴
SS2	39 x10 ⁻⁴	4 x10 ⁻⁴	18.5 x10 ⁻²	34 x10 ⁻⁴
SS3	46 x10 ⁻⁴	5 x10 ⁻⁴	8.1 x10 ⁻²	28 x10 ⁻⁴
SS4	78 x10 ⁻⁴	9 x10 ⁻⁴	14.4 x10 ⁻²	42 x10 ⁻⁴

A partir de los resultados obtenidos, se observa que no existe un potencial riesgo para la salud humana en los suelos del CVG pese a que se superen los NGR establecidos en la zona, debido a que el coeficiente de peligro para ambos elementos es menor de 1. Esto se justifica por el corto periodo de

exposición considerado, de 75 días al año, a la hora de realizar los cálculos ya que se trata de una zona de uso recreativo y ocasional. En cambio, Pecina *et al.* (2021) desaconsejan el desarrollo de zonas recreativas en áreas fuertemente contaminadas que han sido recuperadas. Por lo tanto, un seguimiento en el tiempo de la concentración total y biodisponible de elementos potencialmente tóxicos en suelo y del riesgo de toxicidad para el ecosistema y la salud humana deberían realizarse en el CVG.

5.4 Conclusiones

Los bioensayos de toxicidad realizados muestran la existencia de un riesgo de toxicidad para el ecosistema, fundamentalmente en la parte alta del corredor y de manera más evidente en las manchas sin vegetación distribuidas aleatoriamente en esta zona. En cambio, no hemos identificado riesgos para la salud humana pese a las concentraciones elevadas de EPCs registradas, incluso considerando un período de exposición al año de 75 días de uso recreativo del CVG. No obstante, dadas las concentraciones totales elevadas de Pb y de As, las solubles de Zn y Cu registradas en algunos puntos del CVG, junto con la toxicidad para el ecosistema que arrojan los bioensayos de toxicidad, sería necesario un seguimiento en el tiempo de los riesgos medioambientales para garantizar la seguridad del disfrute de este espacio natural.

CAPÍTULO 6

Discusión general

El suelo tiene una capacidad de depuración, pero ¿qué sucede cuando existen tantos elementos contaminantes que bloquean esta capacidad? La contaminación del suelo por EPCs es una preocupación mundial porque no se degradan y quedan retenidos en los suelos. En muchas partes del mundo se pierden miles de hectáreas de suelos agrícolas por la contaminación ocasionada por vertidos provenientes de la minería que, al no controlar el almacenamiento de los estériles, de las aguas contaminadas de sus explotaciones y del poco cuidado en el transporte de sus minerales inutilizan estos suelos fértiles. Por lo tanto, la minería se debe comprometer en realizar sus actividades cuidando a las personas y al medio ambiente, en coordinación con el sector agrícola.

Se han desarrollado diferentes enfoques internacionales con el fin de definir pautas y metodologías para evaluar la contaminación por metales en los suelos. Sin embargo, existe una falta de consenso sobre la protección del suelo entre los países (Romero-Freire, 2016c). Los niveles genéricos de referencia (NGR) para declarar un suelo como contaminado no están establecidos en la legislación de muchos países e incluso estos valores pueden llegar a ser muy diferentes entre las Comunidades Autónomas españolas.

Por lo tanto, es necesaria la evaluación de los suelos potencialmente contaminados en los que se superan los NGR para determinar el grado de toxicidad, lo que permitirá, bajo criterios científicos objetivos, su declaración como contaminados y la planificación de estrategias de recuperación de los mismos.

El objetivo principal de esta tesis fue evaluar la variación de la disponibilidad y de la toxicidad de EPCs en suelos del CVG, que se vieron afectados por el vertido de lodos piríticos de la balsa de estériles de la mina de Aznalcóllar en 1998, y que, tras las medidas de recuperación acometidas en la zona, hoy tiene la denominación de Paisaje Protegido y una dedicación de uso recreativo.

6.1 Evolución de las propiedades de los suelos

El accidente minero de Aznalcóllar ha sido uno de los accidentes mineros asociados a la minería metálica más importantes a nivel mundial (Nikolic *et al.*, 2011). La rotura de la balsa de lodos de la mina vertió a la cuenca del río Guadiamar $36 \times 10^5 \text{ m}^3$ de lodos piríticos y $9 \times 10^5 \text{ m}^3$ de aguas ácidas (Simón *et al.*, 2001), contaminando los suelos agrícolas de la zona con altas concentraciones de As, Cd, Cu, Sb, Pb, Tl (Simón *et al.*, 1999). Pese a las tareas de remediación llevadas a cabo por el Gobierno Regional de Andalucía entre los años 1998 y 2001, aún persisten suelos en los que se superan los NGR establecidos para Andalucía para el Pb y As (Pastor-Jáuregui *et al.*, 2020). El grado de contaminación de los suelos está condicionado por la heterogeneidad y cantidad de los lodos y aguas ácidas que recibieron en función de la proximidad a la mina y de la topografía de la zona, así como por las propiedades de los suelos.

De acuerdo con las propiedades principales de los suelos, antes del vertido, el área afectada se dividió en dos sectores (Aguilar *et al.*, 2004a). El sector 1, situado en el primer tercio (primeros 15 km aguas abajo de la mina), con suelos moderadamente ácidos, de texturas franca y franco-arenosa, contenido bajo de CaCO_3 , donde se aplicaron los tratamientos T1 y T2. El sector 2, situado en los últimos 30 km de la zona afectada, en la que se aplicaron los tratamientos T3 y T4 a suelos neutros o ligeramente básicos, con textura más arcillosa y alto contenido de CaCO_3 .

La combinación de enmiendas y dosis aplicadas se agrupan en cuatro tratamientos: T1: enmienda orgánica, rica en óxidos de hierro y se aplicaron más de 20 t ha^{-1} de enmienda rica en carbonatos; T2: enmienda orgánica y más de 20 t ha^{-1} de, pero no se aplicó enmienda rica en óxidos de hierro; T3: enmienda orgánica, rica en óxidos de hierro y 20 t ha^{-1} de enmienda rica en carbonatos y T4: enmienda orgánica y se aplicaron 20 t ha^{-1} de enmienda rica en carbonatos, pero ninguna enmienda rica en óxidos de hierro.

El impacto inicial del vertido produjo una acidificación y un aumento de la CE en los 10 cm superficiales debido a la oxidación de los sulfuros, lo que generó la solubilización del Pb, As, Zn y Cu, considerados los principales contaminantes en estos suelos, debido al accidente (Martín *et al.*, 2008).

Veinte años después del accidente y tras la implementación de medidas de recuperación y biorremediación en toda el área del CVG, el pH de los suelos aumentó debido a los tratamientos de encalado, pero a expensas de la disolución del carbonato, aumentando también significativamente el CO en la superficie, debido al éxito de la fitoestabilización de la zona. La reducción de la CE en profundidad a lo largo del tiempo ha sido significativa, lo que indica una recuperación de estos suelos, asociado a un menor grado de contaminación, a la vez que da lugar a unas condiciones más favorables para el desarrollo de la vegetación y de los microorganismos del suelo.

No hay grandes variaciones en el contenido de CaCO_3 entre los suelos con los diferentes tratamientos aplicados ni considerando su evolución en el tiempo. En los tratamientos T1 y T2 se aplicaron mayores dosis de material carbonatado en relación a los tratamientos T3 y T4, pero en el caso de los primeros, los suelos sobre los que se aplicaron presentaron un menor contenido inicial de carbonatos y un mayor grado de contaminación, lo que provocó una disolución parcial de CaCO_3 que amortiguó el pH del suelo. En el caso de los tratamientos T3 y T4, tampoco existen diferencias significativas en el contenido de carbonato del suelo a lo largo del tiempo, ya que el encalado se realizó en dosis menores y solo durante el primer año, debido a que estos suelos originalmente eran carbonatados y tenían menor contaminación.

Todos los tratamientos aplicados fueron eficaces en la reducción de la elevada salinidad, siendo las diferencias significativas a los 6 años del accidente. Veinte años después del vertido los suelos en los que se aplicaron los tratamientos T1 y T2 tienen valores medios de CE más altos que en los otros dos tratamientos, lo que se relaciona con la contaminación residual aún existente en los primeros 15 km, al norte del corredor. La aplicación de enmiendas orgánicas fue generalizada en toda el área afectada por el vertido

y después de su aplicación el contenido de CO aumentó en los suelos, pero solo estadísticamente significativos en 2018. La implantación de la vegetación en la zona es la que da lugar a la mejora de este parámetro, poniendo de manifiesto la importancia de la fitoestabilización de los suelos, no solo desde el punto de vista del control de la contaminación, evitando la dispersión de los contaminantes por la escorrentía superficial, sino también por mejorar la fertilidad de los suelos (Pastor-Jáuregui *et al.*, 2020).

La aplicación de enmiendas con suelos rojos ricos en óxidos de Fe (T1 y T3) parece no tener un efecto significativo en la textura del suelo, aunque hay ligeros cambios hacia texturas más finas en los suelos donde se aplicó este tratamiento, en relación con los suelos tratados sin la adición de esta enmienda (T2 y T4).

En función de las propiedades de los suelos, en este trabajo se han considerado 4 tipos de suelos. Los suelos SS1 y SS2 se localizan en el tercio más septentrional del CVG y coinciden con los suelos del sector 1, de textura franca, no o ligeramente carbonatados, pH más bajo y mayor salinidad. Los suelos SS1 se diferencian de los SS2 sobre todo por una mayor acidez y salinidad. Los suelos SS3 y SS4 se intercalan a lo largo de los dos tercios más meridionales del CVG, representan suelos alcalinos, carbonatados con texturas más finas y coinciden geográficamente con los suelos del sector 2. Los suelos SS3 y SS4 presentan diferencias fundamentalmente relacionadas con la textura, que es más arcillosa en el caso de los suelos tipo SS4.

Pese a la evolución positiva del pH y de la salinidad de los suelos del CVG, todavía se han detectado suelos ácidos en los que la salinidad es elevada, que corresponden al tipo de suelo SS1, lo que indica la persistencia de contaminación residual en zonas puntuales del corredor, donde restos del lodo que escaparon a las tareas de limpieza realizadas en los primeros meses tras el accidente, continúan oxidándose (Simón *et al.*, 2008). El aumento de carbonatos es significativamente mayor en los SS3 y SS4, con respecto a SS1 y SS2, debido a que éstos últimos eran de naturaleza no o ligeramente carbonatados, a pesar de que con las medidas de encalado, las dosis de

carbonatos aplicados en esta zona fue mayor. El contenido en CO no presenta diferencia estadística entre los tipos de suelos considerados e incluso se alcanzan valores superiores a los existentes antes del accidente, lo que puede deberse a la abundante vegetación existente en la actualidad a lo largo del CVG, que aporta una mayor cantidad de materia orgánica al suelo en comparación con el uso agrícola anterior.

6.2 Concentración de EPCs en los suelos del CVG

La solubilidad y la biodisponibilidad de los EPCs dependen de las propiedades del suelo y están directamente relacionadas con el riesgo de toxicidad y de dispersión de los contaminantes dentro del suelo y hacia el resto del ecosistema.

6.2.1 Concentración total de EPCs

Veinte años después del accidente y completadas todas las medidas de remediación, la concentración de EPCs considerados en esta tesis (Pb, As, Zn y Cu) mostraron diferencias significativas en profundidad y/o entre sectores.

El Pb y el As, son elementos poco móviles en el suelo por lo que las concentraciones más altas de estos elementos aparecen en los primeros 30 cm analizados, disminuyendo significativamente a partir de esta profundidad, salvo en el caso del As en el sector 2. El As aumenta su solubilidad a pH neutro o ligeramente alcalino, lo que justifica la mayor concentración de este elemento de 10-30 cm, favoreciendo el lavado en ambos sectores, pero solo de manera significativa en el sector 2. En cambio el Cu, y sobre todo el Zn, son más móviles, por lo que su distribución a lo largo del perfil es más homogénea. Estos elementos han sufrido un lavado intenso que justifica su disminución en los suelos 20 años después del accidente, si bien pueden sufrir movimientos ascendentes debido a las elevadas tasas de evaporación que se registran en la zona en periodos estivales en los suelos menos carbonatados del sector 1 (Simón *et al.*, 2002; Martín *et al.*, 2007). Por el contrario, en el sector 2 donde los suelos son más alcalinos, Zn y Cu se acumulan en profundidad, ya que la movilidad de estos elementos se relaciona negativamente con el pH del suelo.

En función de los tratamientos de remediación aplicados en el corredor, T1 y T2 adicionaron grandes cantidades de carbonato a los suelos más próximos a la mina, ya que fueron los que recibieron una mayor concentración de EPCs y

además, se trataba de suelos no o muy ligeramente carbonatados, de pH ligeramente ácido y texturas más arenosas, por lo que su poder amortiguador inicial era limitado. Por lo tanto, la dinámica de los contaminantes en estos suelos estuvo influenciada por una alta movilidad en la matriz del suelo que, junto con la alta evapotranspiración de la zona, provocó la concentración de los contaminantes en los primeros centímetros de los suelos, que es donde el encalado fue más eficaz. Sin embargo, los suelos en los que se aplicaron los tratamientos T3 y T4, además de recibir una menor cantidad de lodo, tenían mejores propiedades (suelos carbonatados, ligeramente alcalinos y texturas más finas), lo que permitió que los contaminantes penetren en menor medida en estos suelos y, en los casos en que ingresaron en profundidad, la precipitación en la matriz del suelo impidió su ascenso capilar y su concentración en la superficie del suelo, favoreciendo el efecto diluyente de la contaminación.

Pese a la eficacia de las medidas de remediación aplicadas en la zona, que promovieron la inmovilización de EPCs, el restablecimiento de las funciones esenciales de los suelos y el crecimiento de la vegetación, veinte años después del accidente, todavía existen suelos potencialmente contaminados en el CVG según la legislación vigente en Andalucía. A partir de nuestros resultados, aproximadamente el 13% para Pb y 70% para As de los suelos del CVG superan, en los primeros 10 cm, los NGR para declarar suelos potencialmente contaminados en Andalucía.

6.2.2 Solubilidad y biodisponibilidad de EPCs

La concentración de los EPCs solubles en agua, se considera como la fracción con mayor riesgo de dispersión a corto plazo, mientras que la concentración de los EPCs extraíbles con EDTA, se considera como la fracción potencialmente biodisponible en el mediano-largo plazo (Quevauviller *et al.*, 1998).

Las formas solubles en agua y potencialmente biodisponibles presentan diferencias según el elemento considerado y el tratamiento aplicado. En el

caso del Pb, seis años después de la aplicación de los tratamientos, la solubilidad y la biodisponibilidad relativa disminuyen significativamente en todos los casos respecto a las concentraciones medidas en 1998. No obstante, veinte años después del accidente, los suelos donde se aplicaron los tratamientos T3 y T4 presentan concentraciones relativas de Pb soluble y biodisponible más altas que en los tratamientos T1 y T2. El aumento de movilidad observado en el Pb podría estar relacionado con el mayor desarrollo de la vegetación donde se aplicaron los tratamientos T3 y T4 y la afinidad de la materia orgánica para formar complejos orgánicos con Pb, que por encima de $\text{pH}=7$, el EDTA es capaz de solubilizarlo (Yotova *et al.*, 2018). Por otro lado, el mayor contenido en carbonatos de los suelos con los tratamientos T3 y T4 puede favorecer la formación de co-precipitados de Pb con hierro fácilmente extraíbles con EDTA (Simón *et al.*, 2005b).

La solubilidad relativa en agua del As, en los cuatro tratamientos considerados, disminuye de 1998 a 2004, mientras que vuelve a aumentar a los 20 años del accidente. En cuanto la fracción relativa extraíble con EDTA, al igual que ocurría con el Pb, los valores en T3 y T4 son significativamente mayores que los medidos en los otros dos. Para controlar la solubilidad del As, se adicionó suelos rojos ricos en hierro, dada la afinidad de este elemento por el hierro (García-Carmona *et al.*, 2019a). Esta medida resultó efectiva a corto plazo, observándose una disminución de la movilidad del As en 2004, pero que aumenta de nuevo en todos los suelos en 2018. La movilidad del As está condicionada no solo por su afinidad con los oxi-hidróxidos de hierro, sino que el pH juega un papel fundamental en ella, siendo de los pocos metaloides que presentan cierta solubilidad a pH 6.5-8.5 en condiciones oxidantes (Dzombak y Morel, 1987). Además, al aumentar el pH, junto con el paso del tiempo, puede dar lugar a una mayor cristalinidad de los compuestos de hierro que pueden liberar el As y solubilizarlo (Pedersen *et al.*, 2006). Por tanto, es importante controlar el pH en los suelos recuperados por este tipo de contaminación, para evitar problemas de toxicidad con el As a medio-largo plazo (Simón *et al.*, 2010).

La solubilidad y biodisponibilidad del Zn está condicionada por el pH y la presencia de carbonatos en el suelo, por lo que la medida de encalado aplicada en los suelos afectados por el vertido resultó ser muy efectiva a corto (2004) y largo plazo (2018). Las medidas de remediación fueron más efectivas para este elemento en el sector más alejado de la mina, aunque el encalado fue menos intenso, pero el carácter carbonatado original de los suelos en esta parte contribuyó de manera relevante en la reducción de la solubilidad del Zn. El incremento del contenido en materia orgánica de los suelos con el tiempo, debido a la fitoestabilización de la zona, puede haber contribuido también a la reducción de la movilidad de este elemento (Kumpiene *et al.*, 2008).

La movilidad del Cu está fuertemente relacionada con el pH, aumentando su solubilidad en suelos ácidos (García *et al.*, 2009), lo que justifica la mayor concentración relativa soluble en los suelos donde se aplicaron T1 y T2, que corresponde al sector inicialmente no carbonatado. En este sentido, Shaheen *et al.* (2009) indican que los suelos calcáreos pueden retener grandes cantidades de Cu debido a su gran capacidad de adsorción de este elemento.

En función de los resultados obtenidos en cuanto a la solubilidad y biodisponibilidad de los EPCs en el CVG dos décadas después del accidente, puede considerarse un éxito las medidas de remediación y fitoestabilización llevadas a cabo en la zona. Se ha conseguido una reducción significativa de las fracciones potencialmente más peligrosas de los principales contaminantes, si bien es necesario seguir monitorizando la zona para garantizar su seguridad, sobre todo debido al riesgo de removilización del As en suelos actualmente considerados como recuperados, y al riesgo derivado de la solubilidad del Cu, y sobre todo del Zn, en los suelos más ácidos del sector 1 próximo a la mina.

6.3 Evaluación de la toxicidad en el CVG

Los bioensayos en suelos contaminados permiten estimar el riesgo ecotoxicológico, pero dependiendo del EPC presente en el suelo puede producir toxicidad en unos organismos y en otros no, por lo que es necesario usar distintos bioensayos para obtener resultados fiables en las evaluaciones de toxicidad. Además, cuando en los suelos contaminados existe una mezcla de EPCs, no es posible atribuir la toxicidad a uno u otro, pudiendo existir también sinergias y antagonismos entre ellos, lo que refuerza la necesidad de usar una batería de bioensayos que incluyan, además de distintos organismos, ensayos tanto en fase sólida como líquida.

Para la evaluación del riesgo ecotoxicológico de los suelos del CVG, estos se agruparon en los 4 tipos de suelos (SS1-SS4) descritos anteriormente, y se realizaron bioensayos en fase líquida con *Lactuca sativa* L. y en fase sólida mediante la determinación de la tasa de respiración heterotrófica, estableciendo el grado de estrés de los microorganismos del suelo a partir del coeficiente metabólico, que expresa la razón entre la tasa de respiración y la biomasa microbiana del suelo.

La tasa de germinación de las semillas de lechuga de los suelos SS1 es significativamente menor que la del resto de suelos, mientras que la elongación radicular es significativamente menor en los suelos SS1 y SS2, respecto a SS3 y SS4, que se localizan en los dos tercios más distantes a la mina y que no presentan toxicidad en este bioensayo. La elongación radicular de la semilla de lechuga se ha mostrado como un bioindicador de toxicidad más sensible que la tasa de germinación, lo que está de acuerdo con Bagur-González *et al.* (2011), ya que en muchos casos las semillas llegan a germinar, pero apenas elongan unos milímetros antes de secarse.

La respiración heterotrófica del suelo está relacionada con la fertilidad y la calidad del suelo, siendo esenciales por su papel en el ciclo de los nutrientes en el suelo y en los procesos de mineralización y síntesis de compuestos orgánicos (Niemeyer *et al.*, 2012). La disminución de la actividad microbiana

debida a la presencia de contaminantes en el suelo provoca una reducción de la cantidad de CO₂ producido, por lo que puede usarse como indicadora del stress de las comunidades microbianas (Azarbad *et al.*, 2013). Los datos de respiración heterotrófica basal medidos en el CVG no mostraron diferencias significativas entre los suelos considerados, aunque llama la atención que los suelos SS1, más contaminados, presentan una tasa de respiración media más alta que los otros tres. Existe una gran controversia sobre el uso de la tasa de respiración como indicador de la contaminación, hay autores que no encuentran correlación entre la tasa de respiración y la contaminación, mientras que otros reportan una correlación positiva entre la respiración y el grado de contaminación (Romero-Freire *et al.*, 2016b).

La biomasa microbiana es otro indicador biológico que puede aportar información sobre la calidad del suelo y su respuesta frente a la incorporación de elementos contaminantes o la aplicación de medidas de enmienda, debido a que los microorganismos responden más rápido a estos cambios que a las propiedades fisicoquímicas del suelo (Oijagbe *et al.*, 2019). Nuestros resultados muestran que no existen diferencias significativas de la biomasa microbiana entre los cuatro tipos de suelos, pese a que los valores medios de los suelos SS3 y SS4 son casi el doble que los de los suelos SS1 y SS2. Estos resultados concuerdan con los obtenidos a partir del bioensayo con lechuga, mostrando distinto grado de toxicidad en los suelos SS1 y SS2.

El cociente metabólico (qCO₂) es quizás el índice metabólico más usado para comparar el impacto que tienen los cambios estacionales, los sistemas de manejo, la adición de metales, agroquímicos y xenobióticos sobre los microorganismos del suelo (Paolini, 2018). Nos permite diagnosticar la eficiencia de la biomasa microbiana en la utilización del carbono del suelo en términos de gasto en respiración. De acuerdo con este índice, en SS1 los microorganismos estarían sujetos a un mayor estrés en comparación con los otros sectores, coincidiendo con unas características edáficas más limitantes en términos de salinidad y acidez, y de una mayor concentración de EPCs. Bajo condiciones desfavorables, los microorganismos requieren más energía para mantener la biomasa y por lo tanto aumenta el qCO₂ y el carbono se

pierde como CO₂ (Insam y Domsch, 1988), lo que permite justificar la mayor tasa de respiración y menor contenido en biomasa microbiana en los suelos SS1, donde el qCO₂ es significativamente más alto. Esta circunstancia puede ser indicativa de un cambio en la estructura y diversidad de las poblaciones microbianas en suelos contaminados respecto a los suelos naturales (Paniagua-López *et al.*, 2021), ya que los microorganismos son capaces de desarrollar resistencias y resiliencia frente a determinados elementos potencialmente tóxicos (Hänsch y Emmerling, 2010).

En los suelos SS1, la elongación radicular de la semilla de lechuga se correlaciona directamente con el pH, los carbonatos y la tasa de respiración, mientras que lo hace de manera inversa con la salinidad y la concentración soluble de Zn y Cu, mientras que qCO₂ solo correlaciona significativamente con la concentración de As. Los suelos SS1 son los que presentan mayor toxicidad atendiendo a la elongación radicular y al qCO₂ y coinciden con los suelos más ácidos y con mayor salinidad, parámetros que en la zona de estudio se han relacionado con el grado de contaminación de los suelos. En los suelos del tipo SS2, se mantienen los signos de las correlaciones indicadas para SS1, pero no llegan a tener significación estadística debido a su menor toxicidad.

El bioensayo de la elongación radicular, en comparación con el coeficiente metabólico, se ha mostrado más sensible a la contaminación, posiblemente debido a la limitación que representa la respiración basal como indicadora de la toxicidad del suelo. Debido a la alta sensibilidad del bioensayo de lechuga hace que sea de elección para la evaluación de riesgos ecotoxicológicos (García-Carmona *et al.*, 2019b).

A pesar de las acciones de recuperación de la zona, aproximadamente el 7% de la superficie afectada por el vertido continúa contaminada, distribuida aleatoriamente en manchas heterométricas fácilmente identificables por la ausencia de vegetación, donde los suelos son ácidos, con elevada salinidad y alta concentración total y biodisponible de EPCs (Martín *et al.*, 2015). Estas condiciones edáficas son fruto de la continua oxidación de restos de lodo tóxico que escaparon a las tareas de limpieza y recuperación (Simón *et al.*,

2008) y que dan lugar a elevadas concentraciones de elementos como el Pb y el As, superiores a los NGR establecidos en Andalucía.

Los bioensayos de respiración heterotrófica basal y elongación radicular realizados en las cuatro manchas sin vegetación seleccionadas en esta tesis confirmaron una respuesta tóxica, reduciéndose la respuesta de la semilla de lechuga y la tasa de respiración 9 y 5 veces, respectivamente, respecto a los suelos no contaminados adyacentes que no se vieron afectados por el vertido y que se usan como control. La tasa de respiración heterotrófica basal y la reducción de la elongación radicular de la semilla de lechuga medidas en suelos de las manchas son consistentes con los existentes en la bibliografía (Paniagua-López *et al.*, 2021) y evidencian el riesgo de toxicidad para el ecosistema de estas áreas.

La evaluación del riesgo ecotoxicológico de las manchas sin vegetación se finalizó con un tercer bioensayo de toxicidad con lombrices (*E. andrei*) con objeto de incluir también una especie de invertebrado que complete la evaluación del riesgo de toxicidad para el ecosistema. La tasa de mortalidad medida en los suelos contaminados y no contaminados no resultó ser un buen indicador de la toxicidad ya que las lombrices sobrevivieron tanto en los suelos contaminados de las manchas como en los suelos control no contaminados. Estos resultados están de acuerdo con Nahmani *et al.* (2007b) que indica la baja sensibilidad de este parámetro en bioensayos de toxicidad con lombrices en suelos degradados. En cambio, se observa que en los suelos contaminados disminuye el peso de las lombrices ligeramente (-13%), pero esta diferencia es considerable si comparamos con la ganancia de peso experimentada en los suelos no contaminados (+47%). No obstante, no podemos asegurar que este hecho sea debido exclusivamente a la concentración de EPCs del suelo contaminado, ya que condiciones extremas del suelo, como es el caso de los pH tan ácidos de los suelos contaminados pueden influir también en el desarrollo de la lombriz (Lorente-Casalini *et al.*, 2021).

La capacidad reproductora, expresada en el porcentaje de juveniles respecto a los contabilizados, en el suelo no contaminado ha resultado ser un buen indicador de la toxicidad, ya que los suelos contaminados presentan una reducción en la población de juveniles muy acusada. Este parámetro, en otros estudios, ha mostrado una gran sensibilidad en bioensayos con distintas especies de lombriz en suelos contaminados con As, Zn, Cu y Cd (García-Gómez *et al.*, 2014; Romero-Freire *et al.*, 2015a y 2017).

6.4 Análisis de riesgos para la salud humana

Los suelos contaminados con EPCs pueden representar un riesgo para la salud humana por ingestión directa de suelos, inhalación de partículas de polvo o contacto dérmico, especialmente en zonas residenciales o parques.

Los suelos del CVG están destinados en la actualidad a uso recreativo, siendo una zona de disfrute para pasear o hacer deporte en la naturaleza para adultos y niños. No obstante, existen zonas del corredor donde se sobrepasan los NGR establecidos por el Gobierno Regional de Andalucía para EPCs, por lo que una evaluación de los riesgos para la salud humana es imprescindible para garantizar la seguridad del uso recreativo del corredor.

Tanto el Pb como el As son considerados elementos que pueden suponer un riesgo para la salud humana cuando su concentración y biodisponibilidad es elevada en suelos, sobre todo en el caso de exposiciones prolongadas en el tiempo ya que pueden desencadenar numerosas enfermedades. Estos elementos pueden ser transferidos al agua, al suelo y a las plantas y llegar al hombre a través de la cadena trófica o por ingestión directa, contacto dérmico y/o inhalación de partículas de suelos contaminados, representando una amenaza para la salud.

Para determinar el riesgo de la exposición humana a la toxicidad en el CVG se han determinado los coeficientes de peligro de Pb y As de acuerdo con la normativa de USEPA. A pesar de que se superan los NGR para el Pb y el As en los suelos de las manchas, el coeficiente de peligro para ambos elementos es menor de 1, considerando las tres posibles vías de exposición (ingestión, inhalación y contacto dérmico) y dos posibles individuos (niño y adulto), con una frecuencia de exposición de 75 días, de acuerdo con las recomendaciones de la USEPA.

Pese a estos resultados que estiman la no existencia del riesgo para la salud humana, no hay que obviar los riesgos de toxicidad que existen para el ecosistema, representados por las elevadas concentraciones de Pb y As total y

de Zn y Cu soluble. Estos hechos hacen que, sobre todo las zonas no estabilizadas por la vegetación, puedan suponer un riesgo ecotoxicológico para el ecosistema, además de un foco de dispersión de contaminantes asociado a los procesos de erosión y lixiviado.

Por tanto, realizar seguimientos periódicos de los suelos del corredor, como el realizado en esta tesis, además de establecer e implementar un plan de recuperación de las zonas más contaminadas y no fitoestabilizadas sería aconsejable para garantizar el uso seguro del Corredor Verde del río Guadiamar.

CAPÍTULO 7

Conclusiones

En el estudio de la evolución en el tiempo de los suelos afectados por el vertido de aguas ácidas y lodos piríticos de la mina de Aznalcóllar, y tras el aumento de contaminación y acidificación generado por la oxidación de los lodos, se realizó una intensa recuperación de la zona afectada. Las labores de limpieza eliminaron el horizonte superficial de los suelos, lo que ocasionó la pérdida de sus propiedades físicas, químicas y biológicas. La recuperación de la zona se centró en la aplicación de enmiendas orgánicas e inorgánicas que permitieron la implantación de la vegetación y la creación del Paisaje Protegido del Corredor Verde del río Guadiamar en el año 2003. Esta tesis se ha centrado en evaluar el grado de contaminación potencial y de recuperación de los suelos afectados 20 años después del accidente, y hemos llegado a las siguientes conclusiones:

Conclusión 1

Dos décadas después del accidente, los suelos del Corredor Verde del río Guadiamar han mejorado gran parte de sus propiedades físicas, químicas y biológicas, permitiendo el desarrollo de una cubierta vegetal bien establecida en la mayoría de su superficie. En la actualidad, los suelos son neutros o ligeramente alcalinos, debido a la eficacia de las tareas de encalado aplicadas inicialmente, que ha dado lugar a un incremento en el contenido de carbonato cálcico en todos los suelos, aunque en los suelos que tenían carácter ligeramente ácido antes del accidente, se ha consumido buena parte del carbonato cálcico adicionado. Debido al éxito de las tareas de fitoestabilización, la revegetación de la zona ha sido casi completa, dando lugar a un incremento en el contenido en materia orgánica de los suelos a lo largo del CVG. Sin embargo, destaca la presencia puntual de manchas sin vegetación, de tamaño variable y distribuidas aleatoriamente a lo largo del primer tercio del área afectada (sector 1), en las que los suelos tienen un marcado carácter ácido y una elevada salinidad, por lo que se recomienda la aplicación de medidas de recuperación para mejorar las propiedades de estos suelos afectados por contaminación residual.

Conclusión 2

Las concentraciones totales de EPCs en el Corredor Verde del río Guadiamar son más altas que antes del vertido, siendo el Pb y el As los elementos que alcanzan una mayor concentración, especialmente en los suelos del sector 1. La baja movilidad de estos dos elementos hace que tiendan a concentrarse en los primeros 30 cm de profundidad. El Zn y el Cu, al ser elementos más móviles que los anteriores, se han distribuido en profundidad de manera diferente dependiendo del sector considerado; así, en el sector 1 tienden a concentrarse en superficie por ascenso capilar en condiciones de pH más ácido, mientras que en el sector 2 se han distribuido en profundidad. Las concentraciones totales medidas en los 10 cm superficiales 20 años después del vertido, sobrepasan los niveles genéricos de referencia para declarar suelos potencialmente contaminados en Andalucía en el 13% para Pb y 70% para As de los suelos afectados, por lo que se recomienda un seguimiento de la zona a medio-largo plazo.

Conclusión 3

En líneas generales, las labores de recuperación de la zona afectada fueron muy efectivas en el control de las fracciones solubles y biodisponibles de los elementos potencialmente contaminantes. No obstante, se ha observado un ligero incremento en las formas solubles de As en los suelos del sector 2, que puede estar relacionado con el aumento del pH y el incremento en la cristalinidad de los compuestos de hierro. Este hecho ha de ser monitorizado en el tiempo para evitar posibles riesgos de toxicidad y de dispersión de este contaminante.

Conclusión 4

Los bioensayos de toxicidad realizados en los suelos del Corredor Verde del río Guadiamar indican la existencia de un riesgo de toxicidad para el ecosistema, fundamentalmente en el sector 1 más próximo a la mina, y de manera más evidente en las manchas sin vegetación distribuidas aleatoriamente en esta zona. Sin embargo, la evaluación de riesgos para la salud humana realizada en las manchas de contaminación no indica riesgo pese a las concentraciones elevadas de elementos potencialmente tóxicos determinadas en ellas, debido al limitado tiempo de exposición por el uso recreativo al que está restringido el CVG.

Bibliografía

- Adriano, D.C.; Wenzel, W.W.; Vangronsveld, J.; Bolan, N.S. Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* **2004**, *122*, 121–142.
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.01.003>
- Agenda 2030. *Objetivos de desarrollo sostenibles*. Vicepresidencia segunda del Gobierno, Ministerio de Derechos Sociales y Agenda 2030, Gobierno de España.
<https://www.agenda2030.gob.es/objetivos/home.htm>
- Aguilar, J.; Dorronsoro, C.; Fernández, E.; Fernández, J.; García, I.; Martín, F.; Simón, M. Soil pollution by a pyrite mine spill in Spain: evolution in time. *Environmental Pollution* **2004a**, *132*, 395–401.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.05.028>
- Aguilar, J.; Bouza, P.; Dorronsoro, C.; Fernández, E.; Fernández, J.; García, I.; Martín, F.; Simón, M. Application of remediation techniques for immobilization of metals in soils contaminated by a pyrite tailing spill in Spain. *Soil Use and Management* **2004b**, *20*, 451–453.
<https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2004.tb00396.x>
- Aguilar, J.; Dorronsoro, C.; Fernández, E.; Fernández, J.; García, I.; Martín, F.; Sierra, M.; Simón, M. Remediation of As-Contaminated soils in the Guadiamar river basin (SW, Spain). *Water, Air and Soil Pollution* **2007**, *180*, 109–118.
<https://doi.org/10.1007/s11270-006-9254-3>
- Akmal, M. y Jianming, X. Microbial biomass and bacterial community changes by Pb contamination in acidic soil. *Journal of Agricultural and Biological Sciences* **2009**, *1*, 30–37.
http://www.uaar.edu.pk/jabs/files/jabs_1_1_4.pdf
- Alastuey, A.; García-Sánchez, A.; López, F.; Querol, X. Evolution of pyrite mud weathering and mobility of heavy metals in the Guadiamar valley after the Aznalcóllar spill, south-west Spain. *Science of The Total Environment* **1999**, *242*, 41–55.
[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00375-7](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00375-7)
- Alkorta, I.; Becerril, J.M.; Garbisu, C. Phytostabilization of metal contaminated soils. *Reviews on Environmental Health* **2010**, *25*, 135–146.
<https://doi.org/10.1515/reveh.2010.25.2.135>

Allison S.D. y Martiny, J.B.H. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 11512–11519.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0801925105>

Alomía, J.; Aponte, M.; Flores, J.; Huamán, P.; Huicho, L. *Minería en el Perú*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. 2017.

<https://www.monografias.com/docs114/sector-minero-peru-influencia-crecimiento/sector-minero-peru-influencia-crecimiento.shtml>.

Alonso, D. NDVI: *Qué es y cómo calcularlo con SAGA desde QGIS*. MappingGIS. Formación que impulsa tu perfil GIS. 2021.

<https://mappinggis.com/2015/06/ndvi-que-es-y-como-calcularlo-con-saga-desde-qgis/>

Álvarez, J.M.; López-Valdivia, L.M.; Novillo, J.; Obrador, A.; Rico, M.I. Comparison of EDTA and sequential extraction tests for phytoavailability prediction of manganese and zinc in agricultural alkaline soils. *Geoderma* **2006**, *132*, 450–463.

<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.06.009>

Álvarez-Ayuso, E.; García-Sánchez, A.; Querol, X.; Moyano, A. Trace element mobility in soils seven years after the Aznalcóllar mine spill. *Chemosphere* **2008**, *73*, 1240–1246.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.028>

Anderson, T.H. y Domsch, K.H. Application of eco-physiological quotients (qCO_2 and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil Biology and Biochemistry* **1990**, *22*, 251–255.

[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90094-G](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90094-G)

Anderson, T.H. y Domsch, K.H. The metabolic quotient for CO_2 (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* **1993**, *25*, 393–395.

[https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90140-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90140-7)

- Arenas, J.M.; Carrascal, F.; Gil, A.; Montes, C. *Breve historia de la construcción del Corredor Verde del Guadiamar*. En: La restauración ecológica del río Guadiamar y el proyecto del Corredor Verde. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, España. 2008; p. 29–64.
http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Patrimonio_Natural_Usos_Y_Gestion/Espacios_Protegidos/publicaciones_renpa/restauracion_ecologica_rio_guadiamar/02_breve_historia_de_la_construccion.pdf
- Azarbad, H.; Niklinska, M.; van Gestel, C.A.M.; van Straalen, N.M.; Röling, W.F.M.; Laskowski, R. Microbial community structure and functioning along metal pollution gradients. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2013**, *32*, 1992–2002.
<https://doi.org/10.1002/etc.2269>
- Aziz, A.A.; Lee, B.T.; Han, H.J.; Kim, K.W. Assessment of the stabilization of heavy metal contaminants in soils using chemical leaching and an earthworm bioassay. *Environmental Geochemistry Health* **2019**, *41*, 447–460.
<https://doi.org/10.1007/s10653-018-0173-1>
- Baderna, D.; Lomazzi, E.; Pogliaghi, A.; Ciaccia, G.; Lodi, M.; Benfenati, E. Acute phytotoxicity of seven metals alone and in mixture: are Italian soil threshold concentrations suitable for plant protection? *Environmental Research* **2015**, *140*, 102–111.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.03.023>
- Bagur-González, M.G.; Estepa-Molina, C.; Martín-Peinado, F.; Morales-Ruano, S. Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. *Journal of Soils and Sediments* **2011**, *11*, 281–289.
<https://doi.org/10.1007/s11368-010-0285-4>
- Barahona, E. *Determinaciones analíticas en suelos. Normalización de métodos. Determinación de carbonatos totales y caliza activa*. Grupo de trabajo de normalización de métodos analíticos. En: I Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Sociedad Española de la Ciencia del Suelo. Madrid, España. 1984; p. 53–67.
- Barceló, J. y Poschenrieder, C. Phytoremediation: principles and perspectives. *Contributions to Science* **2003**, *2*, 333–344.
<https://www.researchgate.net/publication/28076724>

- Bernard, O. y Oluranti, O. Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2017**, *14*, 1504.
<https://doi.org/10.3390/ijerph14121504>
- Bhattacharya, P.; Welch, A.H.; Stollenwerk, K.G.; McLaughlin, M.J.; Bundschuh, J.; Panaullah, G. Arsenic in the environment: Biology and Chemistry. *Science of The Total Environment* **2007**, *379*, 109–120.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.02.037>
- Bi, X.; Feng, X.; Yang, Y.; Qiu, G.; Li, G.; Li, F.; Liu, T.; Fu, Z.; Jin, Z. Environmental contamination of heavy metals from zinc smelting areas in Hezhang County, western Guizhou, China. *Environment International* **2006**, *32*, 883–890.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.010>
- Bigham, J.M. y Nordstrom, D.K. Iron and aluminum hydroxysulfates from acid sulfate waters. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **2000**, *40*, 351–403.
<https://doi.org/10.2138/rmg.2000.40.7>
- BOE (Boletín Oficial del Estado). *Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados*. A-2011-13046. 2011.
<https://www.boe.es/eli/es/l/2011/07/28/22/con>
- BOJA (Boletín Oficial de la Junta de Andalucía). *Decreto 18/2015, de 27 de enero, por el que se aprueba el reglamento que regula el régimen aplicable a los suelos contaminados*. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Junta de Andalucía. España. 2015; p. 28–64.
<https://www.juntadeandalucia.es/boja/2015/38/3>
- Borja, F.; Barral, M.Á.; Borja, C.; Román, J.M. *Caracterización Hidro-Geomorfológica e impacto antrópico en la llanura aluvial y la marisma del Guadiamar (1956-2006). Determinación de sectores de diagnóstico y gestión*. En: La restauración ecológica del río Guadiamar y el proyecto del Corredor Verde. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, España. 2008; p. 101–120.
http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Patrimonio_Natural_Uso_Y_Gestion/Espacios_Protegidos/publicaciones_renpa/restauracion_ecologica_rio_guadiamar/05_caracterizacion.pdf

- Bradl, H.B. *Sources and Origins of Heavy Metals*. En: Heavy metals in the environment: origin, interaction and remediation. Bradl, H.B. (ed). Birkenfeld, Germany. 2005; p. 1–27.
[https://doi.org/10.1016/S1573-4285\(05\)80020-1](https://doi.org/10.1016/S1573-4285(05)80020-1)
- Brattin, W; Drexler, J; Lowney, Y; Griffin, S; Diamond, G; Woodbury, L. An *in vitro* method for estimation of arsenic relative bioavailability in soil. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **2013**, 76, 458–478.
<https://doi.org/10.1080/15287394.2013.771765>
- Burgos, P.; Madejón, P.; Madejón, E.; Girón, I.; Cabrera, F.; Murillo, J.M. Natural remediation of an unremediated soil twelve years after a mine accident: trace element mobility and plant composition. *Journal of Environmental Management* **2013**, 114, 36–45.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.10.060>
- Cabrera, F.; Clemente, L.; Díaz Barrientos, E.; López, R.; Murillo, J.M. Heavy metal pollution of soils affected by the Guadiamar toxic flood. *Science of The Total Environment* **1999**, 242, 117–129.
[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00379-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00379-4)
- Cabrera, F. La contaminación por metales pesados en el Valle del Guadiamar tras el vertido de Aznalcóllar. *Revista técnica de medio ambiente* **2000**, 13, 37–48.
<http://hdl.handle.net/10261/89349>
- CAGPDS (Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible). *Enmiendas realizadas en los suelos contaminados del río Guadiamar a escala 1:10.000, año 2002*. Junta de Andalucía, España. 2002.
<http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb/menuitem.7e1cf46ddf59bb227a9ebe205510e1ca/?vgnnextoid=23287134ad2ac210VgnVCM2000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=5294b924931f4310VgnVCM2000000624e50aRCRD&rating=1#apartadoa2287134ad2ac210VgnVCM2000000624e50a>
- Carrascal, F.; Arenas, J.M.; Ramos, M.; Montes, C. *Evolución de los principales indicadores de calidad ambiental en el Corredor Verde del Guadiamar*. En: La restauración ecológica del río Guadiamar y el proyecto del Corredor Verde. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, España. 2008; p. 451–486.
http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/web/Bloques_Tematicos/Patrimonio_Natural_Usos_Y_Gestion/Espacios_Protegidos/publicaciones_renpa/restauracion_ecologica_rio_guadiamar/27_indicadores_de_calidad.pdf

Clemente, R.; Walker, D.J.; Bernal, M.P. Uptake of heavy metals and As by *Brassica juncea* grown in a contaminated soil in Aznalcóllar (Spain): The effect of soil amendments. *Environmental Pollution* **2005**, *138*, 46–58.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.02.019>

Clemente, R.; Dickinson, N.M.; Lepp, N.W. Mobility of metals and metalloids in a multi-element contaminated soil 20 years after cessation of the pollution source activity. *Environmental Pollution* **2008**, *155*, 254–261.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.11.024>

CMA (Consejería de Medio Ambiente). *Los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado en Andalucía y la metodología y técnicas de toma de muestra y análisis para su investigación*. Junta de Andalucía, España. 1999.

<http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb/menuitem.7e1cf46ddf59bb227a9ebe205510e1ca?vgnextoid=47dbbb45c8bab010VgnVCM1000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=2896a7aaaf4f4310VgnVCM2000000624e50aRCRD>

CMA (Consejería de Medio Ambiente). *Ciencia y restauración del río Guadiamar. PICOVER 1998-2002*. Junta de Andalucía, España. 2003; p. 578.

<http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb/menuitem.7e1cf46ddf59bb227a9ebe205510e1ca/?vgnextoid=b7caa28c4b4bc310VgnVCM2000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=5294b924931f4310VgnVCM2000000624e50aRCRD&vgnnextfmt=portalwebTipoInfo>

Cordero, S. Los neo-indios. Una religión del tercer milenio. *Ecuador Debate* **2017**, *100*, 217–220.

<http://hdl.handle.net/10469/13579>

Dai, J.; Becquer, T.; Rouiller, J.H.; Reversat, G.; Bernhard-Reversat, F.; Lavelle, P. Influence of heavy metals on C and N mineralisation and microbial biomass in Zn-, Pb-, Cu-, and Cd- contaminated soils. *Applied Soil Ecology* **2004**, *25*, 99–109.

<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2003.09.003>

- De Haro, A.; Pujadas, A.; Polonio, A.; Font, R.; Vélez, D.; Montoro, R.; Del Río, M. Phytoremediation of the polluted soils after the toxic spill of the Aznalcóllar mine by using wild species collected in situ. *Fresenius Environmental Bulletin* **2000**, *9*, 275–280.
https://www.researchgate.net/publication/257815541_Phytoremediation_of_the_polluted_soils_after_the_toxic_spill_of_the_Aznalcollar_mine_by_using_wild_species_collected_in_situ
- De la Fuente, C.; Pardo, T.; Albuquerque, J.A.; Martínez-Alcalá, I.; Bernal, M.P.; Clemente, R. Assessment of native shrubs for stabilisation of a trace elements-polluted soil as the final phase of a restoration process. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **2014**, *196*, 103–111.
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.06.030>
- Del Pozo, C. y Paucarmayta, V. *¿Cómo impacta la minería en la producción agropecuaria del Perú?* Consorcio de Investigación Económica y Social (CIES). 2015.
http://www.cies.org.pe/sites/default/files/files/articulos/economiaysociedad/01-del_pozo_ok.pdf
- Del Río, M.; Font, R.; Almela, C.; Vélez, D.; Montoro, R.; De Haro, A. Heavy metals and arsenic uptake by wild vegetation in the Guadiamar river area after the toxic spill of the Aznalcóllar mine. *Journal of Biotechnology* **2002**, *98*, 125–137.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00091-3)
- Dinesh, R.; Anandaraj, M.; Srinivasan, V.; Hamza, S. Engineered nanoparticles in the soil and their potential implications to microbial activity. *Geoderma* **2012**, *173–174*, 19–27.
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.12.018>
- Domínguez, M.T.; Marañón, T.; Murillo, J.M.; Schulin, R.; Robinson, B.H. Trace element accumulation in woody plants of the Guadiamar Valley, SW Spain: A large-scale phytomanagement case study. *Environmental Pollution* **2008**, *152*, 50–59.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.05.021>
- Domínguez, M.T.; Madejón, P.; Marañón, T.; Murillo, J.M. Afforestation of a trace-element polluted area in SW Spain: woody plant performance and trace element accumulation. *European Journal of Forest Research* **2010**, *129*, 47–59.
<https://doi.org/10.1007/s10342-008-0253-3>

- Domínguez, M.T.; Pérez-Ramos, I.M.; Murillo, J.M.; Marañón, T. Facilitating the afforestation of Mediterranean polluted soils by nurse shrubs. *Journal of Environmental Management* **2015**, *161*, 276–286.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.07.009>
- Doran, J.W. y Zeiss, M.R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology* **2000**, *15*, 3–11.
[https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(00\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(00)00067-6)
- Dorransoro, C.; Martín, F.; Ortiz, I.; García, I.; Simón, M.; Fernández, E.; Aguilar, J.; Fernández, J. Migration of trace elements from pyrite tailing in carbonate soils. *Journal of Environmental Quality* **2002**, *31*, 829–835.
<https://doi.org/10.2134/jeq2002.8290>
- Dzombak, D.A. y Morel, F.M.M. Development of a data base for modelling adsorption of inorganics on iron and aluminum oxides. *Environmental Progress* **1987**, *6*, 133–137.
<https://doi.org/10.1002/ep.670060216>
- EEC (European Economic Community). Directive 79/831/EEC Annex V part C. *Method for the determination of ecotoxicity. Level 1. Earthworms: artificial soil test*. Commission of the European Communities. Bruselas. 1984.
<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/35217041.pdf>
- El Khalil, H.; El Hamiani, O.; Bitton, G.; Ouazzani, N.; Boularbah, A. Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: Monitoring metal content and toxicity of soil runoff and groundwater. *Environmental Monitoring and Assessment* **2008**, *136*, 147–160.
<https://doi.org/10.1007/s10661-007-9671-9>
- Escoto, M.; Fernández, J.; Martín, F. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.) *Science of The Total Environment* **2007**, *378*, 63–66.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.01.007>
- Fajana H.O.; Jegede O.O.; James K.; Hogan N.S.; Siciliano S.D. Uptake, toxicity, and maternal transfer of cadmium in the oribatid soil mite, *Oppia nitens*: implication in the risk assessment of cadmium to soil invertebrates. *Environmental Pollution* **2020**, *259*, 113912.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.113912>

- Farré, M. y Barceló, D. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2003**, *22*, 299–310.
[https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00504-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00504-1)
- Favas, P.J.; Pratas, J.; Gomes, M.E.P.; Cala, V. Selective chemical extraction of heavy metals in tailings and soils contaminated by mining activity: environmental implications. *Journal of Geochemical Exploration* **2011**, *111*, 160–171.
<https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2011.04.009>
- Ferguson, C.; Darmendrail, D.; Freier, K.; Jensen, B.K.; Jensen, J.; Kasamas, H.; Urzelai, A.; Vegter, J. (editors). *Risk assessment for contaminated sites in Europe*. Volume 1. Scientific Basis. LQM Press. Nottingham, UK. 1998; p. 165.
http://ctntes.arpa.piemonte.it/Bonifiche/Documenti/Altridocumenti/CARACAS_RiskAssessment.pdf
- Fernández, M.D.; Vega, M.M.; Tarazona, J.V. Risk-based ecological soil quality criteria for the characterization of contaminated soils. Combination of chemical and biological tools. *Science of The Total Environment* **2006**, *366*, 466–484.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2006.01.013>
- Ferreira, A.S.; Camargo, F.A.O.; Vidor, C. Utilização de microondas na avaliação da biomassa microbiana do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **1999**, *23*, 991–996.
<https://doi.org/10.1590/S0100-06831999000400026>
- Galán, E.; González, I.; Fernández-Caliani, J.C. Residual pollution load of soils impacted by the Aznalcóllar (Spain) mining spill after clean-up operations. *Science of The Total Environment* **2002**, *286*, 167–179.
[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00974-3](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00974-3)
- García, I.; Diez, M.; Martín, F.; Simón, M.; Dorronsoro, C. Mobility of arsenic and heavy metals in a sandy-loam textured and carbonated soil. *Pedosphere* **2009**, *19*, 166–175.
[https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(09\)60106-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(09)60106-5)

García-Carmona, M.; Romero-Freire, A; Sierra, M; Martínez, F.J.; Martín, F.J. Evaluation of remediation techniques in soils affected by residual contamination with heavy metals and arsenic. *Journal of Environmental Management* **2017**, *191*, 228–236.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.12.041>

García-Carmona, M.; García-Robles, H.; Turpín, C.; Fernández, E.; Lorite, J.; Sierra, M.; Martín, F.J. Residual pollution and vegetation distribution in amended soils 20 years after a pyrite mine tailings spill (Aznalcóllar, Spain). *Science of The Total Environment* **2019a**, *650*, 933–940.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.092>

García-Carmona, M.; Romero-Freire, A; Sierra, M; Martín, F.J. Effectiveness of ecotoxicological tests in relation to physicochemical properties of Zn and Cu polluted Mediterranean soils. *Geoderma* **2019b**, *338*, 259–268.

<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.12.016>

García-Gómez, C.; Esteban, E.; Sánchez-Pardo, B.; Fernández, M.D. Assessing the ecotoxicological effects of long-term contaminated mine soils on plants and earthworms: relevance of soil (total and available) and body concentrations. *Ecotoxicology* **2014**, *23*, 1195–1209.

<https://doi.org/10.1007/s10646-014-1262-2>

García-Zamarreño, A.; Maté, G.; Guzmán, J.; López, R.; Piedra, C.; García, M. *APPSOIL: Una herramienta informática para la dosificación de espuma de azucarera como enmienda de suelos*. VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas. Madrid. 2013.

<https://docplayer.es/89498764-Appsoil-una-herramienta-informatica-para-la-dosificacion-de-espuma-de-azucarera-como-enmienda-de-suelos.html>

González V.; Díez-Ortiz M.; Simón M.; van Gestel C.A.M. Application of bioassays with *Enchytraeus crypticus* and *Folsomia candida* to evaluate the toxicity of a metal-contaminated soil, before and after remediation. *Journal of Soils and Sediments* **2011**, *11*, 1199–1208.

<https://doi.org/10.1007/s11368-011-0391-y>

- González-Pedraza, A.F.; Atencio, J.; Cubillán, K; Almendrales, R.; Ramírez, L.; Barrios, O. Actividad microbiana en suelos cultivados con plátano (*Musa AAB* subgrupo plátano cv. Hartón) con diferente vigor de plantas. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)* **2014**, *1*, 526–538.
https://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/suplemento_2014/ing/ingsup112014526538.pdf
- Grimalt, J.O.; Ferrer, M.; Macpherson, E. The mine tailing accident in Aznalcollar. *Science of The Total Environment* **1999**, *242*, 3–11.
[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00372-1](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00372-1)
- Hänsch, M. y Emmerling, C. Effects of silver nanoparticles on the microbiota and enzyme activity in soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **2010**, *173*, 554–558.
<https://doi.org/10.1002/jpln.200900358>
- He, Z.; Shentu, J.; Yang, X.; Baligar, V.C.; Zhang, T.; Stoffella, P.J. Heavy metal contamination of soils: Sources, indicators, and assessment. *Journal of Environmental Indicators* **2015**, *9*, 17–18.
<https://core.ac.uk/download/pdf/72790535.pdf>
- Hobbelen, P.H.F.; Koolhaas, J.E.; van Gestel, C.A.M. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. *Environmental Pollution* **2006**, *144*, 639–646.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.01.019>
- Holmgren, G.G.S. A rapid citrate-dithionite extractable iron procedure. *Soil Science Society of America Journal* **1967**, *31*, 210–211.
<https://doi.org/10.2136/sssaj1967.03615995003100020020x>
- Hong, Y.K.; Yoon, D.H.; Kim, J.W.; Chae, M.J.; Ko, B.K.; Kim, S.C. Ecological risk assessment of heavy metal-contaminated soil using the triad approach. *Journal of Soils and Sediments* **2021**, *21*, 2732–2743.
<https://doi.org/10.1007/s11368-020-02750-9>
- Insam, H. y Domsch, K.H. Relationship between soil organic carbon and microbial biomass on chronosequences of reclamation sites. *Microbial Ecology* **1988**, *15*, 177–188.
<https://doi.org/10.1007/BF02011711>

Islam, Md.S.; Ahmed, Md.K.; Al-Mamun, Md.H. Human exposure of hazardous elements from different urban soils in Bangladesh. *Advances in Environmental Research* **2016**, *5*, 79–94.

<https://doi.org/10.12989/aer.2016.5.2.079>

ISO. *Soil quality. Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour. Part 1: test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)*. International Organization for Standardization. 17512-1. 2008; p. 25.

<https://www.iso.org/standard/38402.html>

ISO. *Soil quality. Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves*. International Organization for Standardization. 17155. 2012; p. 13.

<https://www.iso.org/standard/53529.html>

IUSS (International Union of Soil Sciences). *International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps*. Working Group WRB. World Reference Base for Soil Resources. World Soil Resources Reports N° 106. FAO, Italy. 2015; p. 192.

<http://www.fao.org/publications/card/es/c/942e424c-85a9-411d-a739-22d5f8b6cc41>

Jiménez, R. *Introducción a la contaminación de suelos*. Ediciones Mundi-Prensa. España. 2017.

Kabata-Pendias, A. *Trace elements in soils and plants* (3^a ed.). CRC Press. 2000.

<https://doi.org/10.1201/9781420039900>

Khalid, S.; Shahid, M.; Niazi, N.K.; Murtaza, B.; Bibi, I.; Dumat, C. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Geochemical Exploration* **2017**, *182*, 247–268.

<https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2016.11.021>

Kılıç, G.A. Histopathological and biochemical alterations of the earthworm (*Lumbricus Terrestris*) as biomarker of soil pollution along Porsuk River Basin (Turkey). *Chemosphere* **2011**, *83*, 1175–1180.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.091>

- Kim, R.Y.; Yoon, J.K.; Kim, T.S.; Yang, J.E.; Owens, G.; Kim, K.R. Bioavailability of heavy metals in soils: definitions and practical implementation— a critical review. *Environmental Geochemistry and Health* **2015**, *37*, 1041–1061.
<https://doi.org/10.1007/s10653-015-9695-y>
- Klitzke, S. y Lang, F. Mobilization of soluble and dispersible lead, arsenic, and antimony in a polluted, organic-rich soil. Effects of pH increase and counterion valency. *Journal of Environmental Quality* **2009**, *38*, 933–939.
<https://doi.org/10.2134/jeq2008.0239>
- Kraus, U. y Wiegand, J. Long-term effects of the Aznalcóllar mine spill—heavy metal content and mobility in soils and sediments of the Guadiamar river valley (SW Spain). *Science of The Total Environment* **2006**, *367*, 855–871.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.12.027>
- Kumpiene, J.; Lagerkvist, A.; Maurice, C. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments – a review. *Waste Management* **2008**, *28*, 215–225.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.12.012>
- Lacey, D.T. y Lawson, F. Kinetics of the liquid-phase oxidation of acid ferrous sulfate by the bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnology and Bioengineering* **1970**, *12*, 29–50.
<https://doi.org/10.1002/bit.260120104>
- Laidlaw, M.A.S. y Filippelli, G.M. Resuspension of urban soils as a persistent source of lead poisoning in children: a review and new directions. *Applied Geochemistry* **2008**, *23*, 2021–2039.
<https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2008.05.009>
- Lal, R. Soil health and carbon management. *Food and Energy Security* **2016**, *5*, 212–222.
<https://doi.org/10.1002/fes3.96>
- Lal, R. *Soil management and sustainable development goals*. IICA, Sao Paulo. 2020.
<https://www.youtube.com/watch?v=4UQxTRp8wLE>
- Lanno, R.; Wells, J.; Conder, J.; Bradham, K.; Basta, N. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2004**, *57*, 39–47.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.08.014>

- LarrainVial. *Minería en el Perú. Realidad y Perspectivas*. Sociedad Agente de Bolsa S.A. Empresa Editora El Comercio S.A. 2012.
https://www.larrainvial.com/comunicados/SitioPublico/multimedia/documentos/Mineria_en_el_Peru.pdf
- Leistel, J.M.; Marcoux, E.; Thiéblemont, D.; Quesada, C.; Sánchez, A.; Almodóvar, G.R.; Pascual, E.; Sáez, R. The volcanic-hosted massive sulphide deposits of the Iberian Pyrite Belt. Review and preface to the Thematic Issue. *Mineralium Deposita* **1998**, *33*, 2–30.
<https://doi.org/10.1007/S001260050130>
- Leveque, T.; Capowiez, Y.; Schreck, E.; Mazzia, C.; Auffan, M.; Foucault, Y.; Austruy, A.; Dumat, C. Assessing ecotoxicity and uptake of metals and metalloids in relation to two different earthworm species (*Eiseina hortensis* and *Lumbricus terrestris*). *Environmental Pollution* **2013**, *179*, 232–241.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.066>
- Li, L.Z.; Zhou, D.M.; Wang, P.; Luo, X.S. Subcellular distribution of Cd and Pb in earthworm *Eisenia fetida* as affected by Ca²⁺ ions and Cd-Pb interaction. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2008**, *71*, 632–637.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.04.001>
- Liu, B.; Ai, S.; Zhang, W.; Huang, D.; Zhang, Y. Assessment of the bioavailability, bioaccessibility and transfer of heavy metals in the soil-grain-human systems near a mining and smelting area in NW China. *Science of The Total Environment* **2017**, *609*, 822–829.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.215>
- Liu, L.; Ouyang, W.; Wang, Y.; Tysklind, M.; Hao, F.; Liu, H.; Hao, X.; Xu, Y.; Lin, C.; Su, L. Heavy metal accumulation, geochemical fractions, and loadings in two agricultural watersheds with distinct climate conditions. *Journal of Hazardous Materials* **2020**, *389*, 122–125.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122125>
- Ljung, K.; Oomen, A.; Duits, M.; Selinus, O.; Berglund, M. Bioaccessibility of metals in urban playground soils. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* **2007**, *42*, 1241–1250.
<https://doi.org/10.1080/10934520701435684>

- López-García, A.; Gil-Martínez, M.; Navarro-Fernández, C.M.; Kjøller, R.; Azcón-Aguilar, C.; Domínguez, M.T.; Marañón, T. Functional diversity of ectomycorrhizal fungal communities is reduced by trace element contamination. *Soil Biology and Biochemistry* **2018**, *121*, 202–211.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.03.021>
- Lorente-Casalini, O.; García-Carmona, M.; Pastor-Jáuregui, R.; Martín-Peinado, F.J. Assessment of biopiles treatment on polluted soils by the use of *Eisenia andrei* bioassay. *Environmental Pollution* **2021**, *275*, 116642.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116642>
- Lors, C.; Ponge, J.F.; Aldaya, M.M.; Damidot, D. Comparison of solid and liquid-phase bioassays using ecoscores to assess contaminated soils. *Environmental Pollution* **2011**, *159*, 2974–2981.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.04.028>
- Loveland, P. y Whalley, W. *Particle size analysis*. En: Soil and environmental analysis: physical methods. Eds. Smith, K.A. and Mullins, C.E. New York. 1991; p. 281–314.
<http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Soil/Soil-and-Environmental-Analysis.pdf>
- Luo, X.S.; Yu, S.; Li, X.D. Distribution, availability, and sources of trace metals in different particle size fractions of urban soils in Hong Kong: implications for assessing the risk to human health. *Environmental Pollution* **2011**, *159*, 1317–1326.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.01.013>
- Luo, X.S.; Ding, J.; Xu, B.; Wang, Y.J.; Li, H.B.; Yu, S. Incorporating bioaccessibility into human health risk assessments of heavy metals in urban park soils. *Science of The Total Environment* **2012a**, *424*, 88–96.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.053>
- Luo, X.S.; Yu, S.; Li, X.D. The mobility, bioavailability, and human bioaccessibility of trace metals in urban soils of Hong Kong. *Applied Geochemistry* **2012b**, *27*, 995–1004.
<https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.07.001>

- Lyu, J.; Park, J.; Pandey, L.K.; Choi, S.; Lee, H.; De Saeger, J.; Depuydt, S.; Han, T. Testing the toxicity of metals, phenol, effluents, and receiving waters by root elongation in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2018**, *149*, 225–232.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.006>
- Madejón, P.; Murillo, J.M.; Marañón, T.; Cabrera, F.; Soriano, M.A. Trace element and nutrient accumulation in sunflower plants two years after the Aznalcóllar mine spill. *Science of The Total Environment* **2003**, *307*, 239–257.
[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00609-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00609-5)
- Madejón, E.; Pérez de Mora, A.; Felipe, E.; Burgos, P.; Cabrera, F. Soil amendments reduce trace element solubility in a contaminated soil and allow regrowth of natural vegetation. *Environmental Pollution* **2006a**, *139*, 40–52.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.04.034>
- Madejón, P.; Murillo, J.M.; Marañón, T.; Cabrera, F. Bioaccumulation of trace elements in a wild grass three years after the Aznalcóllar mine spill (South Spain). *Environmental Monitoring and Assessment* **2006b**, *114*, 169–189.
<https://doi.org/10.1007/s10661-006-2523-1>
- Madejón, P.; Domínguez, M.T.; Murillo, J.M. Evaluation of pastures for horses grazing on soils polluted by trace elements. *Ecotoxicology* **2009**, *18*, 417–428.
<https://doi.org/10.1007/s10646-009-0296-3>
- Madejón, P.; Domínguez, M.T.; Madejón, E.; Cabrera, F.; Marañón, T.; Murillo, J.M. Soil-plant relationships and contamination by trace elements: A review of twenty years of experimentation and monitoring after the Aznalcóllar (SW Spain) mine accident. *Science of The Total Environment* **2018a**, *625*, 50–63.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.277>
- Madejón, P.; Domínguez, M.T.; Gil-Martínez, M.; Navarro-Fernández, C.M.; Montiel-Rozas, M.M.; Madejón, E.; Murillo, J.M.; Cabrera, F.; Marañón, T. Evaluation of amendment addition and tree planting as measures to remediate contaminated soils: The Guadiamar case study (SW Spain). *Catena* **2018b**, *166*, 34–43.
<https://doi.org/10.1016/j.catena.2018.03.016>

- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). *Métodos oficiales de análisis. Tomo 3*. Secretaría General. Madrid, España. 1994.
https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/fondo/pdf/44495_6.pdf
- Martín, F.; Díez, M.; García, I.; Simón, M.; Dorronsoro, C.; Iriarte, A.; Aguilar, J. Weathering of primary minerals and mobility of major elements in soils affected by an accidental spill of pyrite tailing. *Science of The Total Environment* **2007**, *378*, 49–52.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.01.031>
- Martín, F.; García, I.; Díez, M.; Sierra, M.; Simón, M.; Dorronsoro, C. Soil alteration by continued oxidation of pyrite tailings. *Applied Geochemistry* **2008**, *23*, 1152–1165.
<https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2007.11.012>
- Martín, F.; Escoto, M.; Fernández, J.; Fernández, E.; Arco, E.; Sierra, M.; Dorronsoro, C. Toxicity assessment of sediments with natural anomalous concentrations in heavy metals by the use of bioassay. *International Journal of Chemical Engineering* **2010**, 6 p.
<http://doi.org/10.1155/2010/101390>
- Martín, F.J.; Romero, A.; Arco, E.; Sierra, M.; Ortiz-Bernad, I.; Abbaslou, H. Assessment of arsenic toxicity in spiked soils and water solutions by the use of bioassays. *Spanish Journal of Soil Science* **2012**, *2*, 45–56.
<https://doi.org/10.3232/SJSS.2012.V2.N3.05>
- Martín, F.; Romero-Freire, A.; García, I.; Sierra, M.; Ortiz-Bernad, I.; Simón, M. Long-term contamination in a recovered area affected by a mining spill. *Science of The Total Environment* **2015**, *514*, 219–223.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.102>
- Martín Peinado, F. *Contaminación de suelos por el vertido de una mina de pirita (Aznalcóllar, España)*. Tesis doctoral. Universidad de Granada, España. 2001.
<https://digibug.ugr.es/handle/10481/28793>
- Martínez, J.G.; Torres, M.A.; dos Santos, G.; Moens, T. Influence of heavy metals on nematode community structure in deteriorated soil by gold mining activities in Sibutad, southern Philippines. *Ecological Indicators* **2018**, *91*, 712–721.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.04.021>

- Matejczyk, M.; Płaza, G.A.; Nałęcz-Jawecki, G.; Ulfig, K.; Markowska-Szczupak, A. Estimation of the environmental risk posed by landfills using chemical, microbiological and ecotoxicological testing of leachates. *Chemosphere* **2011**, *82*, 1017–1023.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.066>
- MINEM (Ministerio de Energía y Minas). *Anuario Minero 2018, Ministerio de Energía y Minas*. Perú. 2018.
[https://www.minem.gob.pe/minem/archivos/file/Mineria/PUBLICACIONES/ANUARIOS/2018/AM2018\(VF\).pdf](https://www.minem.gob.pe/minem/archivos/file/Mineria/PUBLICACIONES/ANUARIOS/2018/AM2018(VF).pdf)
- MINEM (Ministerio de Energía y Minas). *Guía ambiental para el manejo de relaves mineros*. Dirección General de Asuntos Ambientales Mineros. Perú. 2020.
<http://www.minem.gob.pe/minem/archivos/file/DGAAM/guias/relaveminero.pdf>
2020
- Morales, S.; Martín-Peinado, F.J.; Estepa, C.M.; Bagur-González, M.G. A quick methodology for the evaluation of preliminary toxicity levels in soil samples associated to a potentially heavy-metal pollution in an abandoned ore mining site. *Chemosphere* **2019**, *222*, 345–354.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.123>
- Moreno, J.L.; Bastida, F.; Ros, M.; Hernández, T.; García, C. Soil organic carbon buffers heavy metal contamination on semiarid soils: effects of different metal threshold levels on soil microbial activity. *European Journal of Soil Biology* **2009**, *45*, 220–228.
<https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2009.02.004>
- Moreno-Jiménez, E.; Vázquez, S.; Carpena-Ruiz, R.O.; Esteban, E.; Peñalosa, J.M. Using Mediterranean shrubs for the phytoremediation of a soil impacted by pyritic wastes in Southern Spain: a field experiment. *Journal of Environmental Management* **2011**, *92*, 1584–1590.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.01.022>
- Murillo, J.M.; Madejón, E.; Madejón, P.; Cabrera, F. The response of wild olive to the addition of a fulvic acid-rich amendment to soils polluted by trace elements (SW Spain). *Journal of Arid Environments* **2005**, *63*, 284–303.
<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2005.03.022>

- Nagajyoti, P.C.; Lee, K.D.; Sreekanth, T.V.M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* **2010**, *8*, 199–216.
<https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Nahmani, J.; Hodson, M.E.; Black, S. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environmental Pollution* **2007a**, *145*, 402–424.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.04.009>
- Nahmani, J.; Hodson, M.E.; Black, S. Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. *Environmental Pollution* **2007b**, *149*, 44–58.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.12.018>
- Nakamaru, Y.M. y Martín, F.J. Effect of soil organic matter on antimony bioavailability after the remediation process. *Environmental Pollution* **2017**, *228*, 425–432.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.042>
- Nannipieri, P.; Ascher, J.; Ceccherini, M.T.; Landi, L.; Pietramellara, G.; Renella, G. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* **2017**, *68*, 12–26.
https://doi.org/10.1111/ejss.4_12398
- Nielsen, M.N. y Winding, A. *Microorganisms as indicators of soil health*. National Environmental Research Institute, Denmark. Technical Report 388. 2002.
https://www2.dmu.dk/1_viden/2_Publikationer/3_fagrappporter/rappporter/FR388.pdf
- Niemeyer, J.C.; Lolata, G.B.; de Carvalho, G.M.; Da Silva, E.M.; Sousa, J.P.; Nogueira, M.A. Microbial indicators of soil health as tools for ecological risk assessment of a metal contaminated site in Brazil. *Applied Soil Ecology* **2012**, *59*, 96–105.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.03.019>
- Niemeyer, J.C.; Moreira-Santos, M.; Nogueira, M.A.; Carvalho, G.M.; Ribeiro, R.; Da Silva, E.M.; Sousa, J.P. Environmental risk assessment of a metal-contaminated area in the tropics. Tier I: screening phase. *Journal of Soils and Sediments* **2015**, *10*, 1557–1571.
<https://doi.org/10.1007/s11368-010-0255-x>

Nikolic, N.; Kostic, L.; Djordjevic, A.; Nikolic, M. Phosphorus deficiency is the major limiting factor for wheat on alluvium polluted by the copper mine pyrite tailings: a black box approach. *Plant and Soil* **2011**, 339, 485–498.

<https://doi.org/10.1007/s11104-010-0605-x>

No a la mina. *Pobladores marcharán en contra del proyecto minero Michiquillay*. La montaña sigue en pie gracias a su gente. 16 diciembre, 2017.

<https://noalamina.org/latinoamerica/peru/item/38331-pobladores-marcharan-en-contra-del-proyecto-minero-michiquillay>

No a la mina. *Ríos de Puno son contaminados con aguas ácidas por mina Arasi*. La montaña sigue en pie gracias a su gente. 7 febrero, 2018.

<https://noalamina.org/latinoamerica/peru/item/38843-rios-de-puno-son-contaminados-con-aguas-acidas-por-mina-arasi>

Nriagu, J.O.; Bhattacharya, P.; Mukherjee, A.B.; Bundschuh, J.; Zevenhoven, R.; Loeppert, R.H. *Arsenic in soil and groundwater: an overview*. En: *Arsenic in soil and groundwater environment: biogeochemical interactions, health effects and remediation. Trace metals and other contaminants in the environment*. Vol. 9. Bhattacharya, P.; Mukherjee, A.B.; Bundschuh, J.; Zevenhoven, R.; Loeppert, R.H. (eds). Elsevier, Amsterdam. 2007; p. 1–58.

<https://www.amazon.es/Arsenic-Soil-Groundwater-Environment-Biogeochemical/dp/0444518207?asin=B0089NWWG0&revisionId=&format=4&depth=1>

Nwachukwu, O.I. y Pulford, I.D. Microbial respiration as an indication of metal toxicity in contaminated organic materials and soil. *Journal of Hazardous Materials* **2011**, 185, 1140–1147.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.10.024>

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). *Guideline for the testing of chemicals. Soil microorganisms: carbon transformation test*. 217. 2000; p. 10.

<https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948325.pdf>

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). *Guideline for the testing of chemicals. Proposal for updating guideline 208 Terrestrial plant test: Seedling emergence and seedling growth test*. 2003; p.19.

<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/33653757.pdf>

- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). *Environmental Performance Reviews: Spain 2004*. OECD Publications. France. 2004; p. 211.
<https://doi.org/10.1787/9789264108639-en>
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). *Guideline for the testing of chemicals. Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)*. 222. 2015; p. 19.
<https://www.oecd.org/env/ehs/testing/Draft-Updated-Test-Guildeline-222-Earthworm-reproduction-Test.pdf>
- Oijagbe, I.J.; Abubakar, B.Y.; Edogbanya, P.R.O.; Suleiman, M.O.; Olorunmola, J.B. Effects of heavy metals on soil microbial biomass carbon. *MOJ Biology and Medicine* **2019**, *4*, 30–32.
<https://medcraveonline.com/MOJBM/MOJBM-04-00109.pdf>
- Okorie, A.; Entwistle, J.; Dean, J.R. The application of in vitro gastrointestinal extraction to assess oral bioaccessibility of potentially toxic elements from an urban recreational site. *Applied Geochemistry* **2011**, *26*, 789–796.
<https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.01.036>
- OMS (Organización Mundial de la Salud). *Arsénico*. 15 de febrero de 2018.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>
- Otero, X.L.; Álvarez, E.; Fernández-Sanjurjo, M.J.; Macías, F. Micronutrients and toxic trace metals in the bulk and rhizospheric soil of the spontaneous vegetation at an abandoned copper mine in Galicia (NW Spain). *Journal of Geochemical Exploration* **2012**, *112*, 84–92.
<https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2011.07.007>
- Palma, P.; López-Orozco, R.; Mourinha, C.; Oropesa, A.L.; Novais, M.H.; Alvarenga, P. Assessment of the environmental impact of an abandoned mine using an integrative approach: A case-study of the “Las Musas” mine (Extremadura, Spain). *Science of The Total Environment* **2019**, *659*, 84–94.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.321>

- Paniagua-López, M.; Vela-Cano, M.; Correa-Galeote, D.; Martín-Peinado, F.; Martínez Garzón, F.J.; Pozo, C.; González-López, J.; Sierra Aragón, M. Soil remediation approach and bacterial community structure in a long-term contaminated soil by a mining spill (Aznalcóllar, Spain). *Science of The Total Environment* **2021**, 777, 145128.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145128>
- Paolini, J.E. Actividad microbiológica y biomasa microbiana en suelos cafetaleros de los Andes venezolanos. *Terra Latinoamericana* **2018**, 36, 13–22.
<https://doi.org/10.28940/terra.v36i1.257>
- Pardo, J.; Mondaca, P.; Celis-Diez, J.L.; Ginocchio, R., Navarro-Villaruel, C.; Neaman, A. Assessment of revegetation of an acidic metal(loid)-polluted soils six years after the incorporation of lime with and without compost. *Geoderma* **2018**, 331, 81–86.
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.06.018>
- Pastor-Jáuregui, R.; Paniagua-López, M.; Martínez-Garzón, J.; Martín-Peinado, F.; Sierra-Aragón, M. Evolution of the Residual Pollution in Soils after Bioremediation Treatments. *Applied Sciences* **2020**, 10, 1006.
<https://doi.org/10.3390/app10031006>
- Pastor-Jáuregui, R.; Paniagua-López, M.; Aguilar-Garrido, A.; Martín-Peinado, F.; Sierra-Aragón, M. Long-term assessment of remediation treatments applied to an area affected by a mining spill. *Land Degradation and Development* **2021**, 32, 2481–2492.
<https://doi.org/10.1002/ldr.3911>
- Patra, D.K.; Pradhan, C.; Patra, H.K. Toxic metal decontamination by phytoremediation approach: Concept, challenges, opportunities and future perspectives. *Environmental Technology & Innovation* **2020**, 18, 100672.
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100672>
- Pecina, V.; Juříčka, D.; Vašínová, M.; Kynický, J.; Baláková, L.; Brtnický, M. Polluted brownfield site converted into a public urban park: a place providing ecosystem services or a hidden health threat? *Journal of Environmental Management* **2021**, 291, 112669.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112669>

- Pedersen, H.D.; Postma, D.; Jakobsen, R. Release of arsenic associated with the reduction and transformation of iron oxides. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2006**, *70*, 4116–4129.
<https://doi.org/10.1016/j.gca.2006.06.1370>
- Přibil, R. *Applied Complexometry*. Pergamon Series in Analytical Chemistry. Vol 5. Press Ltd., Oxford. 1982.
- Quevauviller, P.; Lachica, M.; Barahona, E.; Gómez, A.; Rauret, G.; Ure, A.; Muntau, H. Certified reference material for the quality control of EDTA and DTPA-extractable trace metal contents in calcareous soils (CRM 6000). *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1998**, *360*, 505–511.
<https://doi.org/10.1007/s002160050750>
- Renaud, M.; Chelinho, S.; Alvarenga, P.; Mourinha, C.; Palma, P.; Sousa, J.P.; Natal-da-Luz, T. Organic wastes as soil amendments – effects assessment towards soil invertebrates. *Journal of Hazardous Materials* **2017**, *330*, 149–156.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.01.052>
- Rieuwerts, J.S.; Thornton, I.; Farago, M.E.; Ashmore, M.R. Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation & Bioavailability* **1998**, *10*, 61–75.
<https://doi.org/10.3184/095422998782775835>
- Rivas, S. *Memoria del mapa de series de vegetación de España*. Instituto para la Conservación de la Naturaleza (ICONA). Madrid, España. 1987.
https://floramontiberica.files.wordpress.com/2012/09/mapa_series_vegetacion_1987.pdf
- Rocco, C.; Agrelli, D.; Tafuro, M.; Caporale, A.; Adamo, P. Assessing the bioavailability of potentially toxic elements in soil: A proposed approach. *Italian Journal of Agronomy* **2018**, *13*, 16–22.
<https://doi.org/10.4081/ija.2018.1348>
- Rodríguez-Eugenio, N.; McLaughlin, M.; Pennock, D. *Soil pollution: a hidden reality*. FAO, Italy. 2018; p. 142.
<http://www.fao.org/3/i9183en/i9183en.pdf>

- Romero-Freire, A.; Sierra-Aragón, M.; Ortiz-Bernad, I.; Martín-Peinado, F.J. Toxicity of arsenic in relation to soil properties: implications to regulatory purposes. *Journal of Soils and Sediments* **2014**, *14*, 968–979.
<https://doi.org/10.1007/s11368-014-0845-0>
- Romero-Freire, A.; Martín, F.J.; Díez, M.; van Gestel, C.A.M. Influence of soil properties on the bioaccumulation and effects of arsenic in the earthworm *Eisenia andrei*. *Environmental Science and Pollution Research* **2015a**, *22*, 15016–15028.
<https://doi.org/10.1007/s11356-015-4659-4>
- Romero-Freire, A.; Martín, F.J.; van Gestel, C.A.M. Effect of soil properties on the toxicity of Pb: Assessment of the appropriateness of guideline values. *Journal of Hazardous Materials* **2015b**, *289*, 46–53.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.034>
- Romero-Freire, A. *Influence of soil properties on the toxicity of metal-polluted soils: comparison of different bioassay methods*. Tesis doctoral. Universidad de Granada, España. 2016.
<http://hdl.handle.net/10481/40798>
- Romero-Freire, A.; García, I.; Simón, M.; Martínez, F.J.; Martín, F.J. Long-term toxicity assessment of soils in a recovered area affected by a mining spill. *Environmental Pollution* **2016a**, *208*, 553–561.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.10.029>
- Romero-Freire, A.; Sierra, M.; Martínez, F.J.; Martín, F.J. Is soil basal respiration a good indicator of soil pollution? *Geoderma* **2016b**, *263*, 132–139.
<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.09.006>
- Romero-Freire, A. *Influence of soil properties on the toxicity of metal-polluted soils: comparison of different bioassay methods*. Tesis doctoral. Universidad de Ámsterdam (Holanda) y Universidad de Granada (España). 20016c.
<https://digibug.ugr.es/handle/10481/40798>
- Romero-Freire, A.; Lofts, S.; Martín, F.J.; van Gestel, C.A.M. Effects of aging and soil properties on zinc oxide nanoparticle availability and its ecotoxicological effects to the earthworm *Eisenia andrei*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2017**, *36*, 137–146.
<https://doi.org/10.1002/etc.3512>

- Salt, D.E.; Smith, R.D.; Raskin, I. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **1998**, *49*, 643–668.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.643>
- Schmidt, C.W. Lead in air: adjusting to a new standard. *Environmental Health Perspectives* **2010**, *118*, A76–A79.
<https://doi.org/10.1289/ehp.118-a76>
- Schramel, O.; Michalke, B.; Kettrup, A. Study of the copper distribution in contaminated soils of hop fields by single and sequential extraction procedures. *Science of The Total Environment* **2000**, *263*, 11–22.
[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00606-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00606-9)
- Schwertmann, U. y Taylor, R.M. *Iron oxides*. En Minerals in soil environments. Dixon, J.B. y Weed, S.B. (eds). Soil Science Society of America, Madison, Wis. 1977; p.145–180.
- Sehmel, G.A. Particle resuspension: A review. *Environment International* **1980**, *4*, 107–127.
[https://doi.org/10.1016/0160-4120\(80\)90005-7](https://doi.org/10.1016/0160-4120(80)90005-7)
- Shaheen, S.M.; Tsadilas, C.D.; Mitsibonas, T.; Tzouvalekas, M. Distribution coefficient of copper in different soils from Egypt and Greece. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **2009**, *40*, 214–226.
<https://doi.org/10.1080/00103620802625625>
- Shukurov, N.; Kodirov, O.; Peitzsch, M.; Kersten, M.; Pen-Mouratov, S.; Steinberger, Y. Coupling geochemical, mineralogical and microbiological approaches to assess the health of contaminated soil around the Almalyk mining and smelter complex, Uzbekistan. *Science of The Total Environment* **2014**, *476-477*, 447–459.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.031>
- Siciliano, S.D.; James, K.; Zhang, G.Y.; Schafer, A.N.; Peak, J.D. Adhesion and enrichment of metals on human hands from contaminated soil at an arctic urban brownfield. *Environmental Science and Technology* **2009**, *43*, 6385–6390.
<https://doi.org/10.1021/es901090w>
- Sierra, M.; Mitsui, Y.; García-Carmona, M.; Martínez, F.J.; Martín, F.J. The role of organic amendment in soils affected by residual pollution of potentially harmful elements. *Chemosphere* **2019**, *237*, 124549.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124549>

Simón, M.; Ortíz, I.; García, I.; Fernández, E.; Fernández, J.; Dorronsoro, C.; Aguilar, J. Pollution of soils by the toxic spill of a pyrite mine (Aznalcóllar, Spain). *Science of The Total Environment* **1999**, *242*, 105–115.

[https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(99\)00378-2](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(99)00378-2)

Simón, M.; Martín, F.; Ortíz, I.; García, I.; Fernández, J.; Fernández, E.; Dorronsoro, C.; Aguilar, J. Soil pollution by oxidation of tailings from toxic spill of a pyrite mine. *Science of The Total Environment* **2001**, *279*, 63–74.

[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00726-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00726-4)

Simón, M.; Dorronsoro, C.; Ortiz, I.; Martín, F.; Aguilar, J. Pollution of carbonate soils in a Mediterranean climate due to a tailings spill. *European Journal of Soil Science* **2002**, *53*, 321–330.

<https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2002.00435.x>

Simón, M.; Iriarte, A.; García, I.; Martín, F.; Aguilar, J.; Dorronsoro, C. *Mobility of heavy metals in pyritic mine spills from an accident in Aznalcóllar, SW Spain*. En *Advances in GeoEcology*. Faz, A.; Ortíz, R.; Mermut, A.R. (eds). 2005a, 36, 467–476. Reiskirchen, Germany: Catena Verlag GMBH.

https://www.researchgate.net/publication/230822373_Mobility_of_heavy_metals_in_pyrite_mine_spill_from_an_accident_in_Aznalcollar_SW_Spain

Simón, M.; Martín, F.; García, I.; Bouza, P.; Dorronsoro, C.; Aguilar, J. Interaction of limestone grains and acidic solutions from the oxidation of pyrite tailings. *Environmental Pollution* **2005b**, *135*, 65–72.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.10.013>

Simón, M.; García, I.; Martín, F.; Díez, M.; Del Moral, F.; Sánchez, J.A. Remediation measures and displacement of pollutants in soils affected by the spill of a pyrite mine. *Science of The Total Environment* **2008**, *407*, 23–39.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.040>

Simón, M.; Díez, M.; García, I.; Martín, F. Distribution of As and Zn in soils affected by the spill of a pyrite mine and effectiveness of the remediation measures. *Water, Air and Soil Pollution* **2009**, *198*, 77–85.

<https://doi.org/10.1007/s11270-008-9827-4>

- Simón, M.; Diez, M.; González, V.; García, I.; Martín, F.; de Haro, S. Use of liming in the remediation of soils polluted by sulphide oxidation: a leaching-column study. *Journal of Hazardous Materials* **2010**, *180*, 241–246.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.04.020>
- Smolders, E; Oorts, K.; Van Sprang, P.; Schoeters, I.; Janssen, C.R.; McGrath, S.P.; McLaughlin M.J. Toxicity of trace metals in soil as affected by soil type and aging after contamination: using calibrated bioavailability models to set ecological soil standards. *Environmental Toxicology* **2009**, *28*, 1633–1642.
<https://doi.org/10.1897/08-592.1>
- Son, J.; Kim, J.G.; Hyun, S.; Cho, K. Screening level ecological risk assessment of abandoned metal mines using chemical and ecotoxicological lines of evidence. *Environmental Pollution* **2019**, *249*, 1081–1090.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.019>
- Sposito, G.; Lund, L.J.; Chang, A.C. Trace metal chemistry in arid-zone field soils amended with sewage sludge: I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in solid phases. *Soil Science Society of America Journal* **1982**, *46*, 260–264.
<https://doi.org/10.2136/sssaj1982.03615995004600020009x>
- Spurgeon, D.J. y Hopkin, S.P. Extrapolation of the laboratory-based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites. *Ecotoxicology* **1995**, *4*, 190–205.
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF00116481.pdf>
- Spurgeon, D.J. y Hopkin, S.P. Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference to Zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **1996**, *35*, 86–95.
<https://doi.org/10.1006/eesa.1996.0085>
- SSS (Soil Survey Staff). *Keys to soil taxonomy*. 12th edition. USDA-Natural Resources Conservation Service, Washington. 2014; p. 360.
https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/soils/survey/class/taxonomy/?cid=nrcs142p2_053580

Stefanowicz, A.M.; Niklinska, M.; Laskowski, R. Metals affect soil bacterial and fungal functional diversity differently. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2008**, *27*, 591–598.

<https://doi.org/10.1897/07-288.1>

Stefanowicz, A.M.; Kapusta, P.; Zubek, S.; Stanek, M.; Woch, M.W. Soil organic matter prevails over heavy metal pollution and vegetation as a factor shaping soil microbial communities at historical Zn–Pb mining sites. *Chemosphere* **2020**, *240*, 124922.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124922>

Tordoff, G.M.; Baker, A.J.M.; Willis, A.J. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere* **2000**, *41*, 219–228.

[https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00414-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00414-2)

Tóth, G.; Hermann, T.; Da Silva, M.R.; Montanarella, L. Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environment International* **2016**, *88*, 299–309.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.017>

Tyurin, I. *Analytical procedure for a comparative study of soil humus*. Trudy Pochv. Inst. Dokuchaeva. USSR. 1951, *38*, 5–9.

USDA (United States Department of Agriculture). *Soil survey laboratory. Methods and procedures for collecting soil samples*. Soil Conservation Service. Washington. 1972.

USDA (United States Department of Agriculture). *Soil Taxonomy, second ed.* Soil Survey Staff. Natural Resources Conservation Service. Agriculture Handbook N° 436. Washington. 1999.

https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/nrcs142p2_051232.pdf

USEPA (United States Environmental Protection Agency). *Risk assessment. Guidance for superfund. Volume I: Human health evaluation manual (Part A). Interim Final*. 1989.

https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/rags_a.pdf

USEPA (United States Environmental Protection Agency). *Ecological effects test guidelines. Seed germination/root elongation toxicity test*. OPPTS 850.4200. National Service Center for Environmental Publications, US. 1996; p. 8.

<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=P100RF5I.TXT>

- USEPA (United States Environmental Protection Agency). *Supplemental guidance for developing soil screening levels for superfund sites*. OSWER (Office of solid waste and emergency response) 9355.4-24. 2002.
<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=91003IJK.TXT>
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). *Risk assessment. Guidance for superfund. Volume I: Human health evaluation manual (Part E, Supplemental guidance for dermal risk assessment). Final*. OSWER (Office of solid waste and emergency response) 9285.7-02EP. 2004.
https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-09/documents/part_e_final_revision_10-03-07.pdf
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). *Estimation of relative bioavailability of lead in soil and soil-like materials using In Vivo and In Vitro Methods*. OSWER (Office of solid waste and emergency response) 9285.7-77. 2007a.
<https://semspub.epa.gov/work/11/175416.pdf>
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). *Guidance for evaluating the oral bioavailability of metals in soils for use in human health risk assessment*. OSWER (Office of solid waste and emergency response) 9285.7-80. 2007b.
<https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=93001C3I.TXT>
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). *Exposure assessment tools by routes*. 2017a.
<https://www.epa.gov/expobox/exposure-assessment-tools-routes>.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). *Standard Operating Procedure for an In Vitro Bioaccessibility Assay for Lead and Arsenic in Soil*. OLEM (Office of land and emergency management) 9200.2-164. 2017b.
<https://clu-in.org/download/contaminantfocus/arsenic/arsenic-SOP-OLEM-9200.2-164.pdf>
- Van Gestel, C.A.M. Physico-chemical and biological parameters determine metal bioavailability in soils. *Science of The Total Environment* **2008**, 406, 385–395.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.05.050>

- Wakelin, S.A.; Chu, G.; Broos, K.; Clarke, K.R.; Liang, Y.; McLaughlin, M.J. Structural and functional response of soil microbiota to addition of plant substrate are moderated by soil Cu levels. *Biology and Fertility of Soils* **2010**, *46*, 333–342. <https://doi.org/10.1007/s00374-009-0436-1>
- Wang, S. y Mulligan, C.N. Occurrence of arsenic contamination in Canada: Sources, behavior and distribution. *Science of The Total Environment* **2006**, *366*, 701–721. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.09.005>
- Wiszniewska, A.; Hanus-Fajerska, E.; Muszyńska, E.; Ciarkowska, K. Natural organic amendments for improved phytoremediation of polluted soils: a review of recent progress. *Pedosphere* **2016**, *26*, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60017-0](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60017-0)
- Xiong, J.; Madejón, P.; Madejón, E.; Cabrera, F. Assisted natural remediation of a trace element-contaminated acid soil: an eight-year field study. *Pedosphere* **2015**, *25*, 250–262. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60010-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60010-8)
- Yotova, G.; Zlateva, B.; Ganeva, S.; Simeonov, V.; Kudłak, B.; Namieśnik, J.; Tsakovski, S.L. Phytoavailability of potentially toxic elements from industrially contaminated soils to wild grass. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2018**, *164*, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.077>
- Zhou, S.; Liu, J.; Xu, M.; Lv, J.; Sun, N. Accumulation, availability, and uptake of heavy metals in a red soil after 22-year fertilization and cropping. *Environmental Science and Pollution Research* **2015**, *22*, 15154–15163. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4745-7>
- Zornoza, R.; Acosta, J.A.; Martínez-Martínez, S.; Faz, A.; Bååth, E. Main factors controlling microbial community structure and function after reclamation of a tailing pond with aided phytostabilization. *Geoderma* **2015**, *245–246*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.01.007>

Anexos

Anexo 1

Evolution of the Residual Pollution in Soils after Bioremediation Treatments

Article

Evolution of the Residual Pollution in Soils after Bioremediation Treatments

Rocío Pastor-Jáuregui ¹, Mario Paniagua-López ², Javier Martínez-Garzón ²,
Francisco Martín-Peinado ^{2,*}  and Manuel Sierra-Aragón ² 

¹ Departamento de Recursos Hídricos, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima 15024, Peru; rpastor@lamolina.edu.pe

² Soil Science Department, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain; mpaniagua@ugr.es (M.P.-L.); fjarzon@ugr.es (J.M.-G.); msierra@ugr.es (M.S.-A.)

* Correspondence: fmartin@ugr.es; Tel.: +34-958241000 (ext. 20058)

Received: 15 January 2020; Accepted: 27 January 2020; Published: 3 February 2020



Featured Application: This work uses a simple and reliable methodology applicable to other areas for the evaluation of residual contamination after bioremediation treatments.

Abstract: This study is focused on one of the most important spills that ever happened in Europe, the Aznalcóllar's mine spill. The extensive application of phytostabilization in the area led to the implementation of the Guadiamar Green Corridor (GGC). Soil physicochemical properties were analyzed and the total concentration of Pb, As, Zn and Cu was measured by X-ray fluorescence (XRF); bioassay using *Lactuca sativa* L. was applied to assess potential toxicity. Two decades after the accident, some soils affected by residual contamination continue to appear in the area. According to regulatory levels, Pb and As concentrations are exceeded in around 13% and 70%, respectively, in the uppermost part of the soils (first 10 cm). The change in soil properties after bioremediation treatment positively promoted the reduction in the potential mobility of pollutants by the increase in pH, CaCO₃ content and organic carbon. Anyway, the bioassay with *Lactuca sativa*, indicated that around 25% of the soils showed toxicity by the reduction of the root elongation in relation to the control samples. Our results indicate that monitoring of the GGC is still needed, together with the application of soil recovery measures to reduce the potential toxicity in some sectors of the affected area.

Keywords: phytostabilization; heavy metals; arsenic; potential toxicity

1. Introduction

Soil contamination with potentially harmful elements (PHEs) is a growing concern and ubiquitous around the globe. According to He et al. [1], more than 10 million contaminated sites exist worldwide related to anthropogenic sources and activities; for instance, 137,000 km² of agricultural land in Europe needs local assessment and eventual remediation action in relation to the heavy metal concentrations [2]. The restoration of polluted soils affected by heavy metals and related elements is a great challenge that, in many cases, concludes with incomplete results [3]. The full removal of these polluted soils is very difficult due to the reactions between the contaminants and soil properties and constituents producing the precipitation or immobilization of these PHEs into the soil matrix [4]. Remediation actions to remove these PHEs from the soil are usually expensive, time-consuming or need the application of ex-situ technologies that are not able to develop in large areas. Moreover, in many cases the remediation is focused in the application of amendments to reduce the bioavailability and to promote the immobilization of pollutant into the soil matrix, followed by a stabilization of the soil surface by vegetation (phytostabilization) [5], implying that these areas increase the background concentrations

of PHEs in relation to previous values. In these cases, monitoring over time is necessary to assess the evolution of the soil properties and potential changes in the mobility and availability of pollutants. Few studies involve this type of assessment over time under real situation, but in some cases, potential environmental problems were detected; for example, García-Carmona et al. [6] reported an increase in the availability of As, Pb, Cu, Zn, and Cd over time 20 years after the remediation actions in the affected area were completed; Nakamaru and Martín-Peinado [7] also reported an increase in Sb availability after the rise in soil organic matter related to phytostabilization; and Zhou et al. [8] pointed out that the effect of 22 year fertilization and cropping increased Pb and Cd availability in soils. Therefore, restored areas where the remediation actions involved the application of amendments and the immobilization of pollutants into the soils may lead to hidden residual pollution that needs to be assessed to avoid a potential risk of pollution to the environment of living organisms. In this work, we present the study of an area polluted twenty years ago (April 1998), by one of the largest mining spills in the world [9] the Aznalcóllar's mine spill. This mine is located in the largest polymetal-sulphide reserve in Europe [10], where the break of the dump containing wastes with high concentrations of PHEs (mainly Pb, As, Zn, Cu) spilled about $3.6 \times 10^6 \text{ m}^3$ of acidic water and $0.9 \times 10^6 \text{ m}^3$ of toxic tailings, affecting an area of 45 km^2 of soils, mainly with agricultural use [11].

After the accident, one of the main soil restoration programs carried out in Europe was realized by the implication of the Administration, the Universities and other Research Institutions (CSIC) and the investment of 280 M€ for the recovery of the area [12]. The remediation actions were focused on the removal of the tailings and the highly polluted topsoil, the application of organic and inorganic amendments and the phytostabilization with autochthonous vegetation [13]. The remediation actions finalized with the implementation in the whole area of the Guadiamar Green Corridor (GGC) in 2003, designated by the administration as a "protected landscape" where the extractive activities are forbidden (agriculture, grazing, hunting, and fishing), and the main use was focused in recreational or environmental outreach activities. Nowadays, the whole area is considered as restored, but a very heterogeneous evolution of the vegetation recovery is detected. Most of the area presents a very good response in relation to the vegetation cover and PHEs immobilization, but residual polluted soils are still detected into the GGC by the identification of heterogeneous plots where no vegetation can grow [14].

The aim of this work is to evaluate the evolution of the pollution and vegetation recovery in the GGC twenty years after the accident and after the remediation actions were finalized. The work focused on the assessment of the changes in the physicochemical properties of the soils, both in surface samples as in depth, and in the evaluation of the mobility of PHEs still presented in this restored area.

2. Materials and Methods

2.1. Soil Sampling

The monitoring of the pollution over time was made by the soil sampling of 84 georeferenced plots ($10 \times 10 \text{ m}$) homogeneous and randomly distributed along the whole affected area. Composite samples were taken at each depth (0–10; 10–30; and 30–50 cm) to obtain one sample for each one representative of 100 m^2 ; all details in relation to sampling protocol and design are reported in Simón et al. [15].

Previous studies [16] indicated that, before the accident, the area can be subdivided into two sectors according to soil properties. Sector 1 (S1) includes soils with acidic pH, no or slightly carbonated and loam to sandy-loam textures; meanwhile Sector 2 (S2) includes soils with neutral or slightly alkaline pH, moderate to highly carbonated and loam to clay/silty textures. Sector 1 covers the first 12 km downstream the mine including 20 sampling plots and Sector 2 covers the following 28 km including 64 sampling points (Figure 1).

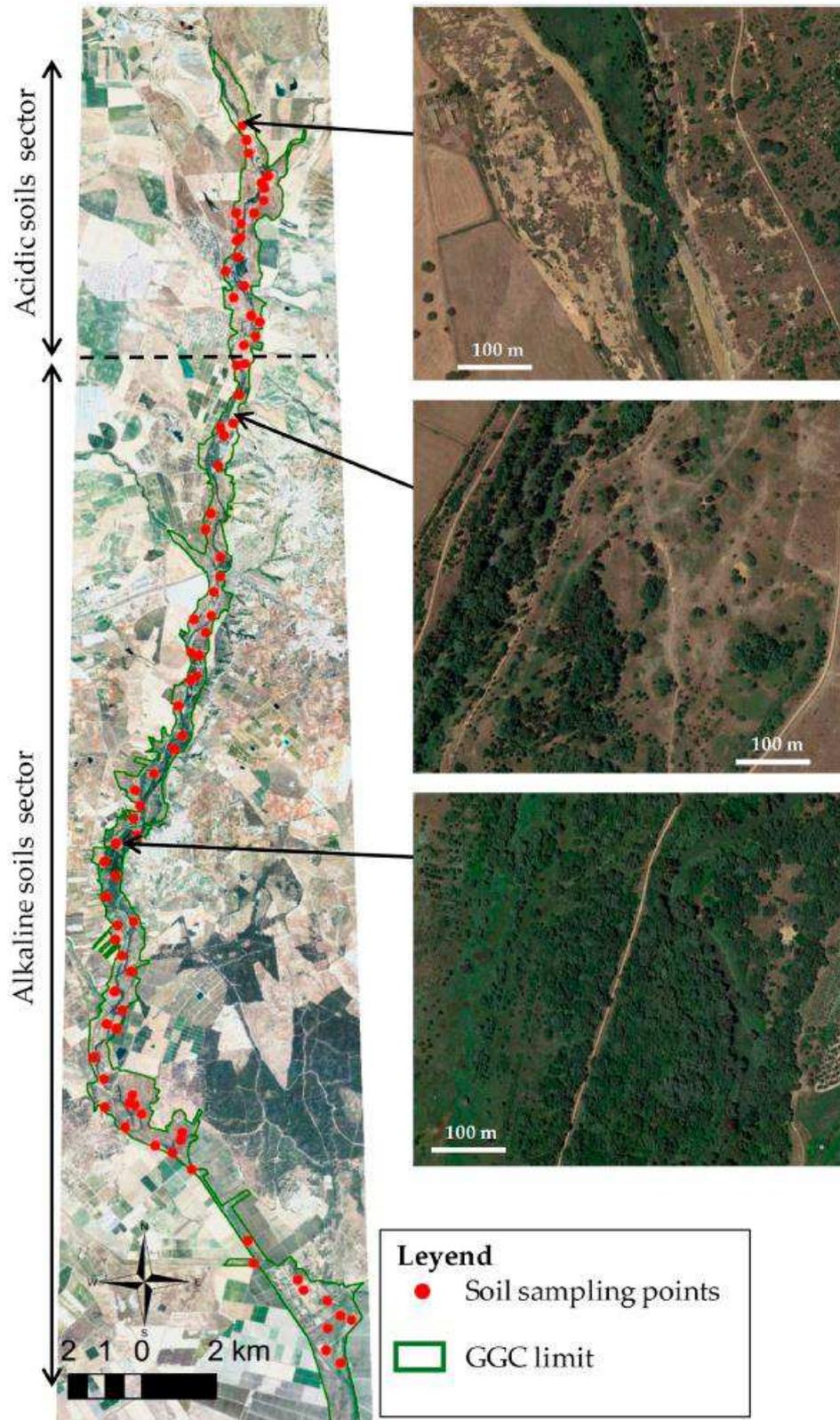


Figure 1. Soil sampling points along the Guadiamar Green Corridor(GGC).

2.2. Analytical Methods

All samples were taken to laboratory, dried and sieved (<2 mm) prior to the analyses. Soil properties and constituents were determined according to standard methods [17]. Soil granulometry was measured after removal of organic matter with hydrogen peroxide and dispersion of samples with sodium hexametaphosphate, soil pH was measured in a soil:water suspension 1:2.5, electrical conductivity (EC) was measured in a soil:water suspension 1:5. Finely ground samples were used to the measurement of calcium carbonate content by volumetric method, the quantification of the organic carbon (OC) by acid-oxidation method. The concentration of PHEs (As, Pb, Cu, and Zn) was also analyzed in finely ground samples by X-ray fluorescence (XRF) with a NITON XL3t-980 GOLDD+ instrument (Thermo Fisher Scientific, Tewksbury, MA, USA). The precision and accuracy of the main PHEs concentrations were calculated by the measurement of a certified reference material (CRM052-050 RT-Corporation Limited, Salisbury, UK), obtaining the following results (certified vs. measured; mean values in mg kg⁻¹ and standard error in brackets): Pb: 82.6 (4.0) vs. 92.6 (4.8); As: 14.6 (2.9) vs. 15.5 (3.9); Zn: 89.0 (4.0) vs. 94.4 (6.2); Cu: 44.2 (6.9) vs. 48.5 (8.0).

For the toxicity assessment of the potential pollution in the area, the bioassay with *Lactuca sativa* was used, according to Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) [18] and United States Environmental Protection Agency (USEPA) [19] recommendations. For each experimental unit, a saturated paste of the soil was obtained after 24 h of contact and vacuum pump extraction; after this, 5 mL of the extract were put in contact with 20 seeds of *Lactuca sativa* during 5 days of incubation at 25 ± 1 °C. After this period, the percentage of germination and root elongation was measured both in soil samples as in control samples (distilled water). Values range from 0 (maximum toxicity) to 100 (no toxicity).

2.3. Statistical Analysis

Statistical analyses of the data were carried out after evaluating the data set for normal distribution by the Kolmogorov–Smirnov test. Mean comparison study was made by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test, where significant differences were considered for $p < 0.05$. For the toxicity bioassay, Pearson's correlation analysis was made between the root elongation and the main properties and pollutants in the soil. The distributions of the data were established by calculating the mean values and the standard deviations by the use of cumulative frequency-distribution curves. All statistical treatments were made using SPSS v.20.0 software (IBM, Armonk, NY, USA, 2012.).

3. Results and Discussion

3.1. Evolution in Soil Properties over Time

Soils affected by the spill were related to the fluvial regime, involving the main soil groups usually found in this environment: Fluvisols and Regosols according to International Union of Soil Sciences (IUSS) Working Group World Reference Base for soil resources (WRB) [20] or Entisols according to SSS [21]. These soils are usually characterized by low development profiles and high fertility, producing areas with high anthropic influence where crops and grazing are dominants [22,23]. According to the main properties, the GGC was divided into two sectors: (1) Sector 1 (S1), involving soils with acidic pH (5–6), mean CaCO₃ content <2% and organic carbon <0.9% in the surface horizon; and (2) Sector 2 (S2), involving soils with neutral or slightly alkaline pH (7–8), mean CaCO₃ content around 10% and organic carbon around 2% in the surface horizon [16].

The initial impact of the spill produced acidification and increase of electrical conductivity (EC) in the uppermost 10 cm of the soils. This was related to the oxidation of the sulphides generating a release of complex sulphates and the solubilization of the main pollutants (Pb, As, Zn, and Cu) [11]. The initial remediation actions started with the removal of the tailings and the uppermost part of the soils strongly polluted, followed by the application of different organic and inorganic amendments to promote the improvement of the soil properties [24]. In this period, phytoextraction techniques were

applied in experimental plots into the affected area; the main species used was *Brassica juncea*, but the results indicated a low total uptake of heavy metals in the plants and pointed out the problems related to the use of phytoextraction in the clean-up of multi-element contaminated sites [25]. Other studies developed in the GGC also indicated the low success of the phytoextraction technique applied to this area, so the restoration actions were focused in phytostabilization or phytoimmobilization [25,26].

Twenty years after the accident and the implementation of the recovery and bioremediation measures, soils significantly changed in the most important parameters, with differences in relation to the initial soil properties and the sector involved (Table 1). In this way, the acidic sector (S1) increased the pH in the uppermost 10 cm of the soils, without significant differences in depth. The increase in pH is related to the liming treatments applied during the first two years [16]; however, this rise in pH came at the expense of the dissolution of the CaCO_3 after a process related to the tailing oxidation of sulphides remained in the soil matrix, so the differences in the CaCO_3 content was not evident over time. The OC content was significantly increased in the uppermost 10 cm of the soils. This rise in OC is directly related to the success of the phytostabilization in the whole area, although twenty years later, the increase in OC is only significant in the surface depth and no differences were observed in depth. One of the parameters more sensitive to this type of pollution is the EC, related to the oxidation of sulphides to sulphates [11]; in this case, the reduction in the EC over time was significant after the accident, indicating a positive evolution of the soils, although high values of EC were still detected in some plots of the S1 sector, indicating the presence of residual pollution [14].

Table 1. Change in depth and over time in soil properties, mean (standard deviation), in the affected area according to different sectors (acidic: S1 and neutral-alkaline: S2 soil sectors). EC: electrical conductivity. OC: organic carbon.

Depth (cm)	Year	Acidic Sector (S1)				Neutral-Alkaline Sector (S2)			
		pH	EC (dS m^{-1})	CaCO_3 (%)	OC (%)	pH	EC (dS m^{-1})	CaCO_3 (%)	OC (%)
0–10	1998	5.02 a (1.86)	5.65 b (3.79)	1.51 a (4.09)	0.85 a (0.50)	7.49 A (0.55)	5.72 A (5.93)	9.58 A (5.25)	1.20 A (0.54)
	2018	7.04 b (1.66)	1.03 a (0.83)	3.41 a (5.72)	1.63 b (0.58)	8.19 B (0.35)	0.26 B (0.25)	13.72 B (6.54)	1.92 B (0.52)
10–30	1998	6.09 ab (1.98)	2.89 ab (1.57)	1.17 a (2.04)	0.80 a (0.49)	7.88 AB (0.51)	4.07 A (4.72)	9.70 AB (6.11)	1.03 A (0.47)
	2018	6.79 b (1.75)	0.99 a (0.78)	2.31 a (3.57)	0.88 a (0.28)	8.30 B (0.52)	0.25B (0.39)	12.42 B (7.41)	1.06 A (0.32)
30–50	1998	6.69 ab (2.00)	2.17 ab (1.71)	2.10 a (5.48)	0.58 a (0.40)	8.02 B (0.45)	4.35 A (6.75)	9.81 AB (7.12)	0.94 A (0.42)
	2018	6.37ab (1.88)	0.69 a (0.69)	2.35 a (3.97)	0.59 a (0.32)	8.32 B (0.60)	0.36 B (0.63)	11.88 AB (7.56)	0.91 A (0.29)

Letters indicate significant differences between years and depth, lowercase for the acidic sector and capital letters for the neutral-alkaline sector (Tukey's HSD test $p < 0.05$).

In the neutral-alkaline sector (S2), the changes in soil properties twenty years after the accident were similar to those described for the S1 sector. The initial values of pH increased by the addition of calcium carbonate, but only significantly affected to the uppermost 10 cm of the soils in this sector. The OC content also increased in the top part of the soils by the inputs of organic matter coming after the implementation of the vegetation (Figure 2). The most significant change in this sector affected to the EC; in this case, the initial mean values of this property were above 4 dS m^{-1} in all studied depths (up to 50 cm) and twenty years after the recovery and bioremediation treatments these mean values significantly decreased below 0.4 dS m^{-1} for all studied depths. The decrease in the EC over time in

this type of pollution is considered an indicator of the degree of pollution [27], the significant reduction in S2 in relation to S1 could be related to the better evolution of the soils in the S2 and the presence of residual pollution in the S1 soils.

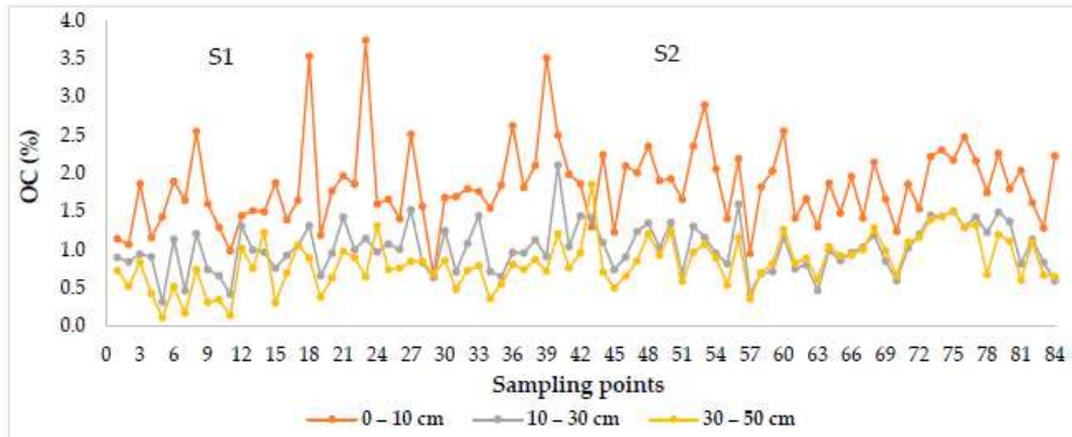


Figure 2. Organic carbon (OC) content in all sampling plots and depths for the two studied soil sectors (S1 and S2).

3.2. Pollutant Concentration in Soils

The concentration of PHEs in the soils twenty years after the accident and completed all remediation measures, indicated significant differences in depth and between sectors depending on the considered element (Table 2). The less mobile elements (Pb and As) have the highest concentration in S1, and especially in the uppermost 10 cm of the soils; meanwhile, the elements with higher mobility in soils (Zn and Cu) showed fewer differences between sectors and trend to increase their concentration in depth, mainly from 10 to 50 cm.

Table 2. Mean (standard deviation) of total concentrations (mg kg⁻¹) of potentially harmful elements (PHEs) in the soils twenty years after the accident, at different depths and in the two studied sectors (S1 and S2).

Depth (cm)	Pb		As		Zn		Cu	
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
0–10	393.92 aA (369.89)	101.75 aB (75.76)	188.20 aA (135.67)	51.42 aB (39.79)	364.71 aA (246.05)	392.94 aA (210.18)	119.72 aA (73.91)	89.41 aB (46.44)
10–30	254.22 abA (182.88)	148.15 aB (157.38)	143.91 abA (94.34)	75.20 aB (82.44)	212.58 bA (128.71)	447.10 aB (260.50)	105.66 aA (73.80)	114.28 abA (63.62)
30–50	166.04 bA (112.04)	130.77 aA (100.84)	90.40 bA (71.96)	59.86 aB (43.21)	154.93 bA (105.99)	422.94 aB (301.69)	92.48 aA (70.72)	120.14 bA (67.92)

Lowercase letters indicate significant differences among depths and capital letters between sectors (Tukey HDS test $p < 0.05$).

In the acidic sector (S1), all elements (except Cu) trend to decrease in depth. For As and Pb, this reduction is gradual, and significant differences were only observed by comparing samples from 0–10 cm with 30–50 cm depth; while for Zn, this reduction was significant at 10 cm depth. This behavior was previously described and related to the soil properties and the climate, indicating that under acidic conditions and the high evapotranspiration in the area [28], the PHEs tend to concentrate in the uppermost part of the soils [29]. In the neutral-alkaline sector (S2), elements behave differently. In

these soils, the elements infiltrated in the soil matrix due to the pollution and the acidic oxidation of the tailings, but the presence of high concentration of carbonates in these soils produced the precipitation of most elements in depth and preventing their rise to the surface despite the intense evapotranspiration in the area.

The comparison of the concentration in PHEs measured in uncontaminated soils (UCS) in the area [30], indicated a significant increase in the uppermost 10 cm of the soils in most cases (Table 3). These concentrations indicated that the recovered soils twenty years after the accident, currently converted into the GGC, retained concentration of PHEs above the background levels in the area despite the remediation measures. The soils in the S1 sector have significantly higher concentrations of As and Pb that should be monitored [6], with values exceeding around 10 times the background concentrations in the uncontaminated soils in the area. Zn and Cu have higher concentration than UCS, but with no significant differences between sectors.

Table 3. Concentration of PHEs in the uncontaminated soils in the area (UCS) according to Simón et al., and times above these values in the acidic (S1) and neutral-alkaline (S2) sectors.

Element	UCS [30]	S1	S2
	(mg kg ⁻¹)	(Times above UCS)	
Pb	41.8	9.4	2.4
As	18.1	10.4	2.8
Zn	230.8	1.6	1.7
Cu	40.1	3.0	2.2

The total concentration of PHEs in the area can be presented as cumulative frequency-distribution curves (Figure 3) to evaluate the degree of soil recovery, and to indicate the presence of potentially polluted soils in the GGC by calculating the percentage of soils that exceed the values to declare a soil as polluted. This potential risk was previously calculated by Simón et al. [31], and according to the thresholds recommended by the Regional Government of Andalusia in 1999 [22] (fixed in 1000 mg kg⁻¹ for Pb, 100 mg kg⁻¹ for As, 1000 mg kg⁻¹ for Zn and 500 mg kg⁻¹ for Cu [32]), the 30% of the soils for As and the 20% for Zn exceeded the proposed values. In the following years, these thresholds were revised according to the risk assessment methodology proposed by the EU [33], considering the sources, receptors, exposure risk and pathways, and the regional government approved the current regulatory values in 2015 [34], which were strongly different from the previous ones: 275 mg kg⁻¹ for Pb, 36 mg kg⁻¹ for As, 10,000 mg kg⁻¹ for Zn, and 595 mg kg⁻¹ for Cu. According to these regulatory values and the mean concentrations measured in the soils, no potential risk related to Zn and Cu was detected. In the case of Pb, around 13% of the studied soils exceeded the regulatory value at 0–10 and 10–30 cm depth, and around 11% considering the 30–50 cm depth. The As is the element that presented the greatest risk of potential contamination in all depths, with around 70% of the studied soils exceeding the regulatory value at 0–10 and 30–50 cm depth and around 80% of at 10–30 cm depth. These results indicate a potential risk of pollution in the area, but the assessment made using total concentrations is only indicative and should be monitored in relation to the vegetation evolution in the area and according to toxicity bioassays [35].

Anyway, the use of the area is restricted since the accident occurred, so the agriculture, hunting and grazing is forbidden, and only recreational activities are permitted into the GGC after the bioremediation treatments were completed. The monitoring of the area has continued to assess the risk of dispersion of the residual pollution into the environment. Further studies indicated that the leaching of the most mobile elements was minimized over time as the concentration of PHEs in soils at 100 cm were close or below (depending on the element) to those of unaffected soils, so the risk of groundwater contamination was avoided [36]. Moreover, the risk related to the grazing horses (the only cattle that are allowed to enter the area) was assessed by analyzing PHEs in horse hair and dung, indicating no significant differences between animals from residual polluted areas and control pastures [37].

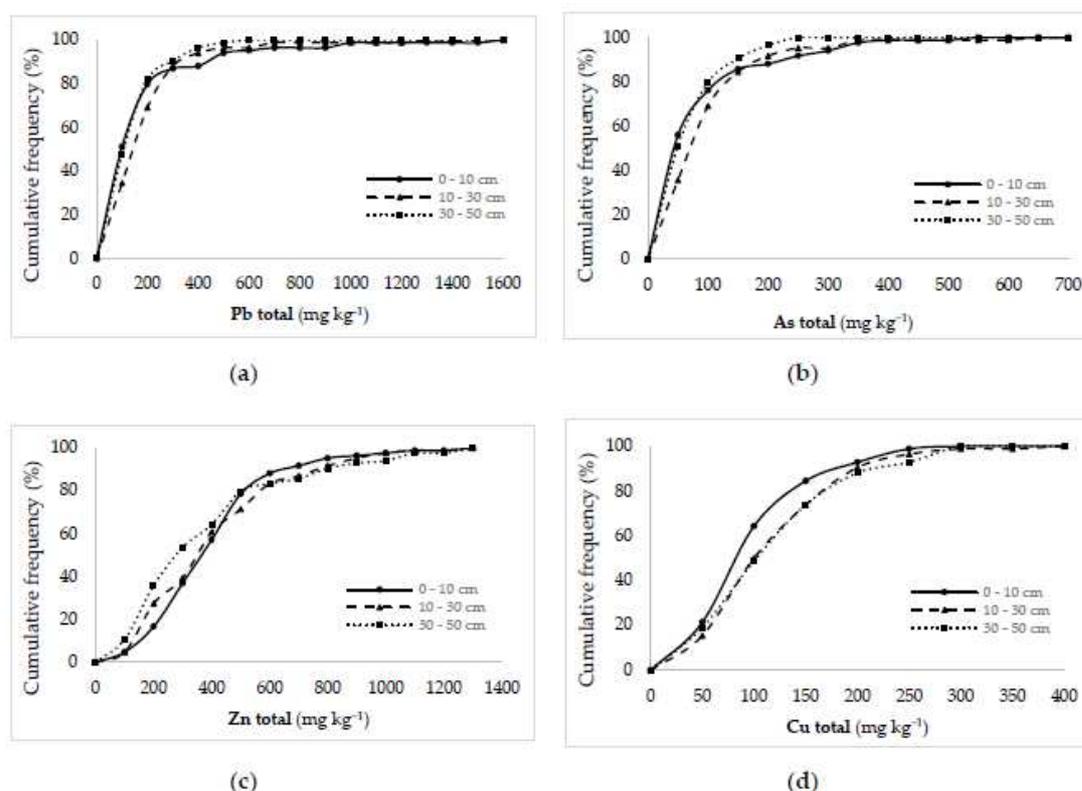


Figure 3. Cumulative frequency-distribution curves of the main PHEs twenty years after the accident and in the three studied depths (a) Total Pb; (b) Total As; (c) Total Zn; (d) Total Cu concentrations.

The main plant species introduced in the area promoted two main functions: on one hand, they covered the bare soils, promoting the soil coverage, reducing the soil erosion and the risk of dispersion of pollutants in the solid phase of runoff waters [38,39]; on the other hand, the vegetation establishment changed the soil properties and reduced the mobility and availability of PHEs into the affected soil [40,41]. The main tree species introduced in the phytostabilization of the area were: *Populus alba*, *Celtis australis*, *Fraxinus angustifolia*, *Quercus ilex*, *Olea europaea*, *Ceratonia siliqua*, and *Pinus pinea*, being *C. australis*, *F. angustifolia*, and *P. alba* the most effective species for reducing PHEs availability in the soil [40], based on the accumulation of pollutants in the root system and the low transfer of PHEs from roots to leaves. The use of shrubs was also implemented in the bioremediation of the area, being *Myrtus communis*, *Retama sphaerocarpa*, *Rosmarinus officinalis* and *Tamarix gallica* the most used species; in this case, the transfer from soil to aerial parts of the plants was low and the decrease in the availability of PHEs in soils was promoted in most cases, highlighting the *R. sphaerocarpa* as the most adequate species for phytostabilize these type of soils [38,41]. Moreover, the use of shrubs as nurse plants to improve and favor the growth of trees and the phytostabilization of the area under Mediterranean conditions is recommended [39]. Therefore, the implementation of the phytostabilization in the area presented a positive evolution by the increase in the percentage of plant cover and diversity [6].

No previous studies in such a long-term real case of phytostabilization (20 years) are found for this study area in relation to the toxicity assessment. The high concentration of As and Pb in some sectors of the recovered area, together with the extensive growth of the vegetation, require the monitoring of the soil-plant transfer of PHEs and the assessment of the potential toxicity by the use of bioassays. In this sense, we conducted a short-term toxicity bioassay based on the root elongation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds in these soils. This test evaluates the phytotoxicity using the soil solution of potentially polluted soils and the root elongation of the lettuce seeds after five days of germination. Our results (Figure 4) indicated a significant reduction of the root elongation in relation to the control (distilled

water) in around 25% of the soils into the GGC. According to the different soil types, acidic sector (S1) presented higher phytotoxicity, with a root elongation reduction around 60% in the 25% of the soils in this sector and no toxicity was detected in the 10% of the sampled soils. Otherwise, in the neutral-alkaline sector (S2), around 90% of the soils presented no phytotoxicity, and a slight elongation reduction (around 20% in relation the control) was detected in only the 5% the samples in this sector.

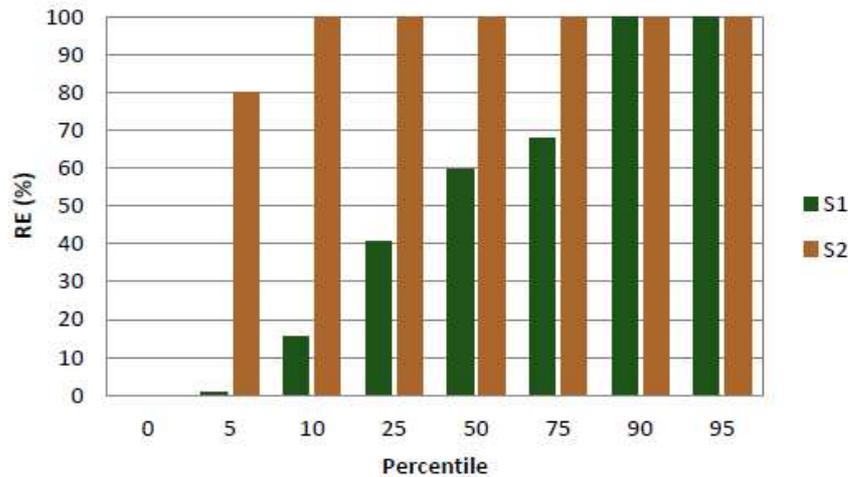


Figure 4. Percentile values for the root elongation percentage (RE) in relation to the control (distilled water) of *Lactuca sativa* seeds in the two studied soil sectors (S1 and S2).

The correlation analysis between the root elongation and the main properties and pollutants in the soils indicated differences in S1 in relation to S2. The variables with higher influence in the phytotoxicity in the acidic sector (S1) were the pH, electrical conductivity (EC) and total concentration of As, with significant correlation coefficients ($p < 0.05$) of 0.790, -0.663 and -0.488 , respectively. These results indicate that the acidity, the presence of soluble salts coming from the sulphide oxidation and the high concentration in As, were strongly related with the reduction in the root elongation of lettuce seeds. These results agree with previous toxicity bioassays developed in soil of the area, where a potential risk of pollution was reported after root elongation and soil respiration tests [42]. Otherwise, in the neutral-alkaline sector (S2) the low percentage of samples in relation to the total area that showed phytotoxicity hinders the potential relationship among variables, so further studies in the potentially polluted sites of the neutral-alkaline sector are needed. Other studies in the area found a potential ecotoxicity risk by a reduction in the abundance of ectomycorrhizal fungi associated with holm oak [43], or by accumulation of Cd and Zn in leaves of *Populus alba* growing in these soils [44,45]. Anyway, the potential phytotoxicity in the area is considered low mainly for the afforested woody plants, although a risk of transfer to the food chain is also described [45]. In this point, the adaptation of plants under the climatic conditions and soil properties were the main key aspects that promoted the success of the revegetation, but the heavy metal tolerance of plants [46] is necessary to assess by long-term in situ studies to evaluate the transfer of PHEs to the aerial parts of the plants to prevent the risk of the dispersion into the food chain.

4. Conclusions

The extensive application of phytostabilization in the area affected by the pyrite mine spill in Aznalcóllar promoted the restoration of the soils in the area and the implementation of the GGC. Anyway, two decades after the accident, there are still some sectors affected by residual pollution. The soil properties positively changed over time, by reducing the acidity and the electrical conductivity, and increasing the organic matter related to the rise of vegetation cover, although in some plots of the acidic sector (S1) there are still soils with strongly acid pH and without any plant growth. Total

concentrations of PHEs were higher than the concentration of the uncontaminated soils in the area (mainly in the case of As and Pb), and the regulatory levels to declare potentially contaminated soils were exceeded in around 13% for Pb and 70% for As, in the uppermost 10 cm of the soils. Toxicity bioassay made with *Lactuca sativa* L. indicated that significant differences into the GGC were observed, where 25% of the soils in S1 showed high phytotoxicity, with a 60% of reduction in root elongation, meanwhile only 5% of the soils in S2 showed low phytotoxicity, with a 20% reduction of the lettuce elongation in relation to the control. Our study indicates that the phytostabilization in the area was a positive bioremediation action, but additional monitoring and treatments are necessary to be applied to reduce the potential mobility and toxicity of PHEs in the sectors affected by residual pollution.

Author Contributions: Conceptualization, F.M.-P., M.S.-A. and J.M.-G.; methodology, F.M.-P.; validation, M.S.-A. and J.M.-G.; formal analysis, R.P.-J. and M.P.-L.; investigation, F.M.-P., M.S.-A., J.M.-G., R.P.-J. and M.P.-L.; data curation, R.P.J. and F.M.P.; writing—original draft preparation, R.P.-J.; writing—review and editing, F.M.-P., M.S.-A., J.M.-G., R.P.-J. and M.P.-L.; visualization, R.P.-J. and F.M.-P.; funding acquisition, F.M.-P. and M.S.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Research Project RTI2018-094327-B-I00 (Ministry of Science, Innovation and Universities) and the Research Groups RNM-269 and RNM-101 (Junta de Andalucía, Spain).

Acknowledgments: The first author acknowledges to Universidad Nacional Agraria La Molina (Perú) for the support in the doctoral secondment carried out at the University of Granada (Spain).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. He, Z.; Shentu, J.; Yang, X.; Baligar, V.C.; Zhang, T.; Stoffella, P.J. Heavy metal contamination of soils: Sources, indicators, and assessment. *J. Environ. Indic.* **2015**, *9*, 17–18.
2. Tóth, G.; Hermann, T.; Da Silva, M.R.; Montanarella, L. Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environ. Int.* **2016**, *88*, 299–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Khalid, S.; Shahid, M.; Niazi, N.K.; Murtaza, B.; Bibi, I.; Dumat, C. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *J. Geochem. Explor.* **2017**, *182*, 247–268. [[CrossRef](#)]
4. Rodríguez-Eugenio, N.; McLaughlin, M.; Pennock, D. *Soil Pollution: A Hidden Reality*; FAO: Rome, Italy, 2018; p. 142.
5. Alkorta, I.; Becerril, J.M.; Garbisu, C. Phytostabilization of metal contaminated soils. *Rev. Environ. Health* **2010**, *25*, 135–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. García-Carmona, M.; García-Robles, H.; Turpín Torrano, C.; Fernández Ondoño, E.; Lorite Moreno, J.; Sierra Aragón, M.; Martín Peinado, F.J. Residual pollution and vegetation distribution in amended soils 20 years after a pyrite mine tailings spill (Aznalcóllar, Spain). *Sci. Total Environ.* **2019**, *650*, 933–940. [[CrossRef](#)]
7. Nakamaru, Y.M.; Martín-Peinado, F.J. Effect of soil organic matter on antimony bioavailability after the remediation process. *Environ. Pollut.* **2017**, *228*, 425–432. [[CrossRef](#)]
8. Zhou, S.; Liu, J.; Xu, M.; Lv, J.; Sun, N. Accumulation, availability, and uptake of heavy metals in a red soil after 22-year fertilization and cropping. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **2015**, *22*, 15154–15163. [[CrossRef](#)]
9. Nikolic, N.; Kostic, L.; Djordjevic, A.; Nikolic, M. Phosphorus deficiency is the major limiting factor for wheat on alluvium polluted by the copper mine pyrite tailings: A black box approach. *Plant Soil* **2011**, *339*, 485–498. [[CrossRef](#)]
10. Leistel, J.M.; Marcoux, E.; Thiéblemont, D.; Quesada, C.; Sánchez, A.; Almodóvar, G.R.; Pascual, E.; Sáez, R. The volcanic-hosted massive sulphide deposits of the Iberian Pyrite Belt. Review and preface to the Thematic Issue. *Miner. Depos.* **1998**, *33*, 2–30. [[CrossRef](#)]
11. Simón, M.; Martín, F.; Ortiz, I.; García, I.; Fernández, J.; Fernández, E.; Dorronsoro, C.; Aguilar, J. Soil pollution by oxidation of tailings from toxic spill of a pyrite mine. *Sci. Total Environ.* **2001**, *279*, 63–74. [[CrossRef](#)]
12. OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). *Environmental Performance Reviews: Spain 2004*; OECD Publications: Paris, France, 2004; p. 211.

13. Madejón, P.; Domínguez, M.T.; Madejón, E.; Cabrera, F.; Marañón, T.; Murillo, J.M. Soil-plant relationships and contamination by trace elements: A review of twenty years of experimentation and monitoring after the Aznalcóllar (SW Spain) mine accident. *Sci. Total Environ.* **2018**, *625*, 50–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Martín-Peinado, F.; Romero-Freire, A.; García, I.; Sierra, M.; Ortiz-Bernad, L.; Simón, M. Long-term contamination in a recovered area affected by a mining spill. *Sci. Total Environ.* **2015**, *514*, 219–223. [[CrossRef](#)]
15. Simón, M.; García, I.; Martín, F.; Díez, M.; del Moral, F.; Sánchez, J.A. Remediation measures and displacement of pollutants in soils affected by the spill of a pyrite mine. *Sci. Total Environ.* **2008**, *407*, 23–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Aguilar, J.; Dorronsoro, C.; Fernández, E.; Fernández, J.; García, I.; Martín, F.; Simón, M. Soil pollution by a pyrite mine spill in Spain: Evolution in time. *Environ. Pollut.* **2004**, *132*, 395–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). *Métodos Oficiales de Análisis*; Tomo 3; Secretaría General: Madrid, Spain, 1994; p. 532.
18. OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Proposal for updating guideline. Terrestrial Plant Test: 208: Seedling emergence and seedling growth test. In *Guideline for the Testing of Chemicals*; OECD: Paris, France, 2003; p. 208.
19. USEPA (US Environmental Protection Agency). *Ecological Effects Test Guidelines*; Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test, OPPTS 850.4200; National Service Center for Environmental Publications: Washington, DC, USA, 1996; p. 8.
20. IUSS Working Group WRB. *World Reference Base for Soil Resources 2014*; International Soil Classification System for Naming Soils and Creating Legends for Soil Maps, Update 2015; World Soil Resources Reports No. 106; FAO: Rome, Italy, 2015; p. 192.
21. SSS (Soil Survey Staff). *Keys to Soil Taxonomy*, 12th ed.; USDA-Natural Resources Conservation Service: Washington, DC, USA, 2014; p. 360.
22. Martín-Peinado, F. Contaminación de Suelos Por el Vertido de una Mina de Pirita (Aznalcóllar, España). Ph.D. Thesis, University of Granada, Granada, Spain, 2001.
23. Cabrera, F.; Clemente, L.; Díaz Barrientos, E.; López, R.; Murillo, J.M. Heavy metal pollution of soil affected by the Guadiamar toxic flood. *Sci. Total Environ.* **1999**, *242*, 117–129. [[CrossRef](#)]
24. Aguilar, J.; Bouza, P.; Dorronsoro, C.; Fernández, E.; Fernández, J.; García, I.; Martín, F.; Simón, M. Application of remediation techniques for immobilization of metals in soils contaminated by a pyrite tailing spill in Spain. *Soil Use Manag.* **2004**, *20*, 451–453. [[CrossRef](#)]
25. Clemente, R.; Walker, D.J.; Bernal, M.P. Uptake of heavy metals and As by Brassica juncea grown in a contaminated soil in Aznalcóllar (Spain): The effect of soil amendments. *Environ. Pollut.* **2005**, *138*, 46–58. [[CrossRef](#)]
26. Madejón, P.; Murillo, J.M.; Marañón, T.; Cabrera, F.; Soriano, M.A. Trace element and nutrient accumulation in sunflower plants two years after the Aznalcóllar mine spill. *Sci. Total Environ.* **2003**, *307*, 239–257. [[CrossRef](#)]
27. García-Carmona, M.; Romero-Freire, A.; Sierra Aragón, M.; Martínez Garzón, F.J.; Martín Peinado, F.J. Evaluation of remediation techniques in soils affected by residual contamination with heavy metals and arsenic. *J. Environ. Manag.* **2017**, *191*, 228–236. [[CrossRef](#)]
28. Simón, M.; Dorronsoro, C.; Ortiz, I.; Martín, F.; Aguilar, J. Pollution of carbonate soils in a Mediterranean climate due to a tailing spill. *Eur. J. Soil Sci.* **2002**, *53*, 321–330. [[CrossRef](#)]
29. Martín, F.; Díez, M.; García, I.; Simón, M.; Dorronsoro, C.; Iriarte, A.; Aguilar, J. Weathering of primary minerals and mobility of major elements in soils affected by an accidental spill of pyrite tailing. *Sci. Total Environ.* **2007**, *378*, 49–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Simón, M.; Ortiz, I.; García, I.; Fernández, E.; Fernández, J.; Dorronsoro, C.; Aguilar, J. Pollution of soils by the toxic spill of a pyrite mine (Aznalcóllar, Spain). *Sci. Total Environ.* **1999**, *242*, 105–115. [[CrossRef](#)]
31. Simón, M.; Díez, M.; García, I.; Martín, F. Distribution of As and Zn in soils affected by the spill of a pyrite mine and effectiveness of the remediation measures. *Water Air Soil Pollut.* **2009**, *198*, 77–85. [[CrossRef](#)]
32. Galán, E.; González, I.; Fernández-Caliani, J.C. Residual pollution load of soils impacted by the Aznalcóllar (Spain) mining spill after clean-up operations. *Sci. Total Environ.* **2002**, *286*, 167–179. [[CrossRef](#)]
33. Ferguson, C.; Darmendrail, D.; Freier, K.; Jensen, B.K.; Jensen, J.; Kasamas, H.; Urzelai, A.; Vegter, J. (Eds.) *Risk Assessment for Contaminated Soils in Europe*; Scientific Basis; LQM Press: Nottingham, UK, 1998; Volume 1, p. 165.

34. BOJA (Boletín Oficial de la Junta de Andalucía). *Decreto 18/2015, de 27 de Enero, Por el Que se Aprueba el Reglamento Que Regula el Régimen Aplicable a Los Suelos Contaminados*; Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, Junta de Andalucía: Sevilla, Spain, 2015; pp. 28–64.
35. Romero-Freire, A.; Sierra-Aragón, M.; Ortiz-Bernad, I.; Martín-Peinado, E.J. Toxicity of arsenic in relation to soil properties: Implications to regulatory purposes. *J. Soils Sediments* **2014**, *14*, 968–979. [[CrossRef](#)]
36. Burgos, P.; Madejón, P.; Madejón, E.; Girón, I.; Cabrera, E.; Murillo, J.M. Natural remediation of an unremediated soil twelve years after a mine accident: Trace element mobility and plant composition. *J. Environ. Manag.* **2013**, *114*, 36–45. [[CrossRef](#)]
37. Madejón, P.; Domínguez, M.T.; Murillo, J.M. Evaluation of pastures for horses grazing on soils polluted by trace elements. *Ecotoxicology* **2009**, *18*, 417–428. [[CrossRef](#)]
38. Murillo, J.M.; Madejón, E.; Madejón, P.; Cabrera, F. The response of wild olive to the addition of a fulvic acid-rich amendment to soils polluted by trace elements (SW Spain). *J. Arid Environ.* **2005**, *63*, 284–303. [[CrossRef](#)]
39. Domínguez, M.T.; Pérez-Ramos, I.M.; Murillo, J.M.; Marañón, T. Facilitating the afforestation of Mediterranean polluted soils by nurse shrubs. *J. Environ. Manag.* **2015**, *161*, 276–286. [[CrossRef](#)]
40. Madejón, P.; Domínguez, M.T.; Gil-Martínez, M.; Navarro-Fernández, C.M.; Montiel-Rozas, M.M.; Madejón, E.; Murillo-Carpio, J.M.; Cabrera, F.; Marañón, T. Evaluation of amendment addition and tree planting as measures to remediate contaminated soils: The Guadiamar case study (SW Spain). *Catena* **2018**, *166*, 34–43. [[CrossRef](#)]
41. Moreno-Jiménez, E.; Vázquez, S.; Carpena-Ruiz, R.O.; Esteban, E.; Peñalosa, J.M. Using Mediterranean shrubs for the phytoremediation of a soil impacted by pyritic wastes in Southern Spain: A field experiment. *J. Environ. Manag.* **2011**, *92*, 1584–1590. [[CrossRef](#)]
42. Romero-Freire, A.; García Fernández, I.; Simón Torres, M.; Martínez Garzón, E.J.; Martín Peinado, E.J. Long-term toxicity assessment of soils in a recovered area affected by a mining spill. *Environ. Pollut.* **2016**, *208*, 553–561. [[CrossRef](#)]
43. López-García, Á.; Gil-Martínez, M.; Navarro-Fernández, C.M.; Kjoller, R.; Azcón-Aguilar, C.; Domínguez, M.T.; Marañón, T. Functional diversity of ectomycorrhizal fungal communities is reduced by trace element contamination. *Soil Biol. Biochem.* **2018**, *121*, 202–211. [[CrossRef](#)]
44. Domínguez, M.T.; Marañón, T.; Murillo, J.M.; Schulin, R.; Robinson, B.H. Trace element accumulation in woody plants of the Guadiamar Valley, SW Spain: A large-scale phytomanagement case study. *Environ. Pollut.* **2008**, *152*, 50–59. [[CrossRef](#)]
45. Domínguez, M.T.; Madejón, P.; Marañón, T.; Murillo Carpio, J.M. Afforestation of a trace-element polluted area in SW Spain: Woody plant performance and trace element accumulation. *Eur. J. For. Res.* **2010**, *129*, 47–59. [[CrossRef](#)]
46. Tordoff, G.M.; Baker, A.J.M.; Willis, A.J. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. *Chemosphere* **2000**, *41*, 219–228. [[CrossRef](#)]



Anexo 2

**Long-term assessment of remediation
treatments applied to an area affected by a
mining spill in Spain**

Long-term assessment of remediation treatments applied to an area affected by a mining spill in Spain

Rocío Pastor-Jáuregui¹ | Mario Paniagua-López² | Antonio Aguilar-Garrido²  |
Francisco Martín-Peinado²  | Manuel Sierra-Aragón² 

¹Departamento de Recursos Hídricos,
Universidad Nacional Agraria La Molina,
Lima, Peru

²Departamento de Edafología y Química
Agrícola, Facultad de Ciencias, Universidad de
Granada, Granada, Spain

Correspondence

Francisco Martín-Peinado, Universidad de
Granada, Campus Fuentenueva s/n, 18071
Granada, Spain.
Email: fjmartin@ugr.es

Funding information

Ministerio de Ciencia, Innovación y
Universidades, Grant/Award Numbers: FPU-
18/02901, RTI 2018-094327-B-I00

Abstract

This study evaluated the effectiveness of remediation treatments in the long-term (20 years) for one of the largest mine spills in the world, the Aznalcóllar accident. Soil recovery was carried out through the application of various rates of organic (compost and manure) and inorganic amendments (materials rich in iron oxides and calcium carbonate). Different amendment combinations were grouped in four treatments (T1 to T4) and applied in different sectors depending on the soil properties and the degree of initial contamination. To assess the degree of soil recovery, physicochemical properties, total, water-soluble, and bioavailable concentrations of the main contaminants (Pb, As, Zn, and Cu) were determined over time. Applied treatments increased pH, calcium carbonate, and organic carbon content of soils, reduced electrical conductivity, and decreased mobility of contaminants, indicating that remediation treatments were efficient recovering soils contaminated by potentially harmful elements (PHEs). However, 20 years after the accident, total concentrations of Pb and As still exceed the intervention levels of the current regulations in certain areas. These areas are located in the sectors closest to the mine and where treatments T1 and T2 were applied. In these cases, the added doses of organic amendments, iron oxide-rich soils, and carbonate amendments were not sufficiently effective, so the application of new treatments is recommended to complete the total recovery of the Guadiamar Green Corridor.

KEYWORDS

amendments, bioavailability, potentially harmful elements, soil recovery, solubility

1 | INTRODUCTION

Soil contamination by potentially harmful elements (PHEs) is a growing problem worldwide. Heavy metals and associated elements released into the environment are persistent, and their toxicity represents a serious threat to organisms exposed to high concentrations of such contaminants (Bernard & Oluranti, 2017). For the treatment of contaminated soils, one of the major current remediation techniques is the assisted natural remediation, which consists of improving soil properties to favor the re-establishment of its main functions and

promote the growth of vegetation (Adriano, Wenzel, Vangronsveld, & Bolan, 2004). In this sense, the application of organic and inorganic amendments to a contaminated soil favors its natural remediation, since it is based on the reduction of the mobility and bioavailability of PHEs (Xiong, Madejón, Madejón, & Cabrera, 2015). In addition, the application of amendments favors the biological activity of the soil, promoting the implantation of bioremediation techniques such as phytostabilization, which enhances the mechanisms of the soil-micro-organism-plant system to speed up the recovery of contaminated areas (Bernard & Oluranti, 2017). Revegetation of areas affected by

PHEs is a widely used alternative to reduce related environmental risks but requires regular monitoring to control potential passive transmission of contaminants into the food chain (Pardo, Mondaca, Celis-Diez, & Ginocchio, 2018). Therefore, assisted phytoremediation and the use of amendments are efficient, cost-effective, and environmentally friendly methods for the recovery of contaminated soils (Wiszniewska, Hanus-Fajerska, Muszyńska, & Ciarkowska, 2016). Medium-term studies based on the application of organic and inorganic amendments to an acidic soil contaminated with different PHEs demonstrated the effectiveness of carbonated materials in increasing pH and reducing Cd, Cu, and Zn concentrations in soil solution (Xiong et al., 2015). Likewise, Pardo et al. (2018) evaluated the revegetation of an acidic soil contaminated with metals, after 6 years of incorporating lime amendments with and without compost, concluding that lime plus compost amendment was the best treatment to increase vegetation cover.

In this study, we evaluated the remediation of an area contaminated by the Aznalcóllar mine accident (Seville, Spain), 20 years after the spillage of tailings and acidic waters with high concentrations of heavy metals and other PHEs (Simón et al., 1999). Recovery actions initially focused on the removal of potentially toxic tailings and the highly contaminated topsoils, followed by assisted natural remediation based on the application of organic and inorganic amendments and on phytostabilization with native vegetation (P. Madejón et al., 2018). The recovery of the affected area was realized through the largest soil restoration program carried out to date in Spain, with the participation of the Administration, Universities (UGR, US, UHU, UCO, etc.) and research institutions (CSIC), with an investment of 280 million € (OECD, 2004). The initial removal of the soils affected by the spill was performed depending on the particular characteristics of the terrain. In the northern part of the study area, the one closest to the mine, more than a meter of the original soil was removed, while in the rest of the areas, only the topsoil, less than 30 cm, was affected (Martín Peinado, 2001).

After removing the contaminated soils, different organic and inorganic amendments were used for soil recovery. Amendments application depended on soil properties and residual concentration of PHEs. Initially, materials rich in CaCO_3 , such as waste from a sugar factory and cellulose pulp ash, were applied throughout the affected area; the doses applied in acidic soils (first 15 km from the mine) ranged between 60 and 90 t ha^{-1} and were fixed in 20 t ha^{-1} in basic soils (rest of the affected area). Subsequently, organic matter amendments were also applied throughout the whole area at a dose of 15–20 t ha^{-1} . Finally, in the most affected areas, clay materials rich in iron oxides were applied to favor arsenic immobilization, since it was considered one of the most persistent contaminants (Aguilar, Dorransoro, et al., 2004; P. Madejón et al., 2018). The intensive remediation treatments ended 3 years after the accident, when the area modified its agricultural use and the Guadiamar Green Corridor (GGC) was implemented in 2003 as a Protected Landscape area, where agriculture, grazing, fishing, or hunting was banned (CMA, 2003).

Over time, systematic samplings have been performed in the entire affected area to assess the degree of recovery in the zone,

which has been generally considered as positive (Aguilar, Dorransoro, et al., 2004; Simón et al., 1999, 2001, 2008). However, in recent years, the presence of residual contamination has been detected in certain sectors of the GGC, which were initially identified through field observation, due to the presence of patches where no vegetation grows and a potential risk of dispersion of PHEs was detected (Martín et al., 2015; Romero-Freire, García Fernández, et al., 2016). In this sense, the objective of this study was to assess the evolution of the treatments and doses applied to the soils in the different sectors and how these treatments have developed 20 years after the accident. Changes in the physicochemical properties of soils, total, water-soluble, and bioavailable concentrations of the main PHEs (Pb, As, Zn, and Cu), and the potential toxicity in the affected area are also evaluated.

2 | MATERIAL AND METHODS

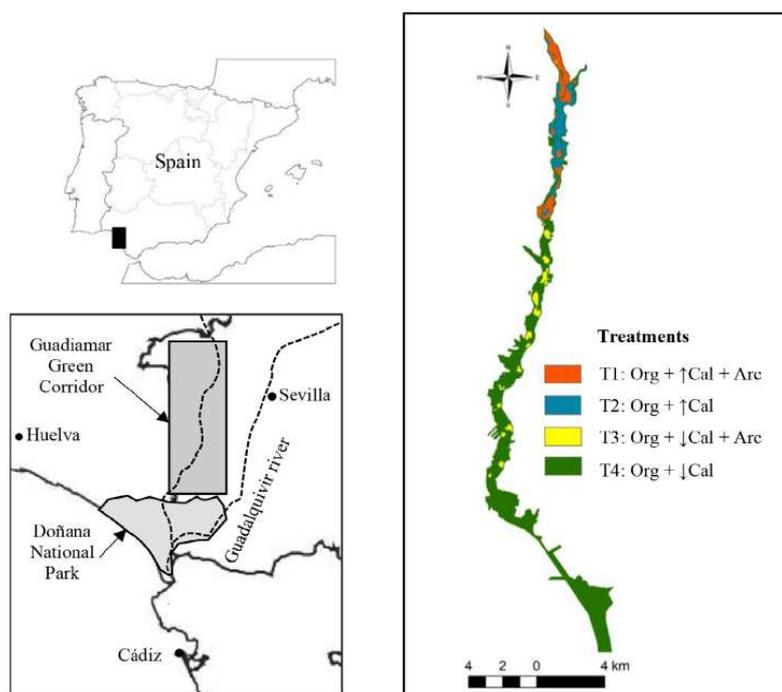
2.1 | Study area

The study area includes the GGC, affected by the toxic spill from the Aznalcóllar mine (Seville, Spain). This area is characterized by a smooth topography associated with the Guadiamar River basin (Figure 1), involving 4,600 ha of soils mainly used for agriculture before the accident. The main soil groups in the area are Fluvisols and Regosols, according to WRB (IUSS, 2015) or Entisols, according to SSS (2014). In all cases, these are soils with a poorly developed profile, relatively high fertility and anthropogenic influence, in which crops (fruit trees and cereals) and pastures predominate (Cabrera, Clemente, Díaz Barrientos, López, & Murillo, 1999; Martín Peinado, 2001). The climate of the area is conditioned by its location within the Guadalquivir Depression and the influence of the Mediterranean climate. The annual average temperature is 17.7°C (with average temperatures in the coldest months higher than 10°C) and the average annual precipitation is 612.7 mm. The annual insolation is greater than 2,800 hr yr^{-1} , so the potential evapotranspiration values are higher than those of precipitation in more than 6 months a year (Martín Peinado, 2001). According to the classification of Rivas Martínez (1987), the climate is Mediterranean with drought in the summer season. Regarding the edaphic profile, the temperature regime is thermic and the humidity regime is Xeric (USDA, 1999).

2.2 | Soil sampling

In the study, a systematic sampling based on a grid of squares 400 m per side is carried out 20 years after the accident, throughout the whole affected area, including 84 georeferenced homogeneous plots (10 × 10 m) randomly distributed. Four samples of the surface layer (0 to 10 cm) were taken in each plot, which were mixed and homogenized in field in order to obtain a representative sample (composite sample) from each 100 m^2 plot. The data from the initial sampling in 1998, carried out in the same year as the accident and before the application of any remediation action, were analyzed in Simón et al. (1999) and are considered in this study, and the data from the

FIGURE 1 Map of the area affected by the Aznalcóllar mine tailing spill and distribution of the treatments applied in the area [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



Org: organic amendment, Arc: iron oxides-rich amendment, Cal: carbonate-rich amendment (↑ = dose between 60–90 t ha⁻¹, ↓ = dose of 20 t ha⁻¹)

TABLE 1 Treatments and doses applied (t ha⁻¹) for the recovery of GGC soils

Treatment	n	Org	Cal	Arc
T1	14	15–20	60–90	320–960
T2	10	15–20	60–90	0
T3	23	15–20	20	320–960
T4	37	15–20	20	0

Abbreviations: Arc, iron oxides-rich amendment; Cal, calcium carbonate-rich amendment; n, number of sampled plots for each treatment; Org, organic amendment

sampling released in 2004, once the recovery actions of the affected area have been completed (available in Simón, Iriarte, et al., 2005), were also considered to compare the long-term recovery evolution.

This study focuses on assessing the evolution of the treatments applied to soils in the different sectors of the affected area. In general, the affected area can be divided into four sectors (Figure 1 and Table 1) according to the applied treatments (Aguilar, Dorronsoro, et al., 2004). In all cases, organic amendments (Org) were applied to restore fertility and promote biological activity after the impact, since the disposal of the topsoil removed the most fertile layer. Organic amendments were applied more or less homogeneously in all sectors: in the most affected area (first 15 km downstream from the mine)

20 t ha⁻¹ of compost from different sources were applied, in the middle zone (between 15 and 30 km downstream), 20 t ha⁻¹ of manure were applied, and in the lowest area (last 10 km of the affected area), 15 t ha⁻¹ of manure were applied. The second most widely used amendment was a material rich in calcium carbonate (Cal) coming from the sugar beet industry, in order to neutralize the acidity generated by the oxidation of residual tailings that were mixed with soil matrix during cleaning actions, to promote PHEs immobilization. Cal was also applied in different doses according to the affected area: on the first 15 km downstream from the mine, 40 t ha⁻¹ were initially applied, and the following year, liming was repeated in variable doses (20, 30, or 50 t ha⁻¹), giving a total dose for this sector between 60 and 90 t ha⁻¹, and in the rest of the affected area, 20 t ha⁻¹ were added without repetition in the following year. Finally, the last applied amendment consisted of red soils rich in Fe oxides (Arc), which were applied to reduce arsenic mobility, considered one of the most contaminants remaining after cleaning work (Aguilar, Bouza, et al., 2004). The doses applied were heterogeneous and depended on the residual arsenic concentrations in the soils, so they varied between 320 and 960 t ha⁻¹ (CAGPDS, 2002).

The combination of amendments and applied doses defines a total of four treatments: T1—organic, iron oxides-rich amendments, and more than 20 t ha⁻¹ of carbonate-rich amendment were applied, T2—organic amendment and more than 20 t ha⁻¹ of carbonate-rich

amendment were applied, but no iron oxides-rich amendment, T3–organic, iron oxides-rich amendments, and less than 20 t ha⁻¹ of carbonate-rich amendment were applied, and T4–organic amendment and less than 20 t ha⁻¹ of carbonate-rich amendment were applied, but no iron oxides-rich amendment (Table 1).

2.3 | Analytical methods

All soil samples were air-dried and sieved (<2 mm) before analyses, which were performed using standardized methods (MAPA, 1994). Particle size characterization was determined by the Robinson's pipette method (USDA, 1972). pH was measured potentiometrically in a 1:2.5 soil:water suspension and electrical conductivity (EC) in saturated paste extract. Calcium carbonate content (CaCO₃) was determined by the volumetric gas method (Barahona, 1984) and organic carbon content (OC) by acid oxidation method (Tyurin, 1951), both parameters after fine grinding (<0.05 mm) of the sample.

Total concentration of contaminants (Pb, As, Zn, and Cu) was analyzed by X-ray fluorescence (XRF), using the finely ground sample, with a NITON XL3t-980 GOLDD+ portable analyser (Niton, Billerica, USA). The precision and accuracy of this method were made from measurement (six replicates) of a certified reference material (CRM 052-050 RT-Corporation Ltd., Salisbury, UK), obtaining the following results (*certified* vs. *measured*, mean values in mg kg⁻¹, and *SE* in parentheses): Pb: 82.6 (4.0) vs. 92.6 (4.8), As: 14.6 (2.9) vs. 15.5 (3.9), Zn: 89.0 (4.0) vs. 94.4 (6.2), Cu: 44.2 (6.9) vs. 48.5 (8.0). In all cases, measured values were within the confidence interval of the certified value.

Water-soluble concentrations of contaminants were determined in a 1:5 suspension (soil:water) according to Sposito, Lund, and Chang (1982), and bioavailable forms were extracted with 0.05 M EDTA at pH 7.0 according to Quevauviller et al. (1998). In both cases, extracted elements were measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), with a Perkin Elmer SCIEX ELAN-5000A spectrometer (Waltham, MA, USA). The precision of the method was corroborated by analysis (six replicates) of a standard reference material (SRM 2711), obtaining the following results (*certified* vs. *measured*, mean values in mg kg⁻¹, and *SE* in parentheses): Pb: 1162.0 (31.0) vs. 1,138.1 (11.0), As: 105.0 (8.0) vs. 102.4 (1.1), Zn: 350.4 (4.8) vs. 350.3 (3.4), Cu: 114.0 (2.0) vs. 115.0 (1.6). For all target elements, measured values were within the confidence interval of the certified value.

2.4 | Statistical analysis

Data obtained were analyzed to check its normal distribution using the Kolmogorov–Smirnov test, and the homogeneity of variance was also analyzed using the Levene test. After fulfilling both assumptions, data were analyzed using parametric mean comparison test (ANOVA), considering the study periods (years) and the types of amendments (Org, Cal, and Arc) as independent variables. Subsequently, Tukey post

hoc test determined the significant differences ($p < 0.05$) between the different independent variables considered. All statistical analyses were carried out using SPSS software v. 20.0 (SPSS Inc., USA).

To show the mean values of the water-soluble and bioavailable concentrations of PHEs in the different sampling periods, radial charts were constructed with EXCEL, and the scale was determined independently for each item. The area obtained for each element was measured with ADOBE ACROBAT 9.0 (Adobe Systems Incorporated, USA), and the sum of the areas obtained for each treatment and each year was calculated. Finally, soil remediation index (RA) was calculated according to Xiong et al. (2015), who define this index as the relationship between the surface of each polygon in each sampling period and the surface of the initial polygon (1998), therefore considering RA equal to 1 for the year 1998.

3 | RESULTS

3.1 | Soil properties

Soil granulometric analysis was compared between soils sampled at the beginning of the accident (1998) and 20 years later (2018), to check whether the removal of the topsoil and the application of amendments (Aguilar, Bouza, et al., 2004) generated differences in textural class. We found no significant textural differences between soils sampled just after the accident and 20 years later (Table 2), thus, soils on which T1, T2, and T3 treatments were applied have a coarser texture ('loam' component), while soils where T4 treatment was applied have a finer particle size ('silty-clay' component).

Twenty years after the accident and with the application of remediation treatments, changes have occurred in soil properties depending on the treatment applied (Table 3). The affected area was divided in two different sectors (Aguilar, Dorronsoro, et al., 2004). One located in the first-third (first 15 km downstream from the mine), in which moderately acidic soils, with loam-sandy loam textures and low CaCO₃ content, were treated with T1 and T2 treatments; and another located in the last 30 km of the affected area, in which T3 and T4 treatments were applied to neutral-slightly alkaline soils, with clay textures and a high CaCO₃ content.

Soil pH did not significantly increase after treatment applications 6 years after the accident (2004), while these differences were

TABLE 2 Textural class of the soils sampled in the selected area at the beginning (1998) and 20 years after the accident (2018)

Soils where the treatment was applied	1998	2018
T1	Sandy loam	Loam
T2	Loam	Loam
T3	Loam	Loamy clay
T4	Silty clay loam	Silty clay

TABLE 3 Average values (SD) of the main soil properties in the area affected by the spill in the different sampling years (T1, T2, T3, and T4 represent the soils where the treatments indicated in Figure 1 were applied)

	Year	T1	T2	T3	T4
pH	1998	5.82 b A (1.98)	5.10 b B (1.82)	7.16 a B (0.76)	7.64 a B (0.32)
	2004	6.28 c A (1.88)	6.51 bc AB (1.44)	7.42 ab B (0.94)	7.75 a B (0.48)
	2018	7.19 c A (1.78)	7.36 bc A (1.38)	8.28 a A (0.38)	8.12 ab A (0.32)
EC (dS m ⁻¹)	1998	4.69 a A (2.47)	4.71 a A (2.54)	3.67 a A (1.42)	4.96 a A (3.42)
	2004	2.15 a B (1.41)	1.81 a B (0.81)	1.18 a B (0.56)	1.26 a B (1.29)
	2018	1.94 a B (2.08)	1.32 ab B (0.82)	0.58 b B (0.32)	0.79 b B (0.68)
CaCO ₃ (%)	1998	3.10 b A (5.36)	4.22 b A (6.98)	7.52 ab A (5.44)	10.15 a B (4.90)
	2004	6.21 ab A (14.77)	4.52 b A (8.39)	11.02 ab A (8.67)	13.59 a A (6.93)
	2018	7.92 ab A (9.96)	3.20 b A (5.57)	13.03 a A (7.55)	13.61 a A (5.34)
OC (%)	1998	1.11 a B (0.72)	1.18 a B (0.77)	0.88 a B (0.38)	1.18 a B (0.39)
	2004	1.15 a B (0.47)	1.28 a B (0.56)	1.21 a B (0.41)	1.45 a AB (0.66)
	2018	1.71 a A (0.63)	1.78 a A (0.78)	1.96 a A (0.54)	1.85 a A (0.44)

Note: Lowercase letters represent significant differences between treatments and capital letters between years (Tukey HDS test $p < 0.05$)

TABLE 4 Mean values (SD) of the total concentrations (mg kg⁻¹) of potentially harmful elements (PHEs) in the soils in the different sampling years (T1, T2, T3, and T4 represent the soils where the treatments indicated in Figure 1 were applied)

Total	Year	T1	T2	T3	T4
PbT	1998	464.1 a A (377.0)	420.4 a A (474.2)	467.6 a A (726.9)	308.5 a A (397.3)
	2004	126.3 b B (69.2)	187.8 ab A (118.6)	207.6 a AB (101.5)	151.5 ab B (64.2)
	2018	376.2 a AB (418.1)	305.1 a A (255.4)	88.1 b B (48.9)	109.4 b B (88.5)
AsT	1998	185.2 a A (170.2)	190.7 a A (238.3)	198.9 a A (293.1)	123.3 a A (167.3)
	2004	83.3 a A (58.0)	103.4 a A (93.6)	101.2 a AB (53.3)	63.6 a B (30.7)
	2018	169.4 a A (130.0)	166.5 a A (142.9)	44.1 b B (27.6)	54.2 b B (45.5)
ZnT	1998	772.6 a A (674.9)	750.1 a A (673.1)	833.7 a A (723.1)	927.8 a A (595.5)
	2004	246.4 c B (127.5)	320.3 bc B (242.4)	488.2 ab B (183.4)	557.9 a B (260.6)
	2018	337.4 a B (237.2)	354.4 a B (232.6)	307.0 a B (125.7)	462.5 a B (234.3)
CuT	1998	186.5 a A (135.7)	155.9 a A (117.0)	204.8 a A (158.6)	177.1 a A (107.3)
	2004	68.5 c B (26.4)	85.1 bc A (45.9)	112.6 ab B (37.3)	126.5 a B (50.3)
	2018	106.2 a AB (69.8)	118.4 a A (74.9)	70.5 a B (38.5)	103.3 a B (48.3)

Note: Lowercase letters represent significant differences between treatments and upper-case letters between years (Tukey HDS test $p < 0.05$)

significant at 20 years in soils where T2, T3, and T4 were applied. In all cases, mean pH values are above 7, reaching values higher than 8 in the case of T3 and T4; anyway, soils with treatments T1 and T2 presented values significantly lower than soils with treatments T3 and T4 both at the beginning (1998) and 20 years after the accident. On the other hand, electrical conductivity (EC) is a parameter closely related to this type of soil contamination, since the oxidation of sulfides in the residual tailings mixed with soils generates soluble salts (mainly sulfates) that increased this parameter in soil (Simón et al., 2001). All treatments applied were effective in reducing the high EC, the differences being significant 6 years after the accident and remaining constant over time. Moreover, as the application of organic amendments was widespread throughout the area affected by the spill, OC content increased in soils after the application. However,

these increases were statistically significant only in the last sampling period (2018) but not in 2004.

3.2 | Total concentration of PHEs in soils

Soil contamination was initially very high, due to the entry of tailings and acidic water into soil matrix (Simón et al., 1999). In 1998, there were no official regulatory levels to declare a soil as contaminated in Spain, so the evaluation of potential contamination in the area was made based on the current proposal of the Regional Government of Andalucía at that time (CMA, 1999). In this proposal, intervention levels for agricultural soils were set at: Pb–350 mg kg⁻¹ (soils with pH < 7) and 500 mg kg⁻¹ (soils with pH > 7), As–50 mg kg⁻¹,

Zn—600 mg kg⁻¹ (soils with pH < 7) and 1,000 mg kg⁻¹ (soils with pH > 7), and Cu—300 mg kg⁻¹ (soils with pH < 7) and 500 mg kg⁻¹ (soils with pH > 7). In this sense, just after the accident, mean values of the different PHEs in soils revealed an intense contamination (Table 4). Intervention levels for As were exceeded in all affected sectors, while that for Pb and Zn were exceeded in soils where T1 and T2 treatments were applied. Mean values for Cu did not exceed intervention levels in any sector, although they did occasionally exceed in certain soils on which the T1 treatment was applied.

The subsequent removal of tailings and soils significantly reduced total concentration of these PHEs in soils, although successive studies indicated that this cleaning left an heterogeneous contamination pattern distributed throughout the affected area (Aguilar, Dorronsoro, et al., 2004). If we compare initial total concentrations with those analyzed 20 years after the accident, we observe that Pb, As, and Cu significantly decreased in soils treated with T3 and T4 but not in soils where T1 and T2 treatments were applied. Zn decreased in all sectors, being significant this reduction 6 years after the accident. These data confirm the decrease in PHEs total concentrations in most of the restored area (T3 and T4 treatments), although potentially harmful concentrations of Pb and As were detected in some soils located in the first 15 km of the affected area by the spill (T1 and T2 treatments). These results are in consonance with those reported by Martín et al. (2015), in areas randomly distributed close to the mine.

Seventeen years after the accident, the Regional Government of Andalucía published the Generic Reference Levels (GRL) to declare a soil as potentially contaminated (BOJA, 2015). For the contaminants studied, values established for the protection of human health were: 275 mg kg⁻¹ for Pb, 36 mg kg⁻¹ for As, 10,000 mg kg⁻¹ for Zn, and 595 mg kg⁻¹ for Cu. According to these values, Zn and Cu total concentrations throughout the GGC 20 years after the accident do not exceed the GRL in any of the sectors. However, total concentrations of Pb exceed the GRL in 13.1% of all analyzed soils, with strong differences between treatments: 35.7% for T1, 40% for T2, 5.4% for T4, and was not exceeded in T3. The element with a highest risk of potential contamination was As, since 69% of the soils analyzed exceed the GRL with differences in percentages between treatments: 86% for T1, 90% for T2, 61% for T3, and 62% for T4.

3.3 | Solubility and availability of PHEs in soils

In studies involving inorganic contamination, besides to analyze total concentrations, it is essential to evaluate the solubility and bioavailability of PHEs in soils. These forms are directly related to the risk of dispersal of contaminants within the soil and throughout the rest of the ecosystem, as well as the risk of toxicity when they are absorbed by organisms, both animals and plants (Kim et al., 2015). In our case, we have analyzed water-soluble concentrations of PHEs as the fraction with a highest risk of dispersion in the short term and concentrations of PHEs extractable with EDTA as the potentially bioavailable fraction in the medium-long term (Quevauviller et al., 1998). EDTA tends to extract soluble, exchangeable, and weakly adsorbed elements

from the soil (Álvarez, López-Valdivia, Novillo, Obrador, & Rico, 2006; Schramel, Michalke, & Kettrup, 2000), and at pH 7.0, it can also dissolve elements that are bound to humic substances in soil. Due to the high stability of the complexes, EDTA could also dissolve elements that are present in soil, such as water-insoluble carbonates (Yotova et al., 2018).

The heterogeneity of the contamination in our study area, described in the previous section, makes that total concentration of PHEs shows great variability. Therefore, to assess the evolution of the mobility of the PHEs after the application of the treatments, the relative percentages of soluble (S) and bioavailable (E) fractions in relation to the total concentration have been calculated (Table 5).

Water-soluble and potentially bioavailable forms present differences depending on the element considered and the treatment applied. In the case of Pb, 6 years after the application of treatments (2004), solubility and bioavailability significantly decrease in all cases, and it remains low over time. Nevertheless, 20 years after the accident, soils where T3 and T4 treatments were applied have higher relative concentrations of soluble and bioavailable Pb than in T1 and T2 treatments. Anyway, although total concentration of Pb is lower in T3 and T4 (Table 4), soluble and bioavailable concentrations are not lower than in T1 and T2. Arsenic shows a different behavior, since its relative solubility in water does not decrease over time for treatments T1 and T2, while an increase in treatments T3 and T4 is observed 20 years after the accident. Furthermore, as Pb, T3 and T4 treatments show a higher relative solubility of As in relation to T1 and T2 treatments. Arsenic bioavailability significantly decreases in all cases after the application of treatments and remains low over time. However, T3 and T4 treatments show a higher bioavailability of As in relation to T1 and T2 treatments in relative terms, considering that total As concentration in T3 and T4 is significantly lower than in T1 and T2. Solubility and relative bioavailability of Zn are significantly reduced after the application of treatments, and this reduction continues until 2018. In 2004, it is observed that the relative solubility of Zn in soils treated with T1 and T2 was higher than in T3 and T4, although the opposite occurs for total concentrations (Table 4). Cu does not significantly reduce its relative solubility over time, and an increase in T4 treatment is observed 20 years after the accident. There are no significant differences in the relative solubility of Cu between the different treatments, which is related to the low mobility of this element in soils. Cu also does not reduce its relative bioavailability after the application of treatments (2004), although it does significantly decrease in the long term (2018). It is as well observed that the relative bioavailability of Cu is higher in soils in T3 and T4 treatments than in T1 and T2.

Percentage of water-soluble and bioavailable concentrations of Pb, As, Zn, and Cu were represented in radial graphs (Figure 2) to estimate the effects of each treatment on the mobility of these elements. According to Xiong et al. (2015), we assessed the potential risk of toxicity by the direct relationship with the size of the polygon obtained. From the data in Figure 2, soil remediation index (RA) was calculated by the measure of the area of each polygon in relation to the initial polygon (value 1) obtained in 1998 (Table 6). In this sense, a reduction in bioavailable forms was observed in all treatments, while soluble

TABLE 5 Mean values (SD) of the percentages of soluble (S) and bioavailable (E) concentration of contaminants in the sampled soils in relation to the total concentrations, according to the treatments applied and the year of sampling

Year	S (%)				E (%)				
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	
Pb	1998	0.106 a A (0.098)	0.231 a A (0.447)	0.478 a A (0.873)	0.255 a A (0.574)	23.794 a A (13.577)	29.917 a A (21.197)	25.512 a A (15.857)	21.649 a A (10.538)
	2004	0.002 a B (0.003)	0.006 a B (0.010)	0.001 a B (0.002)	0.019 a B (0.044)	7.243 b B (5.677)	8.831 b B (7.556)	10.240 ab B (5.394)	14.526 a B (5.981)
	2018	0.009 b B (0.010)	0.010 b B (0.008)	0.046 a B (0.052)	0.043 a B (0.020)	0.832 b B (0.882)	0.751 b B (0.877)	1.996 a C (0.850)	2.184 a C (0.847)
As	1998	0.061 a A (0.059)	0.159 a A (0.281)	0.283 a A (0.378)	0.121 a B (0.173)	6.631 ab A (10.664)	8.592 a A (7.312)	3.147 b A (3.432)	3.832 ab A (2.896)
	2004	0.018 a A (0.027)	0.022 a A (0.023)	0.009 a B (0.007)	0.027 a C (0.027)	0.889 ab B (0.654)	1.205 a B (1.440)	0.590 ab B (0.502)	0.566 b B (0.470)
	2018	0.064 b A (0.075)	0.073 b A (0.096)	0.198 a A (0.189)	0.233 a A (0.197)	0.111 b B (0.097)	0.128 b B (0.116)	0.233 a B (0.131)	0.173 ab B (0.088)
Zn	1998	17.380 a A (19.749)	14.094 a A (14.376)	1.334 b A (1.578)	0.570 b A (1.268)	30.777 ab A (18.988)	39.399 a A (19.447)	22.529 bc A (20.611)	14.180 c A (10.102)
	2004	6.271 a B (14.157)	3.995 ab AB (9.473)	0.497 ab AB (2.265)	0.092 b B (0.250)	21.213 ab A (14.353)	22.392 a B (16.801)	13.248 c B (3.312)	13.664 bc A (2.608)
	2018	4.125 a B (11.692)	1.312 a B (3.978)	0.090 a B (0.117)	0.076 a B (0.033)	2.019 a B (1.404)	1.490 a C (0.379)	1.779 a C (0.539)	1.554 a B (0.512)
Cu	1998	0.727 ab A (0.904)	2.179 a A (3.906)	0.921 ab A (2.014)	0.071 b B (0.129)	25.067 a A (26.288)	23.963 a A (13.036)	32.081 a A (20.901)	25.970 a A (12.539)
	2004	0.957 a A (2.624)	0.308 a A (0.936)	0.129 a A (0.430)	0.080 a B (0.188)	29.936 a A (9.979)	26.231 a A (8.896)	24.195 a A (5.929)	26.669 a A (4.736)
	2018	0.576 a A (1.607)	0.262 a A (0.469)	0.204 a A (0.095)	0.265 a A (0.120)	2.440 b B (0.627)	2.838 ab B (0.791)	3.006 ab B (0.519)	3.266 a B (0.819)

Note: Lowercase letters represent significant differences between amendments and capital letters between years (Tukey HDS test $p < 0.05$)

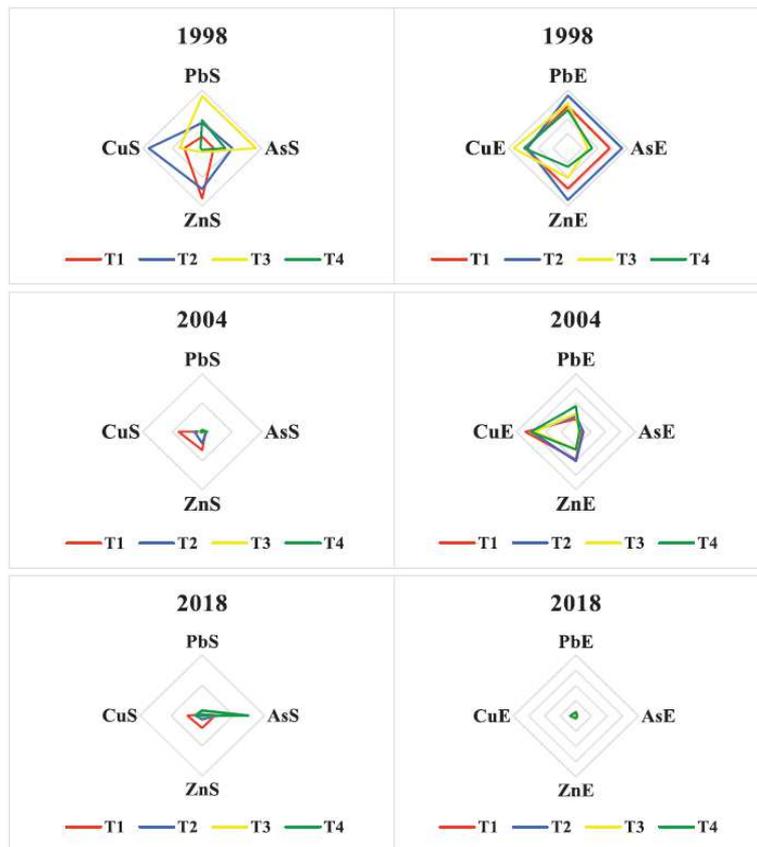


FIGURE 2 Radial graphs of percentages of soluble (S) and bioavailable (E) concentrations of Pb, As, Zn, and Cu, according to the treatments applied and year of sampling. The area of each polygon for each treatment is directly related to the soil remediation index (RA) according to Xiong et al. (2015) [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Año	T1		T2		T3		T4	
	RA S	RA E						
1998	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
2004	0.270	0.328	0.025	0.237	0.002	0.285	0.024	0.548
2018	0.185	0.003	0.018	0.002	0.053	0.007	0.346	0.010

TABLE 6 Soil remediation index (RA) estimated from the percentages of the soluble (S) and bioavailable (E) forms for each treatment and year of sampling

forms were reduced in T1 and T2, but an increase in T3 and T4 was detected after 20 years of the application of these treatments.

4 | DISCUSSION

4.1 | Soil properties

Calcium carbonate content is closely related to the increase of soil pH, and it is associated with the generalized application of carbonate amendments throughout the area affected by the spill (Aguilar, Dorransoro, et al., 2004). However, variations in CaCO_3 content are not very significant, both between treatments applied and years. In

treatments T1 and T2, higher doses of carbonate material were applied in relation to treatments T3 and T4, but in the case of the former, soils on which they were applied had a lower initial content of carbonates and a higher degree of residual contamination, which caused a partial dissolution of CaCO_3 that buffered soil pH (Simón, Iriarte, et al., 2005). In the case of the T3 and T4 treatments, there are also no significant differences in soil carbonate content over time, since liming was carried out at lower doses and only during the first year, because these soils were originally carbonated and had less residual contamination; anyway, no significant increase was observed because a partial dissolution of calcium carbonates occurred (Simón et al., 2008).

Amendment application of red soils rich in Fe oxides (Arc) appears to have no significant effect on soil properties, although slight textural

changes to fine-grained components were observed in soils where this treatment was applied (T1 and T3) in relation to the soils treated without Arc addition (T2 and T4).

Electrical conductivity reduction has been considered as a general indicator of the degree of recovery in the area (García-Carmona, Romero-Freire, Sierra Aragón, Martínez Garzón, & Martín Peinado, 2017). However, soils in which T1 and T2 treatments were applied have higher mean EC values than in other treatments (Table 3), which is related to the still existing residual contamination in these areas 20 years after the spill (Martín et al., 2015).

Application of organic amendments during restoration actions recovered soil OC content before the accident. Although the differences between 1998 (before the removal of the contaminated soils) and 2004 (after completion of remediation measures) samplings are not significant, the evolution over time has favored the growth of vegetation on all the GGC soils (Pastor-Jáuregui, Paniagua-López, Martínez-Garzón, Martín-Peinado, & Sierra-Aragón, 2020) which has promoted the contribution of organic matter to soils and has produced a significant increase in OC content 20 years later.

4.2 | Total concentration of PHEs in soils

The differences observed between sectors may be due to the joint influence of soil properties and applied treatments. T1 and T2 treatments contributed with large amounts of carbonates to soils that received a higher concentration of contaminants but had poor properties to cope with contamination (moderately acidic pH, low, or no calcium carbonate content and sandy textures). Thus, the dynamics of the contaminants in these soils were influenced by a high mobility in soil matrix that, together with the high evapotranspiration of the area, caused the precipitation of the contaminants in the first cm of soils, which is where liming was effective (Simón, Iriarte, et al., 2005). However, soils in which T3 and T4 treatments were applied, besides to receiving a lower load of contaminants, had better properties (basic pH, carbonates, and fine textures), which allowed the contaminants to penetrate to a lesser extent in the soils, and, in cases where they entered in depth, the precipitation in soil matrix prevented its capillary rise and its concentration on soil surface, favoring the dilution effect of the contamination (Martín et al., 2008).

These data show that 20 years after the accident, and after the remediation measures were completed, there are still potentially contaminated soils in the GGC according to current legislation. However, the clean and application of amendments to these soils were effective in most of the GGC, promoting immobilization of PHEs, restoration of essential soil functions, and growth of vegetation, although full recovery in some of the soils located closer to the mine is still needed (Pastor-Jáuregui et al., 2020).

4.3 | Solubility and availability of PHEs in soils

The increase in mobility observed in Pb could be related to the higher vegetation development where T3 and T4 treatments were applied

and the affinity of the organic matter to form organic complexes with Pb easily extracted with EDTA (Sierra, Mitsui, García-Carmona, Martínez, & Martín Peinado, 2019). In the case of As, it does not form stable complexes with EDTA (Přibil, 1982), which could explain the low values of bioavailability extracted. Arsenic is a low mobility element, and its availability depends on soil properties such as Fe oxides, pH, calcium carbonate, clay content, cation exchange capacity, and organic matter content (Martín et al., 2012; Romero-Freire, Sierra-Aragón, Ortiz-Bernad, & Martín-Peinado, 2014). In this sense, the addition of red soils rich in Fe oxides (Arc amendment) was mainly applied to reduce the As solubility and availability (Aguilar, Bouza, et al., 2004), but this amendment did not produce a significant effect in the long term. The high amount of iron that entered the soils by the spill was the main reason of the reduction in As mobility by the formation of scorodite (Álvarez-Ayuso, García-Sánchez, Querol, & Moyano, 2008) and other iron hydroxysulfates like jarosite and schwertmannite (García, Diez, Martín, Simón, & Dorronsoro, 2009).

Influence of carbonates and pH on the solubility of Zn is widely reported in the literature (Clemente, Dickinson, & Lepp, 2008; Kraus & Wiegand, 2006; E. Madejón, Pérez de Mora, Felipe, Burgos, & Cabrera, 2006; Romero-Freire, Sierra, Martínez, & Martín, 2016). The decrease in Zn solubility is directly related to the increase in pH. Regarding the decrease in Zn bioavailability, the effect of liming on soils of the area is recognized as a very effective measure according to Simón, Martín, et al. (2005), and, according to our data, it remains over time. The remediation measures were more effective in the case of Zn in the most distant sector from the mine, where although liming was less intense, the carbonated character of the soils influenced in the reduction of its solubility.

Cu mobility is strongly related to pH, increasing its solubility in acidic soil conditions (García et al., 2009). Rocco, Agrelli, Tafuro, Caporale, & Adamo (2018) reported that absorption by plants was positively related to bioavailability of PHEs in the soil, presenting Zn greater mobility with respect to Cu. Moreover, Cu is strongly retained by the soil, being less mobile and sensitive to changes in soil pH compared to Zn, with relative adsorption at pH values below 5. For this metal, the contents of organic matter and iron oxides are the most significant parameters that govern their adsorption processes in soils (García-Carmona, Romero-Freire, Sierra Aragón, & Martín Peinado, 2019).

Influence of climate in our study area is also a key factor to be considered. In this sense, Liu et al. (2020) indicate that high temperatures accelerate the transformation of soluble fractions of PHEs, contributing to the increase in mobility of heavy metals. In acidic soils, solubility increases because the degradation of particulate organic carbon and the dissolution of Fe-Mn particles are accelerated (Zhang et al., 2014).

Results of the calculation of RA (Table 6) show a positive evolution in all treatments, since the values are below 1 in all cases. The reduction in solubility is very strong after the application of the remediation treatments (2004), and this reduction is maintained over time in the case of T1 and T2 treatments but increases in T3 and T4 treatments. This increase in soluble forms was mainly observed for Pb and As, which in these soils seem to be related to the competing effects

with soil organic matter (Sierra et al., 2019). On the other hand, the reduction in bioavailability is greater for all treatments applied, and this reduction strongly increases over time, indicating a general reduction in the availability of PHEs throughout the study area regardless of the treatments applied. However, the presence of residual contamination and the specific evolution in some sectors (Pastor-Jáuregui et al., 2020) make it necessary to monitor the whole area and to apply remediation measures in those sectors where a potential risk for toxicity is detected.

5 | CONCLUSIONS

Our results indicate that the combination of organic and inorganic amendments is an efficient method to recover soils contaminated by heavy metals and arsenic. The different doses used mainly increased the pH, CaCO₃, and OC content of soils, reduced EC, and decreased PHEs solubility and bioavailability. The effect of the different treatments became very evident 6 years after the accident, and the positive evolution over time has produced a homogenization of soil recovery in all sectors. Nevertheless, treatments T1 and T2 were applied in doses that were not sufficient to improve soil properties at the same rate as in the other treatments, mainly due to the higher degree of the initial contamination and the worse original soil properties. Moreover, in certain sectors of the first 15 km, total concentrations of Pb and As have been detected exceeding the intervention levels of the current regulations, indicating the presence of potentially contaminated soils. Additional treatments with higher doses of organic, and calcium carbonate amendments are recommended to complete the full recovery of these residual areas.

ACKNOWLEDGMENTS

The first author acknowledges the Universidad Nacional Agraria La Molina (Perú) for the support in the doctoral secondment carried out at the University of Granada (Spain). This research was funded by the Research Project RTI 2018-094327-B-I00 and Grant FPU-18/02901 of the Ministry of Science, Innovation and Universities, and the Research Groups RNM-269 and RNM-101 (Junta de Andalucía, Spain).

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

ORCID

Antonio Aguilar-Garido  <https://orcid.org/0000-0001-7292-9511>

Francisco Martín-Peinado  <https://orcid.org/0000-0002-1389-5531>

Manuel Sierra-Aragón  <https://orcid.org/0000-0002-6645-0085>

REFERENCES

- Adriano, D. C., Wenzel, W. W., Vangronsveld, J., & Bolan, N. S. (2004). Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma*, 122, 121–142. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.01.003>
- Aguilar, J., Bouza, P., Dorronsoro, C., Fernández, E., Fernández, J., García, I., ... Simón, M. (2004). Application of remediation techniques for immobilization of metals in soils contaminated by a pyrite tailing spill in Spain. *Soil Use and Management*, 20, 451–453. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2004.tb00396.x>
- Aguilar, J., Dorronsoro, C., Fernández, E., Fernández, J., García, I., Martín, F., & Simón, M. (2004). Soil pollution by a pyrite mine spill in Spain: Evolution in time. *Environmental Pollution*, 132, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.05.028>
- Álvarez, J. M., López-Valdía, L. M., Novillo, J., Obrador, A., & Rico, M. I. (2006). Comparison of EDTA and sequential extraction tests for phytoavailability prediction of manganese and zinc in agricultural alkaline soils. *Geoderma*, 132, 450–463. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2005.06.009>
- Álvarez-Ayuso, E., García-Sánchez, A., Querol, X., & Moyano, A. (2008). Trace element mobility in soils seven years after the Aznalcóllar mine spill. *Chemosphere*, 73, 1240–1246. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.028>
- Barahona, E. (1984). Determinación de carbonatos totales y caliza activa. Grupo de trabajo de normalización de métodos analíticos. In *I Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo* (pp. 53–67). Madrid, Spain: Sociedad Española de la Ciencia del Suelo.
- Bernard, O., & Oluranti, O. (2017). Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14, 1504. <https://doi.org/10.3390/ijerph14121504>
- BOJA (Boletín Oficial de la Junta de Andalucía). (2015). *Decreto 18/2015, de 27 de enero, por el que se aprueba el reglamento que regula el régimen aplicable a los suelos contaminados*. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Junta de Andalucía, Spain, pp. 28–64.
- CAGPDS (2002). *Enmiendas realizadas en los suelos contaminados del río Guadamar a escala 1:10.000, año 2002*. Sevilla, Spain: Junta de Andalucía. <http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/site/portalweb/menuitem.7e1cf46ddf59bb227a9ebe205510e1ca/?vgnextoid=23287134ad2ac210VgnVCM2000000624e50aRCRD&vgnnextchannel=5294b924931f4310VgnVCM2000000624e50aRCRD&rating=1#apartadoa2287134ad2ac210VgnVCM2000000624e50a>
- Cabrera, F., Clemente, L., Díaz Barrientos, E., López, R., & Murillo, J. M. (1999). Heavy metal pollution of soils affected by the Guadamar toxic flood. *Science of the Total Environment*, 242, 117–129. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00379-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00379-4)
- Clemente, R., Dickinson, N. M., & Lepp, N. W. (2008). Mobility of metals and metalloids in a multi-element contaminated soil 20 years after cessation of the pollution source activity. *Environmental Pollution*, 155, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.11.024>
- CMA (Consejería de Medio Ambiente). (1999). *Los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado en Andalucía y la metodología y técnicas de toma de muestra y análisis para su investigación*. Sevilla, Spain: Junta de Andalucía.
- CMA (Consejería de Medio Ambiente). (2003). *Ciencia y restauración del río Guadamar. PICOVER 1998-2002*. Sevilla, Spain: Junta de Andalucía.
- García, I., Díez, M., Martín, F., Simón, M., & Dorronsoro, C. (2009). Mobility of arsenic and heavy metals in a sandy-loam textured and carbonated soil. *Pedosphere*, 19, 166–175. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(09\)60106-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(09)60106-5)
- García-Carmona, M., Romero-Freire, A., Sierra Aragón, M., & Martín Peinado, F. J. (2019). Effectiveness of ecotoxicological tests in relation to physicochemical properties of Zn and Cu polluted Mediterranean soils. *Geoderma*, 338, 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.12.016>

- García-Carmona, M., Romero-Freire, A., Sierra Aragón, M., Martínez Garzón, F. J., & Martín Peinado, F. J. (2017). Evaluation of remediation techniques in soils affected by residual contamination with heavy metals and arsenic. *Journal of Environmental Management*, 191, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.12.041>
- IUSS (International Union of Soil Sciences). (2015). Working Group WRB. World Reference Base for Soil Resources 2014, update 2015. International soil classification system for naming soils and creating legends for soil maps. World Soil Resources Reports N° 106. Rome: FAO, Italy.
- Kim, R. Y., Yoon, J. K., Kim, T. S., Yang, J. E., Owens, G., & Kim, K. R. (2015). Bioavailability of heavy metals in soils: Definitions and practical implementation a critical review. *Environmental Geochemistry and Health*, 37, 1041–1061. <https://doi.org/10.1007/s10653-015-9695-y>
- Kraus, U., & Wiegand, J. (2006). Long-term effects of the Aznalcóllar mine spill—heavy metal content and mobility in soils and sediments of the Guadiamar River valley (SW Spain). *Science of the Total Environment*, 367, 855–871. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.12.027>
- Liu, L., Ouyang, W., Wang, Y., Tysklind, M., Hao, F., Liu, H., ... Su, L. (2020). Heavy metal accumulation, geochemical fractions, and loadings in two agricultural watersheds with distinct climate conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 389, 122–125. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122125>
- Madejón, E., Pérez de Mora, A., Felipe, E., Burgos, P., & Cabrera, F. (2006). Soil amendments reduce trace element solubility in a contaminated soil and allow regrowth of natural vegetation. *Environmental Pollution*, 139, 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.04.034>
- Madejón, P., Domínguez, M. T., Madejón, E., Cabrera, F., Marañón, T., & Murillo, J. M. (2018). Soil-plant relationships and contamination by trace elements: A review of twenty years of experimentation and monitoring after the Aznalcóllar (SW Spain) mine accident. *Science of the Total Environment*, 625, 50–63. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.277>
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). (1994). *Métodos Oficiales de Análisis* (Tomo 3). Madrid, Spain: Secretaría General.
- Martín, F., García, I., Díez, M., Sierra, M., Simón, M., & Dorronsoro, C. (2008). Soil alteration by continued oxidation of pyrite tailings. *Applied Geochemistry*, 23, 1152–1165. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2007.11.012>
- Martín, F. J., Romero, A., Arco, E., Sierra, M., Ortiz-Bernad, I., & Abbaslou, H. (2012). Assessment of arsenic toxicity in spiked soils and water solutions by the use of bioassays. *Spanish Journal of Soil Science*, 2, 45–56. <https://doi.org/10.3232/SJSS.2012.V2.N3.05>
- Martín, F. J., Romero-Freire, A., García, I., Sierra, M., Ortiz-Bernad, I., & Simón, M. (2015). Long-term contamination in a recovered area affected by a mining spill. *Science of the Total Environment*, 514, 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.102>
- Martín Peinado, F. (2001). *Contaminación de suelos por el vertido de una mina de pirita (Aznalcóllar, España)*. (Ph.D. Tesis). University of Granada, Spain.
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). (2004). *Environmental performance reviews: Spain 2004*. Cedex 16, France: OECD Publications.
- Pardo, J., Mondaca, P., Celis-Díez, J., & Ginocchio, R. (2018). Assessment of revegetation of an acidic metal(loid)-polluted soils six years after the incorporation of lime with and without compost. *Geoderma*, 331, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.06.018>
- Pastor-Jáuregui, R., Paniagua-López, M., Martínez-Garzón, J., Martín-Peinado, F., & Sierra-Aragón, M. (2020). Evolution of the residual pollution in soils after bioremediation treatments. *Applied Sciences*, 10, 1006. <https://doi.org/10.3390/app10031006>
- Přibil, R. (1982). *Applied complexometry*. Oxford, England: Pergamon Press Ltd.
- Quevauviller, P., Lachica, M., Barahona, E., Gómez, A., Rauret, G., Ure, A., & Muntau, H. (1998). Certified reference material for the quality control of EDTA and DTPA-extractable trace metal contents in calcareous soils (CRM 6000). *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 360, 505–511. <https://doi.org/10.1007/s002160050750>
- Rivas Martínez, S. (1987). *Memoria del mapa de series de vegetación de España*. Madrid, Spain: ICONA.
- Rocco, C., Agrelli, D., Tafuro, M., Caporale, A. G., & Adamo, P. (2018). Assessing the bioavailability of potentially toxic elements in soil: A proposed approach. *Italian Journal of Agronomy*, 13, 16–22. <https://doi.org/10.4081/ija.2018.1348>
- Romero-Freire, A., García Fernández, I., Simón Torres, M., Martínez Garzón, F. J., & Martín Peinado, F. J. (2016). Long-term toxicity assessment of soils in a recovered area affected by a mining spill. *Environmental Pollution*, 208, 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.10.029>
- Romero-Freire, A., Sierra, M., Martínez, F. J., & Martín, F. J. (2016). Is soil basal respiration a good indicator of soil pollution? *Geoderma*, 263, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.09.006>
- Romero-Freire, A., Sierra-Aragón, M., Ortiz-Bernad, I., & Martín-Peinado, F. J. (2014). Toxicity of arsenic in relation to soil properties: Implications to regulatory purposes. *Journal of Soils and Sediments*, 14, 968–979. <https://doi.org/10.1007/s11368-014-0845-0>
- Schramel, O., Michalke, B., & Kettrup, A. (2000). Study of the copper distribution in contaminated soils of hop fields by single and sequential extraction procedures. *Science of the Total Environment*, 263, 11–22. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00606-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00606-9)
- Sierra, M., Mitsui, Y., García-Carmona, M., Martínez, F. J., & Martín Peinado, F. J. (2019). The role of organic amendment in soils affected by residual pollution of potentially harmful elements. *Chemosphere*, 237, 124549. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124549>
- Simón, M., García, I., Martín, F., Díez, M., del Moral, F., & Sánchez, J. A. (2008). Remediation measures and displacement of pollutants in soils affected by the spill of a pyrite mine. *Science of the Total Environment*, 407, 23–39. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.07.040>
- Simón, M., Iriarte, A., García, I., Martín, F., Aguilar, J., & Dorronsoro, C. (2005). Mobility of heavy metals in pyritic mine spills from an accident in Aznalcóllar, SW Spain. In A. Faz Cano, R. Ortiz Silla, & A. R. Mermut (Eds.), *Advances in GeoEcology* (Vol. 36, pp. 467–476). Reiskirchen, Germany: Catena Verlag GmbH.
- Simón, M., Martín, F., García, I., Bouza, P., Dorronsoro, C., & Aguilar, J. (2005). Interaction of limestone grains and acidic solutions from the oxidation of pyrite tailings. *Environmental Pollution*, 135, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.10.013>
- Simón, M., Martín, F., Ortiz, I., García, I., Fernández, J., Fernández, E., ... Aguilar, J. (2001). Soil pollution by oxidation of tailings from toxic spill of a pyrite mine. *Science of the Total Environment*, 279, 63–74. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(01\)00726-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(01)00726-4)
- Simón, M., Ortiz, I., García, I., Fernández, E., Fernández, J., Dorronsoro, C., & Aguilar, J. (1999). Pollution of soils by the toxic spill of a pyrite mine (Aznalcóllar, Spain). *Science of the Total Environment*, 242, 105–115. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00378-2](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00378-2)
- Sposito, G., Lund, L. J., & Chang, A. C. (1982). Trace metal chemistry in arid-zone field soils amended with sewage sludge: I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in solid phases. *Soil Science Society of America Journal*, 46, 260–264. <https://doi.org/10.2136/sssaj1982.03615995004600020009x>
- SSS (Soil Survey Staff). (2014). *Keys to soil taxonomy* (12th ed.). Washington: USDA-Natural Resources Conservation Service.
- Tyurin, I. (1951). Analytical procedure for a comparative study of soil humus. *Trudy Pochv. Inst Dokuchayeva. USSR*, 38, 5–9.
- USDA (United States Department of Agriculture). (1972). Soil Conservation Service. Methods and procedures for collecting soil samples. Soil Survey Laboratory, USDA, Washington.
- USDA (United States Department of Agriculture). (1999). Soil Taxonomy, 2nd ed. Soil Survey Staff. Natural Resources Conservation Service. Agriculture Handbook N° 436. Washington: USDA.
- Wisniewska, A., Hanus-Fajerska, E., Muszyńska, E., & Ciarkowska, K. (2016). Natural organic amendments for improved phytoremediation

- of polluted soils: A review of recent progress. *Pedosphere*, 26, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60017-0](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60017-0)
- Xiong, J., Madejón, P., Madejón, E., & Cabrera, F. (2015). Assisted natural remediation of a trace element-contaminated acid soil: An eight-year field study. *Pedosphere*, 25, 250–262. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60010-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60010-8)
- Yotova, G., Zlateva, B., Ganeva, S., Simeonov, V., Kudlak, B., Namiešnik, J., & Tsakovski, S. (2018). Phytoavailability of potentially toxic elements from industrially contaminated soils to wild grass. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.077>
- Zhang, C., Yu, Z. G., Zeng, G. M., Jiang, M., Yang, Z. Z., Cui, F., ... Hu, L. (2014). Effects of sediment geochemical properties on heavy metal bioavailability. *Environment International*, 73, 270–281. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.08.010>

How to cite this article: Pastor-Jáuregui R, Paniagua-López M, Aguilar-Garrido A, Martín-Peinado F, Sierra-Aragón M. Long-term assessment of remediation treatments applied to an area affected by a mining spill in Spain. *Land Degrad Dev*. 2021;32: 2481–2492. <https://doi.org/10.1002/ldr.3911>

